UNIVERSIDAD DEL AZUAY

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Aplicación de ácidos orgánicos en lechugas frescas, como desinfectantes de patógenos.

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN ALIMENTOS

Autor:

JAKELINE MARÍA TOLA MALDONADO

Director:

MARÍA FERNANDA ROSALES MEDINA

CUENCA, ECUADOR

2016

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a Dios quien me otorgado salud y determinación para culminar esta etapa.

A mi Madre pilar de mi vida, a mi padre y hermanos.

A María mi abuela, que ahora desde el cielo es mi ángel.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a la Ing. Mª Fernanda Rosales por su apoyo, paciencia y por compartir sus conocimientos durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

De igual manera mis agradecimientos al Ing. Fausto Parra, quien siempre fue una de las personas que aparte de compartir conocimientos como profesor, me brindo su confianza y sus consejos.

Y de manera muy especial a Johana, Ximenita, Diego por su colaboración y por hacer de mis actividades en el laboratorio un espacio de aprendizaje.

A Ximenita Castro, por ser la persona que siempre supo darme palabras de aliento, cuando me veía decaer, y una mano para volver a ponerme de pie.

A René por ser más que amigo un hermano.

A Alejandra por haber sido parte importante de este trabajo.

APLICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN LECHUGAS FRESCAS, COMO DESINFECTANTES DE PATÓGENOS.

RESUMEN

El presente trabajo se orienta al desarrollo de una mezcla desinfectante a base de ácidos orgánicos en hojas de lechuga.

Se realizó un estudio de las propiedades antimicrobianas de los ácidos orgánicos, mediante un diseño de mezclas simplex aumentado. Las lechugas fueron inoculadas con *Escherichia coli, Listeria monocytogenes y* Salmonella Enteriditis y tratadas con las diferentes mezclas.

Se determinó la carga microbiana inoculada inicial, para evaluar la reducción de la misma, aplicando las mezclas experimentales de los tres ácidos orgánicos. La mezcla con 66 % de ácido cítrico, 16% de ácido láctico y 16% de ácido acético fue la que demostró la mayor eficiencia desinfectante con un 99%.

Finalmente se realizó un análisis sensorial con un panel de 30 personas que determinaron que esta mezcla es agradable al usarse en las lechugas frescas.

Palabras Clave: desinfectante, láctico, acético, cítrico, lechuga.

María Fernanda Rosales Medina
Directora de Tesis

Fausto Tobías Parra Parra
Director de Escuela

Jakeline María Tola Maldonado
Autora

ORGANIC ACID APPLIED IN FRESH LETTUCE AS PATHOGENS DISINFECTANT

ABSTRACT

This work is aimed at developing a sanitizing mixture of organic acids to be applied in lettuce leaves. A study of the antimicrobial properties of the organic acids is performed by an increased simplex mixtures design. The lettuce were inoculated with Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Salmonella Enteritidis, and treated with the different mixtures. The inoculated initial microbial load was determined by applying the experimental mixtures of the three organic acids in order to assess its reduction. The mixture with 66% citric acid, 16% lactic acid and 16% acetic acid demonstrated the most disinfectant efficiency with 99%. Finally, a sensory analysis was carried out by a panel of 30 people, who found that this mixture is pleasant when used in fresh lettuce.

Keywords: Disinfectant, Lactic, Acetic, Citric, Lettuce

María Fernanda Rosales Medina
Thesis Director

Fausto Tobías Parra Parra
School Director

Jakeline María Tola Maldonado
Author

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO
AZUAY
Dpto. Idiomas

Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

INDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDOS **Páginas**

DEDICATORIA ii

AGRADECIMIENTOS iii

APLICACIÓN DE ACIDOS ORGANICOS EN LECHUGAS FRESCAS, COMO DESINFECTATES DE PATÓGENOS. 1

INTRODUCCIÓN 1

OBJETIVOS 3

OBJETIVO GENERAL: 3

OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 3

CAPITULO I 4

INOCUIDAD ALIMENTARIA 4

Introducción. 4

1. 1 Inocuidad alimentaria: concepto y generalidades 4

1.2 Importancia 5

1.3 Calidad alimentaria y su importancia. 6

1.4 Microbiología de las Hortalizas 8

1.5 Microorganismos involucradosen la contaminación de hortalizas 8

1.6 Principios generales de la desinfección 11

1.7 Modo de acción de los ácidos orgánicos: efecto antimicrobiano 11

1.7.1Ácido láctico 13

1.7.2 Ácido acético 13

1.7.3 Ácido cítrico 14

1.8 Mecanismo de defensa en los microorganismos frente a los ácidos. 14

1.9 Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) 16

1.9.1Procedimientos operativos estandarizados de saneamiento (POES)..... 17

CAPÍTULO II 18

MATERIALES Y MÉTODOS 18

Introducción 18

2.1.1. Diseño de mezclas simplex reticular aumentado 19

2.1.2 Desarrollo de mezclas antimicrobianas a partir de ácidos orgánicos 19

2.1.3. Preparación de las mezclas antimicrobianas 21

2.2. Pruebas in vitro 22

2.2.1 Equipos 22

2.2.2 Materiales 22

2.2.3 Reactivos 22

2.2.4 Procedimiento 23

2.3 Pruebas in vivo 23

2.3.1 Equipos 24

2.3.2 Materiales 24

2.3.3 Reactivos 24

2.3.4 Procedimiento 25

2.4 Pruebas en hojas de lechuga sin inoculo. 26

2.4.1 Equipos 27

2.4.2 Materiales 27

2.4.3 Reactivos 27

2.4.4 Procedimiento 27

2.5 Análisis Organoléptico. 28

2.5.1 Pruebas Afectivas 28

2.5.2 Prueba de aceptación 29

CAPITULO III 30

RESULTADOS 30

Introducción 30

3.1 Diseño de mezclas pruebas in vitro. 30

3.1.2 Halos de desinfección diseño experimental concentración 1% y 2% respectivamente, frente a *Escherichiacoli.* 31

3.1.3 Halos de desinfección diseño experimental concentración 1% y 2% respectivamente, frente a Salmonella Enteriditis. 33

3.1.4 Halos de desinfección diseño experimental concentración 1% y 2% respectivamente, frente a *Listeria monocytogenes.* 35

3.2 Determinación de la carga microbiana de las hojas de lechuga. 37

3.2.1 Determinación de la carga microbiana inicial. 37

3.2.2 Determinación de la reducción de la carga microbiana inicial. 38

3.3Evaluación de la reducción de la carga microbiana de de*Escherichiacoli*,Salmonella Enteriditis y *Listeria monocytogenes,* en hojas de lechuga inoculadas. 39

3.4Evaluación organoléptica de las hojas de lechuga. 43

3.4.1 Pruebas de degustación: Evaluación del aspecto: visual y color, durante diferentes tiempos de exposición a desinfección (0 min, 3 min, 5 min, 7min). 43

3.4.2 Evaluación de la textura: crujiente suave, dura, durante diferentes tiempos de exposición a desinfección (0 min, 3 min, 5 min, 7min). 46

3.4.3 Evaluación del sabor: ácido y característico, durante diferentes tiempos de exposición a desinfección (0 min, 3 min, 5 min,7 min). 48

3.4.4 Evaluación del agrado en general, durante los tiempos de exposición a desinfección (0 min, 3 min, 5 min, 7 min). 50

CAPITULO IV 52

DISCUSIÓN 52

Introducción 52

4.1 Determinación de la carga microbiana inicial en lechugas adquiridasen el mercado Municipal de la Ciudad de Cuenca..... 52

4.1.1 *Escherichiacoli*en hojas de lechuga fresca..... 53

4.1.2 SalmonellaEnteriditis en lechuga fresca 54

4.1.3 *Listeria monocytogenes*en lechugas frescas 55

4.2 Diseño de mezclas..... 57

4.2.1 Evaluación de las mezclas antimicrobianas en las pruebas in vitro..... 57

4.3 Evaluación de Pruebas Organolépticas en hojas de lechuga..... 58

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... 59

Recomendaciones:..... 60

BIBLIOGRAFIA..... 61

Referencias Electrónicas 62

ANEXOS 66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Reacciones de descarboxilación de aminoácidos relacionados al estrés acídico……...……1
Figura 2.2 Diseño de mezclas simplex aumentado……..……...…….....2
Figura 3.3 Halos de desinfección en mm obtenidos con una concentración del 1% de los ácidos orgánicos frente *Escherichiacoli*.....32
Figura 4.3 Halos de desinfección en mm obtenidos con una concentración del 2% de los ácidos orgánicos frente a *Escherichia coli*..……32
Figura 5.3 Halos de desinfección en mm obtenidos con una concentración del 1% de los ácidos orgánicos frente a Salmonella Enteriditis…….34
Figura 6.3 Halos de desinfección en mm obtenidos con una concentración del 2% de los ácidos orgánicos frente a Salmonella Enteriditis…….34
Figura 7.3 Halos de desinfección en mm obtenidos con una concentración del 1% de los ácidos orgánicos frente a *Listeria monocytogenes*..……36
Figura 8.3 Halos de desinfección en mm obtenidos con una concentración del 2% de los ácidos orgánicos frente a *Listeria monocytogenes*..……36
Figura 9.3 Evaluación del aspecto visual de la hoja de lechuga, frente a los diferentes tiempos de exposición a desinfección 0 min, 3 min, 5 min, 7 min.…..…..44
Figura 10.3 Evaluación del color de la hoja de lechuga, frente a los diferentes tiempos de exposición a desinfección 0 min, 3 min, 5 min, 7 min…….……45
Figura 11.3 Evaluación de la textura crujiente de la hoja de lechuga, frente a los diferentes tiempos de exposición a desinfección 0 min, 3 min, 5 min, 7 min…..**.....**46
Figura 12.3 Evaluación de la suavidad de la hoja de lechuga, frente a los diferentes tiempos de exposición a desinfección 0 min, 3 min, 5 min, 7 min…….47
Figura 13.3 Evaluación de la dureza de la hoja de lechuga, frente a los diferentes tiempos de exposición a desinfección 0 min, 3 min, 5 min, 7 min…….47
Figura 14.3 Evaluación del sabor acido de la hoja de lechuga, frente a los diferentes tiempos de exposición a desinfección 0 min, 3 min, 5 min, 7 min…….49
Figura 15.3 Evaluación del sabor característico de la hoja de lechuga, frente a los diferentes tiempos de exposición a desinfección 0 min, 3 min, 5 min, 7 min……49

Figura 16.3 Evaluación del agrado general de la hoja de lechuga, frente a los diferentes tiempos de exposición a desinfección 0 min, 3 min, 5 min, 7 min……51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.2 Diseño de mezclas simplex aumentado ……19
Tabla 2.3 Halos de desinfección obtenidos con *Escherichia coli*……..31
Tabla 3.3 Halos de desinfección obtenidos con Salmonella Enteriditis……..……..33
Tabla 4.3 Halos de desinfección obtenidos con *Listeria monocytogenes*..…..…...35
Tabla 5.3 Carga microbiana inicial presente en lechuga fresca……...….37
Tabla 6.3 Disminución logarítmica de la carga microbiana inicial……...38
Tabla 7.3 Control positivo inoculación de *Escherichia* coli……..……39
Tabla 8.3 Disminución Log, durante los diferentes tiempos de exposición a los experimentos o mezclas N° 5, N° 9 y N° 10. *Escherichia coli*……...40
Tabla 9.3 Control positivo inoculación de Salmonella Enteriditis……....40
Tabla 10.3 Disminución Log, durante los diferentes tiempos de exposición a los experimentos o mezclas N° 5, N° 9 y N° 10. Salmonella Enteriditis…….41
Tabla 11.3 Control positivo inoculación de *Listeria monocytogenes*……...42
Tabla 12.3 Disminución Log, durante los diferentes tiempos de exposición a los experimentos o mezclasN° 5, N° 9 y N° 10. *Listeria monocytogenes*……....42
Tabla 13.3 Evaluación del aspecto visual y el color de la hoja de lechuga……..43
Tabla 14.3 Evaluación de la textura crujiente, suave y dura, de la hoja de lechuga……...46
Tabla 15.3 Evaluación del sabor acido y característico de la hoja de lechuga……..48
Tabla 16.3 Evaluación de agrado general de la hoja de lechuga……...50

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Inoculación de bacterias en hojas de lechuga…….64
Anexo 2: Preparación de diluciones……..…….64
Anexo 3: Incubación de bacterias……..…….65
Anexo 4: Control positivo *Escherichiacoli* ……...66
Anexo 5: Control positivo Salmonella Enteriditis……...……...66
Anexo 6: Control positivo *Listeria monocytogenes* 67
Anexo 7: Halos de inhibición*Escherichiacoli* ……...67
Anexo 8: Halos de inhibición Salmonella Enteriditis…….…...68
Anexo 9: Halos de inhibición *Listeria monocytogenes*…….…….68
Anexo 10: Inhibición*Escherichiacoli*mezcla 10, tiempo 3 minutos…….……69
Anexo 11: Inhibición Salmonella Enteriditismezcla 10, tiempo 3 minutos……....69
Anexo 12: Inhibición *Listeria monocytogenes*mezcla 10, tiempo 3 minutos…….70
Anexo 13: Inhibición Bacterias totalesmezcla 10, tiempo 3 minutos…….…...70
Anexo 14: Ficha de catación de las lechugas……..……...71
Anexo 15: Norma Peruana de Referencia RM 615 2013……...….72

Jakeline María Tola Maldonado
Trabajo de Graduación
MSc. María Fernanda Rosales Medina
Junio, 2016

APLICACIÓN DE ACIDOS ORGANICOS EN LECHUGAS FRESCAS, COMO DESINFECTATES DE PATÓGENOS.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el consumo de vegetales, en especial en el caso de la lechuga, conlleva un alto riesgo de contraer enfermedades que pueden ser transmitidas a través de los alimentos.

La contaminación de los alimentos vegetales puede verse influenciada por numerosos factores que incluyen el uso de estiércol como fertilizante, agua contaminada con productos agrícolas, equipos de cultivo contaminados, prácticas higiénicas de los trabajadores en el campo, y dado que estos productos se consumen crudos y no se utilizan prácticas de intervención que puedan controlar o eliminar eficazmente los patógenos antes de su consumo, constituyen una fuente potencial de enfermedades alimentarias.

Los vegetales al ser consumidos crudos y al ser cultivados en tierra son propensos a contaminarse con microorganismos como bacterias patógenas, que son peligrosas para el consumidor.

Dentro de estos microorganismos tenemos enterobacterias como *Escherichia coli, Listeria monocytogenes,* Salmonella Enteriditis.

Es necesario entonces realizar estudios para el uso de compuestos que ayuden a controlar las bacterias patógenas en los alimentos.

En este trabajo se pretende desarrollar una fórmula a base de ácidos orgánicos que sirva como desinfectante de los patógenos presentes en lechugas, uno de los principales vegetales de consumo, la misma que a la vez deberá cumplir con el beneficio de ser totalmente orgánica y de uso simple, que no cause efectos secundarios en la salud a corto o largo plazo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la capacidad antimicrobiana, de la mezcla de Ácidos Orgánicos: Ácido Cítrico, Ácido Láctico y Ácido Acético en lechugas frescas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar un diseño de mezclas para la combinación de los tres ácidos orgánicos: Ácido Cítrico, Ácido Láctico y Ácido Acético.
- Determinar la capacidad antimicrobiana de las mezclas de los ácidos in vitro.
- Aplicar las mejores mezclas in vivo, a las lechugas frescas.
- Realizar pruebas sensoriales de las hojas de lechugas sometidas al tratamiento.

CAPITULO I

INOCUIDAD ALIMENTARIA

Introducción.

En este capítulo se abordarán todos los conceptos relacionados con la inocuidad y calidad alimentaria su definición, así como su importancia y las políticas de inocuidad que deben cumplir los alimentos.

También se definirán los conceptos básicos de los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES) y su importancia en la calidad alimentaria.

Se describirá de manera general el tipo de desinfectantes para la desinfección de alimentos y también la acción de los ácidos orgánicos de estudio (Ácido cítrico, Ácido láctico y Ácido acético) sobre los microorganismos patógenos.

1. 1 Inocuidad alimentaria: concepto y generalidades

Desde sus inicios, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) ha establecido el acceso a una alimentación adecuada como derecho individual y responsabilidad colectiva. El origen del concepto de Seguridad Alimentaria se remonta a la "Declaración Universal de los Derechos del Hombre" de 1948, en la cual se reconoció el derecho al alimento como eje central del bienestar humano.

La Cumbre Mundial de la Alimentación realizada por la Organización de las Naciones Unidad para la Agricultura y la Alimentación, resumió las definiciones sobre Seguridad Alimentaria indicando que: "existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana" (FAO, 1996).

Los estados tienen tanto la obligación de asegurar la protección contra el hambre de las personas como de hacer todo lo posible por promover un disfrute pleno del derecho a alimentos adecuados.

La inocuidad alimentaria, es un concepto que implica que los mismos no causaran daño al consumidor cuando se preparan y/o consumen de acuerdo al uso previsto.
La misma está asociada a todos los riesgos, ya sean crónicos o agudos debido a la presencia en ellos de patógenos microbianos, biotoxinas y/o contaminantes físicos o químicos que pueden afectar la salud de los consumidores, la obtención y garantía de la inocuidad es y debe ser un objetivo no negociable.

A menudo tiende a confundirse inocuidad con calidad. El concepto de calidad abarca una compleja gama de atributos que influyen en su valor o aceptabilidad para el consumidor. Estas características incluyen: valor nutricional; propiedades sensoriales tales como la apariencia, color, aroma, textura y gusto; así como los métodos de elaboración y propiedades funcionales. Muchas de estas características consideradas de calidad pueden estar sujetas a condiciones regulatorias, normativas o contractuales. (OMS, 2004).

1.2 Importancia

La importancia de garantizar la seguridad alimentaria en toda la población de un país es objetivo claro y manifiesto de todos los gobiernos comprometidos con el concepto de que el derecho a la alimentación adecuada es un derecho humano ligado a la vida del individuo.

De todas formas, no solo debe tratarse de brindar asistencia alimentaria directa sino también de proporcionar conocimiento de manera de mejorar integralmente las condiciones de la población destinataria. Para lograr este compromiso, siempre debe recordarse que la seguridad alimentaria y la inocuidad son conceptos simbióticos, no

pueden ser separados uno del otro ya que ante la carencia de la observancia de uno, el otro se ve perjudicado.

1.3 Calidad alimentaria y su importancia.

Se pueden encontrar múltiples definiciones del término calidad, dependiendo del ámbito de aplicación. En el dominio de la producción, comercio y venta, se ha definido como conformidad con las especificaciones.

Según la Organización Internacional de Normalización (ISO) la calidad es la capacidad de un producto o servicio de satisfacer las necesidades declaradas o implícitas del consumidor a través de sus propiedades o características. De esta manera, la adecuación es definida por el usuario o consumidor.

Otro concepto (kanoet al.,1996) incluye un modelo multidimensional de la calidad: esta tiene varios componentes, que pueden ser medidos y clasificados jerárquicamente según su impacto sobre la satisfacción del cliente. Un componente serian los aspectos básicos o ineludibles, sin los cuales el producto no es aceptado. Este modelo incluye los aspectos (necesidades, usos) no esperados por el cliente, y además permite diferenciar y jerarquizar los tipos de calidad ya que, las necesidades de los consumidores son distintas y varían según los grupos en que estos pueden ser clasificados. Por otra parte, el alimento puede ser descrito mediante una serie de parámetros o variables (físicas, químicas, microbiológicas) que se transforman en atributos de calidad por la percepción y preferencias de un usuario (productor, industrial, inspector, consumidor). Los valores que deben alcanzar los atributos para que la adecuación sea positiva se denominan especificaciones de calidad. Para la industria alimentaria es de gran importancia entender la relación existente entre las propiedades y los atributos de calidad percibidos. Un conocimiento adecuado de estas propiedades permitiría incorporar al producto final los atributos de calidad deseados mediante la gestión de los procesos a lo largo de la cadena alimentaria.

Entre los diferentes tipos de calidad en alimentos se encuentran la calidad higiénica y sanitaria, la bromatológica (que incluye sus propiedades nutritivas y de composición), la sensorial u organoléptica, la tecnológica, la ética (denominada también emocional), la calidad de uso (practicabilidad) y la relacionada con aspectos de salud. Cada uno de estos tipos puede a su vez descomponerse en una suma de atributos.

En nuestra sociedad, la calidad higiénica y sanitaria constituye un elemento innegociable y de valor absoluto al considerarse que un alimento no debe causar enfermedad en el consumidor. Otros tipos de calidad pueden ser definidos, medidos y ponderados, estableciéndose niveles de confianza para el cumplimiento de las especificaciones de calidad acordadas (mas es mejor). Por ello se tiende a separar la calidad higiénica y sanitaria del resto definiéndola también como inocuidad o seguridad del alimento.

La calidad higiénico- sanitaria se evaluaría por la ausencia en el alimento de ciertos componentes bióticos (agentes patógenos como bacterias, parásitos, virus, priones, toxinas, alérgenos) y abióticos (residuos de medicamentos, plaguicidas, pesticidas, contaminantes, etc.) que serían un riesgo para la salud. En este contexto, las recientes crisis o escándalos alimentarios han situado a la seguridad alimentaria en primer plano de la actualidad.

Es preciso señalar que el concepto de seguridad alimentaria tiene diversas acepciones. Según la FAO existe seguridad alimentaria si “todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimentarias”. La seguridad alimentaria implica el cumplimiento de las siguientes premisas: i- Una oferta y disponibilidad de alimentos adecuados (producción interior, capacidad de importación, de almacenamiento y ayuda alimentaria). ii – La estabilidad de la oferta sin

fluctuaciones ni escasez en función de la estación del año (independiente de las variaciones climáticas y sin excesiva variación de los precios, existencia de productos alternativos en función de las variaciones estacionales). iii- El acceso a los alimentos o la capacidad para adquirirlos (los alimentos deben estar disponibles a toda población, física y económicamente, en el momento oportuno). iv – La buena calidad e inocuidad de los alimentos. En áreas desarrolladas, las tres primeras premisas se alcanzan de forma generalizada, salvo excepciones ocasionales, por lo que es el último punto el que cobra relevancia y protagonismo y al que van dirigidas todas las políticas de control sanitario en estas regiones.

1.4 Microbiología de las Hortalizas

Existen una gran variedad de factores que contribuyen a la contaminación de frutas y hortalizas por microorganismos causantes de enfermedades a los humanos. Algunos de los factores que pudieran considerarse de riesgo en la calidad microbiana de los productos frescos incluyen: el uso de agua de riego contaminada con heces fecales de humanos y animales; procesos inadecuados en el campo de cultivo; prácticas deficientes de desinfección; condiciones inapropiadas durante empaque; higiene deficiente de los trabajadores; y el mal manejo durante almacenamiento y transporte.

Una vez que ocurre la contaminación, muchos microorganismos patógenos poseen la capacidad de sobrevivir por largos periodos de tiempo en frutas y hortalizas frescas. Algunos microorganismos son también capaces de sobrevivir a procesos de desinfección, e incluso multiplicarse en el producto durante el almacenamiento.

1.5 Microorganismos involucrados en la contaminación de hortalizas

Dentro de los microorganismos que pueden contaminar los productos frescos y causar enfermedades en los seres humanos, se pueden mencionar, esencialmente, tres tipos de organismos que pueden ser transportados por las frutas y hortalizas y que

representan un peligro para la salud humana: virus (hepatitis A, por ejemplo), bacterias (Salmonella Enteriditis, *Escherichia coli, Shigella spp.* y otras) y parásitos (*Giardia spp.*, por ejemplo). Los hongos normalmente no representan un peligro en sí mismos, sino a través de las micotoxinas que producen.

Para que esto ocurra, sin embargo, tiene que haber transcurrido el tiempo necesario para que se desarrolle. En un sistema bien manejado esto es poco probable que ocurra, pues normalmente es detectado y eliminado antes de que llegue al consumidor. De todos estos organismos, las bacterias han sido responsables en la mayoría de los casos. Los protozoarios como Cryptosporidiumparvum, Giardialamblia, y Cyclosporacayetanesis producen quistes, los que constituyen la fase resistente, y que es responsable de la trasmisión del microorganismo.

Los quistes pueden permanecer en el medio ambiente por periodos de tiempo prolongados y permanecer viables o en condiciones optimas para causar enfermedad. Cryptosporidium parvum causa gastroenteritis severa no tratable, y en individuos inmunodeficientes, la infección puede provocar una mortalidad de hasta 50%. Al igual que los parásitos protozoarios, los virus no se multiplican en el ambiente. Sin embargo, pueden sobrevivir el tiempo suficiente para causar enfermedades. Dentro de los virus entéricos que pueden ser transmitidos mediante agua y alimentos contaminados se encuentran: virus hepatitis A, enterovirus (polio y Norwalk), adenovirus, rotavirus, astrovirus, entre otros.

También se ha encontrado que los enterovirus y rotavirus pueden sobrevivir de 1 a 4 meses en hortalizas durante almacenamiento en refrigeración. El grupo de enterovirus es el grupo más comúnmente detectado en aguas de desecho. Estos pueden causar un amplio rango de enfermedades incluyendo desde infecciones respiratorias leves, hasta meningitis, parálisis o la muerte.
Entre las bacterias patógenas que han sido asociadas con el consumo de hortalizas frescas se pueden mencionar *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Escherichia coli*

enterohemorrágica, especies de *Shigella*, Salmonella, *Listeria, Campilobacter*, *Clostridium* y *Staphylococcus* entre otras. En general, todos los casos, a nivel mundial, de brotes de enfermedades han puesto en entredicho la inocuidad de las frutas y hortalizas. Esto ha ocasionado que instituciones de salud mundial estén en alerta para vigilar más de de cerca la calidad microbiológica y tomar medidas para reducir riesgos de contaminación por microorganismos causantes de enfermedades en la población humana.

La principal fuente de contaminación de las hortalizas es el estiércol utilizado como fertilizante y el agua de riego sin tratamiento o contaminada. También se ha señalado como posible fuente de contaminación el uso de pesticidas reconstituidos con agua contaminada durante el cultivo (Guan et al, 2001,2005). Además la contaminación por deficiencias sanitarias en el manejo que puede ocurrir durante la cosecha y el transporte hasta los puntos de venta, o durante el procesamiento y preparado del producto (Franz et al., 2010).

Los factores intrínsecos y extrínsecos que determinan la capacidad de los patógenos entéricos para unirse y proliferar en la filósfera de las plantas incluyen la motilidad del patógeno, la lixiviación de nutrientes por la planta y la interacción con los organismos epifitos (Aruscavage et al., 2006). Los factores ambientales también influyen en la supervivencia de estos patógenos (Oliveira et al., 2012).

Los patógenos sobrevivientes podrían internalizarse en el tejido o incorporarse en biopeliculas (Aruscavage et al., 2006). Algunos patógenos se eliminan con los procedimientos habituales de lavado, pero una porción significativa de estos persisten y proliferan (Ginestrea et al., 2005). Además los desinfectantes muestran deficiencias para eliminar microorganismos, especialmente por su falta de acceso a ciertas partes de las estructuras vegetales (Beuchat, 2002; Lopez et al., 2003).

1.6 Principios generales de la desinfección

Se le denomina desinfección a la destrucción de microorganismos, mediante procedimientos o agentes físicos o químicos satisfactorios, "aplicados en superficies limpias" de forma que se reduzca el número de microorganismos que pueden causar infección u ocasionar otros efectos indeseables (FDA ,1998).

Tomando como base la definición antes planteada se puede decir que desinfectar significa tratar los productos limpios mediante un proceso eficaz para destruir o reducir substancialmente las cantidades de microorganismos que implican un riesgo para la salud pública, así como otros microorganismos no deseados, sin afectar negativamente a la calidad del producto o su seguridad para el consumidor.(FDA,1998).

Existe en el mercado una gran variedad de productos desinfectantes de uso tradicional en la industria alimentaria, como cloro, yodo, amonios cuaternarios y sus respectivos derivados. Sin embargo han aparecido otros productos alternativos, como algunos ácidos orgánicos (acido cítrico, láctico y acético). Por ser estos productos de naturaleza ácida, su acción germicida es atribuible a que afectan el pH del medio, desnaturalizan las proteínas, y afectan el funcionamiento de la membrana celular. La ventaja que toman los ácidos orgánicos versus tratamientos químicos es que son generalmente reconocidos como inocuos para utilizarlos en el tratamiento de alimentos (Cherry 1999).

1.7 Modo de acción de los ácidos orgánicos: efecto antimicrobiano

Los ácidos orgánicos (acético, ascórbico, cítrico, fórmico, láctico, propiónico, peracético) son ampliamente usados para tratamiento de desinfección en concentraciones de 0.05 a 2.5%, cabe recalcar que la aplicación de estos ácidos no va a reemplazar a las Buenas Prácticas durante el procesamiento de alimentos, pero si contribuyen a controlar o disminuir la carga microbiana.

Algunos ácidos orgánicos (láctico, acético, cítrico, peracético) son ácidos débiles, en solución una parte de ellos se encuentra disociada [H^+] [A^-] y otra no [HA]. En equilibrio, la relación entre la parte disociada y la no disociada se expresa mediante una constante de disociación pKa; si se conoce la concentración del ácido, su pH y su pKa, se puede determinar la concentración del ácido no disociado presente en una solución. El poder antimicrobiano de los ácidos orgánicos se debe a su forma no disociada, la cual depende del pH, y tiene más importancia que la disminución del pH extracelular que estos produzcan.

La forma disociada al ser un anión, es altamente polar y por lo tanto no atraviesa fácilmente la membrana plasmática de los microorganismos; por el contrario su forma no disociada, si atraviesa la membrana. Una vez en el interior de la bacteria, el ácido puede disociarse y entonces afecta directamente al pH intracelular microbiano, (Ostling y Lindgren 1993).

Esto puede afectar gravemente a su metabolismo, ya que afecta al gradiente de protones y de carga con el exterior, e interfiere con los sistemas de transporte de aminoácidos y fosfatos. Además muchas encimas esenciales para el metabolismo microbiano se inactivan a pHs ácidos. (Bearson1997). También ocasionan un aumento del turgor celular, al producirse la disociación del ácido en el interior de la célula, la concentración interna de aniones va a aumentar, esto desencadena un mecanismo de compensación de la carga eléctrica que obliga a la bacteria a aumentar los niveles de Na+ y K^+, lo que lleva a un aumento mayor de la fuerza iónica intracelular y del turgor, originando un gran aumento de la presión mecánica sobre la pared del microorganismo, lo que hace que eventualmente estalle. (Foster 1999).

Los ácidos orgánicos son reconocidos generalmente como seguros GRAS (Generally Recognized As Safe), no presentan residuales tóxicos.

1.7.1Ácido láctico

El ácido láctico o ácido 2hidroxipropanoico (CH3CHOHCOOH), es un líquido incoloro o ligeramente café; parecido a un jarabe, obtenido a partir de la fermentación del azúcar, también se encuentra como componente natural de las carnes producido por la glucólisis post- morten. Está incluido en la lista de los ingredientes GRAS (reconocidos generalmente como seguros) de la FDA (Administración de Alimentos y Drogas). Es ampliamente utilizado en alimentos y bebidas, y en las industrias cárnicas, como conservante en elaboración de embutidos y desinfectante de carcasas. La Food Safety and Inspection Service (FSIS) Notice 49-94, permite el uso del ácido láctico como agente antimicrobiano en el lavado de canales bovinas antes del enfriamiento en concentraciones de 2,5%, y la utilización de soluciones al 5% a temperaturas que no excedan los 55°C, que pueden ser aplicadas antes o después de la etapa de enfriamiento de canales.

1.7.2 Ácido acético

Ácido metilencarboxílicoo ácido etanóico, es un ácido de origen natural, presente en la mayoría de frutas. Es producido a través de una fermentación bacteriana, y por consiguiente, está presente en todos los productos fermentados; comercialmente es elaborado por medio de la fermentación bacteriana del azúcar, las melazas o el alcohol, o por síntesis química del acetaldehído. Está autorizado en Estados Unidos para la descontaminación de canales de mamíferos. Se utilizan, tras un lavado con agua fría, soluciones al 1,5% de ácido acético a 14,4 $^{\circ}$C o a 52 $^{\circ}$C, aplicadas por aspersión; en ambos casos se producen reducciones en los recuentos de *Escherichia coli*, Enterobacteriáceas y bacterias aerobias, aunque el segundo es más eficaz. Cuando se aplica por inmersión se utiliza una solución al 1,5 % a 55 $^{\circ}$C durante 10 segundos. Las bacterias Gram negativas son más susceptibles a los ácidos que las especies Gram positivas. El numero de colonias de Salmonella y *Campylobacter* disminuye bastante, pero este tratamiento posiblemente sea menos eficaz para *Escherichiacoli*O157:H7 (López y Casp, 2004).

1.7.3 Ácido cítrico

Es el principal ácido orgánico en frutas (C6H8O7), tales como arándanos, higos, fresas, etc. Según investigaciones de la (USDA) 1996, la aplicación de acido cítrico en concentraciones del 2 % al 5 %, provoca una reducción de 1-3 log en bacterias de carácter patógeno como *Escherichia coli.*

1.8 Mecanismo de defensa en los microorganismos frente a los ácidos.

Las bacterias experimentan diferentes tipos de "estrés" en su vida diaria, a los cuales deben adaptarse. Por ejemplo, una bacteria entérica tendrá que sobrevivir al pH extremadamente bajo del estómago y a la acción antibacteriana de los ácidos grasos de cadena corta presentes en el intestino.

El fenómeno de tolerancia inducida a estrés acídico fue descubierto inicialmente en *Escherichia coli* y Salmonella Enteriditis, pero se ha generalizado después a muchas otras bacterias Gram (-) y Gram (+). El hecho fundamental de este mecanismo de adaptación estriba en que el crecimiento a un pH moderadamente acídico induce la síntesis de proteínas específicas, las cuales protegen a las células a pH extremadamente ácidos. Existen diferentes sistemas implicados, dependiendo de la fase de crecimiento, medio de cultivo y tipo de estrés acídico (Slonczewski, J.L y Foster, J.W. 1987).

El conocimiento de los mecanismos de adaptación a estrés acídico es aún muy incompleto, aunque ha habido un considerable progreso en los últimos años en las enterobacteriáceas. La disminución del pH extracelular acaba provocando una disminución del pH intracelular.

Esto es debido a la difusión pasiva de los protones, a pesar de que la membrana plasmática de la célula es bastante impermeable a estas moléculas. La caída del pH intracelular activa la expresión de genes que codifican descarboxilasas de aminoácidos y estas enzimas pueden elevar el pH interno, porque catalizan reacciones en las que se consumen protones.

Se han descrito 3 reacciones de descarboxilación asociadas a este fenómeno: el paso de glutamato a GABA (ácido gamma amino butírico), el de arginina a agmatina y el de lisina a cadaverina. En todos los casos se consume un protón por cada molécula de aminoácido. Los nuevos productos así formados se intercambian por un nuevo sustrato mediante mecanismos de tipo anti-porte.

Naturalmente, este mecanismo resulta caro para la célula desde el punto de vista energético. Además la disminución del pH interno produce la acumulación de dos importantes proteínas reguladoras: RpoS y PhoP (Reguladores de respuesta, Sigma alternativos, Sig A, Sig B, Sig E, Sig F, Sig H). Estos reguladores controlan distintos conjuntos de genes que están implicados en la protección y reparación de macromoléculas. Asimismo, en Salmonella *typhimurium* se ha descrito un mecanismo fisiológico de adaptación a la acción antimicrobiana de ácidos grasos de cadena corta y esta resistencia inducida se ve forzada en condiciones de anaerobiosis, pH acido y exposición prolongada a dichos ácidos (Kwon, Y.M y Ricke, S.C 1998).

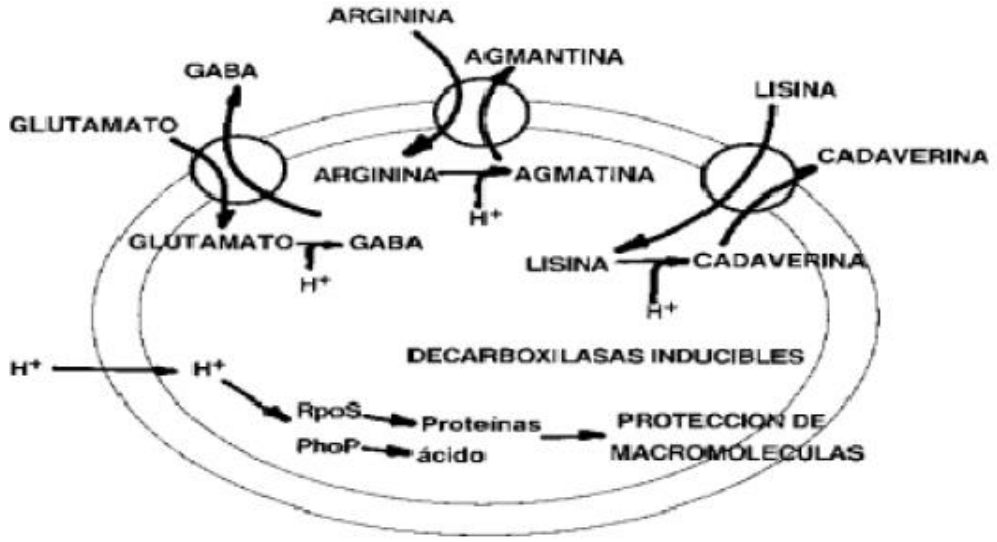


Figura 1.Reacciones de descarboxilación de aminoácidos asociadas al estrés acídico

Fuente: (Rodríguez P, 2000).

1.9 Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA)

Las enfermedades transmitidas por los alimentos han sido definidas de carácter infeccioso o tóxico, causadas por el consumo de alimentos o el agua, la mayoría de las cuales son de origen microbiano, siendo el problemas más extendido del mundo y una causa de la reducida actividad económica (FAO y OMS, 2004).

Los brotes de intoxicación alimentaria implican un determinado grupo de personas, los alimentos que con mayor frecuencia están incriminados en las enfermedades transmitidas por alimentos en Europa y en América del Norte son de origen animal: la carne, leche, huevos y productos derivados. Esto es especialmente propio de las enfermedades causadas por Salmonella, *Escherichia coli* y *Clostridiumperfringes* (FAO y OMS, 2004).

La detección y prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos, depende del esfuerzo conjunto de las autoridades normativas sanitarias, industriales y educativas, cuyas investigaciones objetivas y detalladas conlleven a una disminución en los riesgos de contaminación de los alimentos. Para garantizar a los consumidores un alimento seguro e higiénico, es necesario el control de los microorganismos patógenos en todas las etapas de la producción, lo que implica disponer de métodos de diagnostico que no solo sean rápidos y sensibles, sino, sobre todo, altamente específicos.

1.9.1Procedimientos operativos estandarizados de saneamiento (POES)

Los procedimientos operativos estandarizados de saneamiento, son aquéllos procedimientos escritos que describen y explican cómo realizar una tarea para lograr un fin específico, de la mejor manera posible. Existen varias actividades y operaciones, además de las de limpieza y desinfección, que se llevan a cabo en un establecimiento elaborador de alimentos que resulta conveniente estandarizar y dejar constancia escrita de ello para evitar errores que pudieran atentar contra la inocuidad del producto final.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Introducción

En este capítulo se describe la metodología experimental utilizada en el desarrollo del presente trabajo de graduación. Los métodos incluyen: Desarrollo del diseño de mezclas para obtener la mezcla óptima en la reducción microbiana, pruebas in vitro, pruebas in vivo , análisis sensorial de las hojas de lechuga una vez aplicada la mezcla que mejor resultados obtuvo.

2.1 Diseño de mezclas

Se usan diseños de mezclas para estudiar las características de los productos asociados con cambios en proporción a los componentes del proceso, o la cantidad de la mezcla. Este procedimiento permite diseñar y crear un experimento para manejar situaciones donde los componentes se mezclan para formar una combinación química. Se puede utilizar el diseño “simplex-lacctice” cuando los datos se encuentran distribuidos regularmente sobre una región de superficie de respuesta y el diseño “simplex- centroid” cuando los valores de los datos se distribuyen alrededor del centro de la región de superficie de respuesta.

Todos los diseños incluyen estimaciones de modelos lineales, cuadráticas, cúbicas, cúbicas especiales y gran cantidad de gráficos para visualizar los resultados. (Montgomery, 2003).

2.1.1. Diseño de mezclas simplex reticular aumentado

Este diseño tiene diez puntos con cuatro de ellos en el interior del diseño simplex; la retícula simplex soporta el ajuste del modelo cúbico completo, mientras la retícula del modelo aumentado no lo hará; sin embargo, la retícula simplex aumentada permitirá al experimentador ajustar al modelo cúbico especial o agregar al modelo cuadrático términos especiales de cuatro órdenes. La retícula simplex aumentada es superior para estudiar la respuesta en mezclas en el sentido que puede detectarse y moldear la curvatura en el interior del triángulo. (Montgomery, 2003)

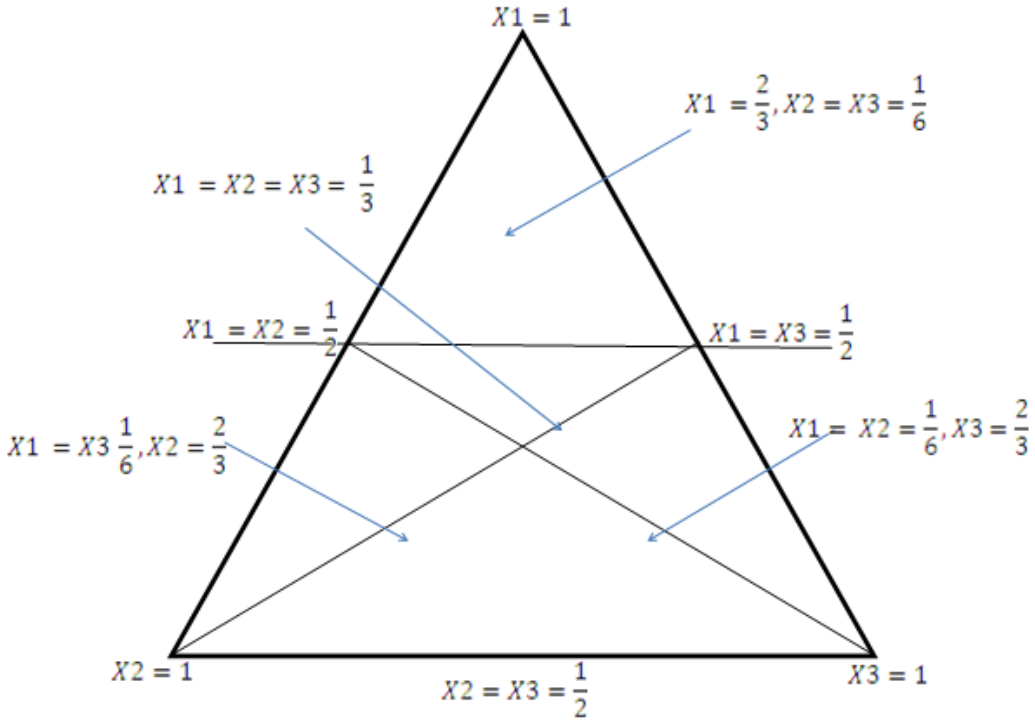


Figura 2**.** Diseño de mezclas simplex reticular aumentado.

Fuente: (Montgomery, 2003)

2.1.2 Desarrollo de mezclas antimicrobianas a partir de ácidos orgánicos

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las diferentes mezclas de ácido cítrico, ácido láctico y ácido acético se desarrolló un diseño experimental de mezclas simplex aumentado.

Para el desarrollo de estas mezclas, se realizaron 10 experimentos con tres repeticiones cada uno, con un total de 30 experimentos. Para obtener la respuesta experimental con el fin de determinar la mejor mezcla de los productos antimicrobianos se realizaron pruebas in vitro y pruebas in vivo en hojas de lechuga inoculadas con *Escherichia coli* (ATCC 10536), Salmonella Enteriditis (ATCC 13076) *y Listeria monocytogenes* (ATCC 15313). Como respuesta experimental se evaluó el crecimiento de las bacterias mencionadas al estar en contacto con las diferentes mezclas. El desarrollo de este diseño experimental, permitió seleccionar la mejor mezcla por su potencial antimicrobiano.

Tabla 1**:** Diseño de Mezclas Simplex Aumentado

	COMPONENTES DE LA MEZCLA		
EXPERIMENTO	**ACIDO CITRICO**	**ACIDO LACTICO**	**ACIDO ACETICO**
1	100%	0%	0%
2	0%	100%	0%
3	0%	0%	100%
4	50%	50%	0%
5	50%	0%	50%
6	0%	50%	50%
7	33.33%	33.33%	33.33%
8	16.67%	16.67%	66.67%
9	16.67%	66.67%	16.67%
10	66.67%	16.67%	16.67%

Fuente: Autora

En la tabla 1, se observa la concentración porcentual de cada ácido tanto al 1% y al 2%.

Las soluciones de los ácidos orgánicos fueron realizadas de la siguiente forma:

Solución de Ácido Láctico al 1%

1 ml de ácido láctico / 100 ml de agua destilada estéril.

Solución de Ácido Láctico al 2%

2 ml de ácido láctico / 100 ml de agua destilada estéril.

Solución de Ácido Cítrico al 1%

1 g de ácido cítrico / 100 ml de agua destilada estéril.

Solución de Ácido Cítrico al 2%

2 g de ácido cítrico / 100 ml de agua destilada estéril.

Solución de Ácido Acético al 1%

1 ml de ácido acético / 100 ml de agua destilada estéril.

Solución de Ácido Acético al 2%

2 ml de ácido acético / 100 ml de agua destilada estéril.

2.1.3. Preparación de las mezclas antimicrobianas

2.1.3.1 Materiales

- 3 Frascos ambar de 500 ml
- 7 Balones de aforo de 100 ml
- Pipetas serológicas de 50 ml y 10 ml
- Pipetas volumétricas de 10 ml y 25 ml
- Guantes

2.1.3.2 Reactivos

- Acido Cítrico 100%
- Acido acético 100%
- Acido láctico 85%
- Agua destilada

2.1.3.3 Procedimiento

Se procedió a diluir por separado el ácido cítrico, ácido láctico y ácido acético a dos concentraciones de 1% y 2% (v/v) con agua destilada y se aforo a 500 ml de solución. Luego se procedió a realizar las diferentes mezclas en las concentraciones de cada solución de acuerdo al diseño de mezclas (Tabla 1).

2.2. Pruebas in vitro

Las pruebas in vitro se desarrollaron a partir de cultivos puros de *Escherichia coli*, Salmonella Enteriditis, y *Listeria monocytogenes*, proporcionados por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Azuay, se sembraron por separado las mismas sobre agar Mueller Hinton marca Merck (Darmstadt, Alemania), para luego aplicar las mezclas de ácidos y así se pudo evaluar las mezclas que mejores resultados de inhibición tuvieron.

2.2.1 Equipos

- Cabina de flujo laminar
- Incubadora MEMMBERT
- Balanza electrónica
- Autoclave

2.2.2 Materiales

- 90 cajas petri
- 30 puntas de plástico para pipeta automática 1 ml
- Hisopos estériles de algodón
- 3 pipetas pasteur estériles
- Vaso de precipitación de 500 ml
- Guantes

2.2.3 Reactivos

- Cultivo de *Escherichia coli*, provisto por el Laboratorio de Microbiología (UDA).
- Cultivo de Salmonella Enteriditis, provisto por el Laboratorio de Microbiología (UDA).
- Cultivo de *Listeria monocytogenes*, provisto por el Laboratorio de Microbiología (UDA).
- Agar Mueller Hinton marca Merck (Darmstadt, Alemania).

2.2.4 Procedimiento

Para las pruebas in vitro se utilizaron cultivos puros de tres bacterias *Escherichia coli,* Salmonella Enteriditis, y *Listeria monocytogenes,* del laboratorio de microbiología de la Universidad del Azuay.

Una vez preparadas las cajas petri con agar Mueller Hinton marca Merck (Darmstadt, Alemania), se procedió a realizar con las pipetas pasteur orificios sobre el agar en los mismos que se colocarían las diferentes mezclas de ácidos antes preparadas, se realizaron cinco orificios por cada caja petri cada orificio de aproximadamente 5 mm.

Luego de esto se sembró por la técnica de césped cada bacteria en diferentes cajas con Mueller Hinton marca Merck (Darmstadt, Alemania), y se procedió a colocar cada mezcla en el orificio correspondiente, los experimentos se realizaron por triplicado.

Se incubó por 24 horas a 36°C ± 1ºC, los resultados se evaluaron midiendo el diámetro del halo de inhibición que una vez transcurrido el tiempo de inoculación se pudo observar, en estas pruebas se consideraron efectivas las mezclas cuyos halos se acercaron o superaron los 10mm.

Este procedimiento se efectuó por separado con la mezcla de ácidos a las concentraciones antes mencionadas es decir al 1% y 2% respectivamente.

Los resultados de estas pruebas in vitro nos permitieron escoger las mezclas que mejor resultado de inhibición tuvieron, tomando en consideración ambas concentraciones.

2.3 Pruebas in vivo

Para las pruebas in vivo se preparo con anticipación los inóculos de las bacterias a utilizar, las cepas de *Escherichia coli,* Salmonella Enteriditis, y *Listeria monocytogenes,* fueron incubadas a 36°C ± 1ºC durante 24 horas, posteriormente se realizó la transferencia de las mismas a una solución salina hasta obtener la dilución deseada $1x10^3$ UFC / ml, y las mismas se inocularon por separado directamente a las hojas de lechuga, en estas pruebas además se tomaron en consideración diferentes tiempos de acción para las tres mezclas elegidas los tiempos de acción que se consideraron fueron: 0 min, 3 min, 5 min, y 7 min.

2.3.1 Equipos

- Cabina de flujo laminar
- Incubadora MEMMBERT
- Balanza electrónica
- Autoclave

2.3.2 Materiales

- 80 frascos de vidrio con 90 ml de agua de peptona
- 200 cajas petri
- 200 puntas de plástico estériles para pipeta automática 1 ml
- 50 puntas de plástico estériles para pipeta automática 0,5 ml
- 350 tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona
- 6 tubos de ensayo con 10 ml de solución de cloruro de sodio al 0.9%
- Hisopos estériles de algodón
- Varilla de vidrio
- Vaso de precipitación de 1000 ml
- Pinzas
- 72 frascos estériles con 50 ml caldo lethen
- 78 bandejas estériles de plástico
- Guantes

2.3.3 Reactivos

- Cultivo de *Escherichia coli* (ATCC 10536), provisto por el Laboratorio de Microbiología (UDA).
- Cultivo de Salmonella Enteriditis (ATCC 13076), provisto por el Laboratorio de Microbiología (UDA).
- Cultivo de *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), provisto por el Laboratorio de Microbiología (UDA).
- Mezclas de las sustancias de estudio (Ácidos Orgánicos)
- Cortes de hojas de lechuga de 5 x 5 cm

- Agar PCA (Estándar Methods Agar), marca Acumedia, Neogen (Lansing, Michigan)
- Agua de peptona
- Concentrado de carne
- Lecitina de soya
- Solución de cloruro de sodio al 0.9 %
- Agua destilada
- Alcohol

2.3.4 Procedimiento

Para las pruebas in vivo se utilizaron diluciones de cultivos puros de tres bacterias *Escherichia coli* (ATCC 10536), Salmonella Enteriditis (ACTT 13076), y *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), del laboratorio de microbiología de la Universidad del Azuay.

A partir de los inóculos obtenidos (10^3 UFC/ml) de cada uno de los patógenos se inoculó cada uno y por separado, directamente en la superficie de los trozos de hoja de lechuga por el método de gota o in situ, utilizando una pipeta.

Se tomaron series de 10 gramos de hojas de lechuga (aproximadamente 7 pedazos de 5 x 5 cm), a cada pedazo se le inoculó una cantidad de 50 µml de la suspensión del patógeno, como control positivo se aplicó el mismo procedimiento de inoculación a una serie de 10 gramos de lechuga que no tuvieron ningún tratamiento con ninguna de las mezclas antes mencionadas.

Para permitir la adhesión de los patógenos a la superficie de las hoja de la lechuga, las hojas inoculadas se colocaron en bandejas de plástico estéril y se dejaron secar en la cámara de flujo laminar a temperatura ambiente (20°C ± 1ºC) durante dos horas antes del tratamiento con las mezclas Nº 5, N° 9 y N° 10 respectivamente, la razón por la que se utilizan estas mezclas se explica en el capítulo de resultados.

Como neutralizante del desinfectante se utilizó caldo letheen (peptona 10 g, concentrado de carne 5 g, lecitina de soya 0.7 g, cloruro de sodio 5 g ,1000 ml de agua destilada estéril) antes de realizar las diluciones correspondientes, para realizar las siembras y determinar la efectividad del tratamiento antimicrobiano.

Transcurrido el tiempo de secado, la muestra de lechugas correspondientes al control positivo se colocó en un frasco con agua de peptona estéril y se dejó macerar durante dos minutos. Para determinar la población inicial de cada patógeno a partir del homogenizado de lechuga obtenido, se procedió a sembrar por duplicado en superficie de placas de agar PCA (Estándar Methods Agar) marca Acumedia Neogen,(Lansing, Michigan) , las placas se incubaron a 37^{o} C x 24 horas, en el caso de *Salmonella* se incubaron a 37^{o} C x 48 horas, adicionalmente a partir del homogenizado se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona estéril al 0.1% hasta 10^{-5}, se sembró por duplicado utilizando agar PCA (Estándar Methods Agar) marca Acumedia Neogen,(Lansing, Michigan), se evaluó presencia – ausencia) y se incubó a 37^{o} C/ 48 horas.

Para la evaluación del desempeño de las tres mezclas a utilizar se consideraron cuatro tiempos de contacto del desinfectante: 0 min, 3 min, 5 min y 7 minutos.

2.4 Pruebas en hojas de lechuga sin inoculo.

Para esta prueba se determinó antes la carga bacteriana propia de la lechuga adquirida en el mercado municipal de la ciudad de Cuenca, una vez obtenido el resultado se aplicaron las mezclas de ácidos N° 5, N° 9 y N° 10 durante los tiempos

de exposición antes mencionados 0 min, 3 min,5 min y 7 minutos a las hojas de lechuga sin inoculo.

2.4.1 Equipos

- Cabina de flujo laminar
- Balanza electrónica
- Autoclave

2.4.2 Materiales

- 75 Placas Compact Dry TC NISSUI pharma® (Jappan) para Bacterias totales.
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona
- Pinza
- Vaso de precipitación 1000ml
- Probeta 1000ml
- Varilla de vidrio
- Guantes
- Pipeta Automática
- Puntas estériles 1ml
-

2.4.3 Reactivos

- Mezclas de las sustancias de estudio (Ácidos Orgánicos)
- Cortes de hojas de lechuga de 5 x 5 cm
- Agua potable
- Agua de peptona
- Caldo Letheen

2.4.4 Procedimiento

Para esta prueba se determinó previamente la carga microbiana presente en las hojas de la lechuga sin inocular en ellas ninguna bacteria. Se llevó 10 g de hojas de lechuga a 90 ml de agua de peptona estéril y se maceró durante dos minutos, luego se procedió a realizar la siembra sobre placas Compact Dry TC NISSUI pharma® (Jappan),para bacterias totales, se dejó incubar a 37º C x 24 horas.

Posteriormente se pesó 10 g de hojas de lechuga y se colocó en la mezcla Nº5, durante los tiempos de desinfección establecidos (0 min, 3 min, 5 min y 7 min), este mismo proceso se realizó para las mezclas Nº 9 y Nº 10.Luego de la aplicación de la mezcla de ácidos se procedió a realizar diluciones seriadas hasta 10^{-6} en tubos con 9 ml de agua de peptona estéril para realizar la siembras correspondientes sobre placas Compact Dry TC NISSUI pharma® (Jappan).Y las siembras se dejaron incubar a 37º C x 24 horas.

2.5 Análisis Organoléptico.

Para esta prueba previamente se preparó la mezcla que mejor resultados de inhibición obtuvo durante las pruebas in vivo. Se lavó durante 5 minutos las hojas de lechuga con agua potable y se procedió a colocar en la mezcla desinfectante, se evaluaron los cuatro tiempos de exposición que se tomaron en consideración, ya que en los cuatro tiempos se consiguió desinfección bacteriana. Se llevaron a cabo pruebas afectivas de aceptación- rechazo en total 120 pruebas, 30 pruebas para cada tiempo de desinfección establecido (0 min, 3 min, 5 min y 7 min).

2.5.1 Pruebas Afectivas

Son aquellas en las cuales el juez expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o le disgusta, si lo acepta o lo rechaza, o si lo prefiere a otro (Larmond, 1997). Para las pruebas afectivas es necesario contar con un mínimo de 30 jueces no entrenados. Las pruebas afectivas pueden clasificarse en tres tipos: pruebas de preferencia, pruebas de grado de satisfacción y pruebas de aceptación.

2.5.2 Prueba de aceptación

El que un alimento le guste o no a alguien no quiere decir que esa persona vaya a querer comprarlo. El deseo de una persona para adquirir un producto es lo que se llama aceptación, y no solo depende de la impresión agradable o desagradable que el juez reciba al probar un alimento sino también de aspectos culturales, socioeconómicos, de hábitos, etc. Sin embargo, el término "prueba de aceptación" es utilizado incorrectamente con mucha frecuencia para referirse a las pruebas de preferencia o a las de grado de satisfacción. Las tres pruebas son afectivas, pero la prueba de aceptación puede abarcar a una de las otras dos (Amerine y col., 1965; Anzaldua-Morales y col., 1983).

Generalmente en la industria alimentaria se investiga si el producto es agradable o no, o si es preferible a otro. Para este estudio se realizaron las pruebas afectivas con los 30 panelistas, como se describió anteriormente. En la ficha de prueba (Anexo 14), se midió en las lechugas expuestas al tratamiento en diferentes tiempos de exposición, lo siguiente: aspecto, textura, sabor y agrado general en una escala del 1 a 5, en la 1 es malo y 5 excelente.

Los jueces debían escoger la puntuación que ellos creían adecuada según su percepción.

CAPITULO III

RESULTADOS

Introducción

En el siguiente capítulo se describirán los resultados obtenidos en la determinación de la carga microbiana de hojas de lechuga, la evaluación de la reducción de la carga microbiana inoculada de *Escherichia coli*, Salmonella Enteriditis y *Listeria monocytogenes*, en las hojas de lechuga posteriormente tratadas con las mezclas optimas de los ácidos orgánicos obtenidas mediante un diseño experimental de mezclas y la aceptación del aspecto de las hojas de lechuga una vez que se aplica la mezcla de ácidos que obtuvo el mejor resultado como inhibidor antimicrobiano.

3.1 Diseño de mezclas pruebas in vitro.

Se realizaron pruebas in vitro para determinar la mejor capacidad de inhibición bacteriana de las diferentes mezclas, para escoger las mezclas óptimas se midieron los halos de inhibición que obtuvieron cada una, frente a los tres diferentes microorganismos bacterianos inoculados (*Escherichia coli*, Salmonella Enteriditis y *Listeria monocytogenes*).

Las mezclas de ácidos en las pruebas in vitro se aplicaron a dos diferentes concentraciones 1% y 2%, con el fin de observar si existían variaciones considerables de reducción microbiana que dependieran de la concentración de los ácidos involucrados.

3.1.2 Halos de desinfección diseño experimental concentración 1% y 2% respectivamente, frente a *Escherichia coli.*

Tabla 2.Halos de desinfección obtenidos con *Escherichia coli*.

Escherichia coli **Concentración 1% de los ácidos orgánicos.**			**Concentración 2% de los ácidos orgánicos.**		
EXP.	**HALO**	**p H**	**EXP.**	**HALO**	**p H**
1	9mm	3.43	1	11mm	3.28
2	9mm	3.52	2	9mm	3.35
3	14mm	3.86	3	17mm	3.71
4	11mm	3.51	4	10mm	3.43
5	12mm	3.60	5	11mm	3.50
6	8mm	3.61	6	10mm	3.51
7	8mm	3.55	7	9mm	3.49
8	9mm	3.63	8	8mm	3.53
9	10mm	3.54	9	13mm	3.51
10	10mm	3.51	10	13mm	3.52

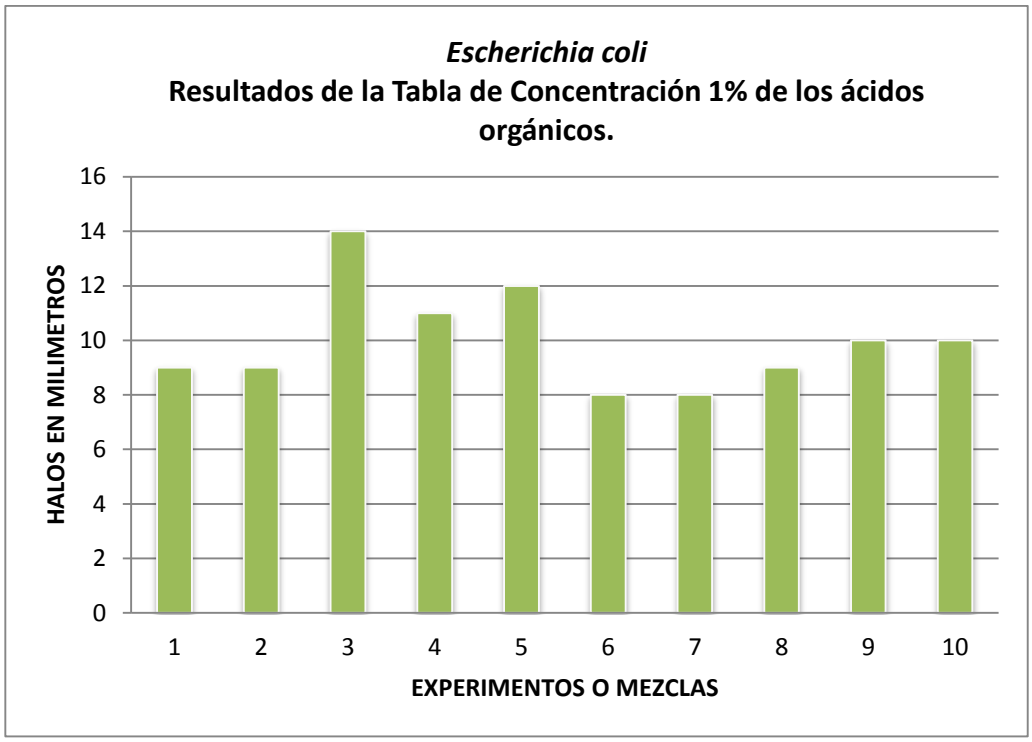


Figura 3**.** Halos de desinfección en mm obtenidos con una concentración del 1% de los ácidos orgánicos frentea *Escherichiacoli.*

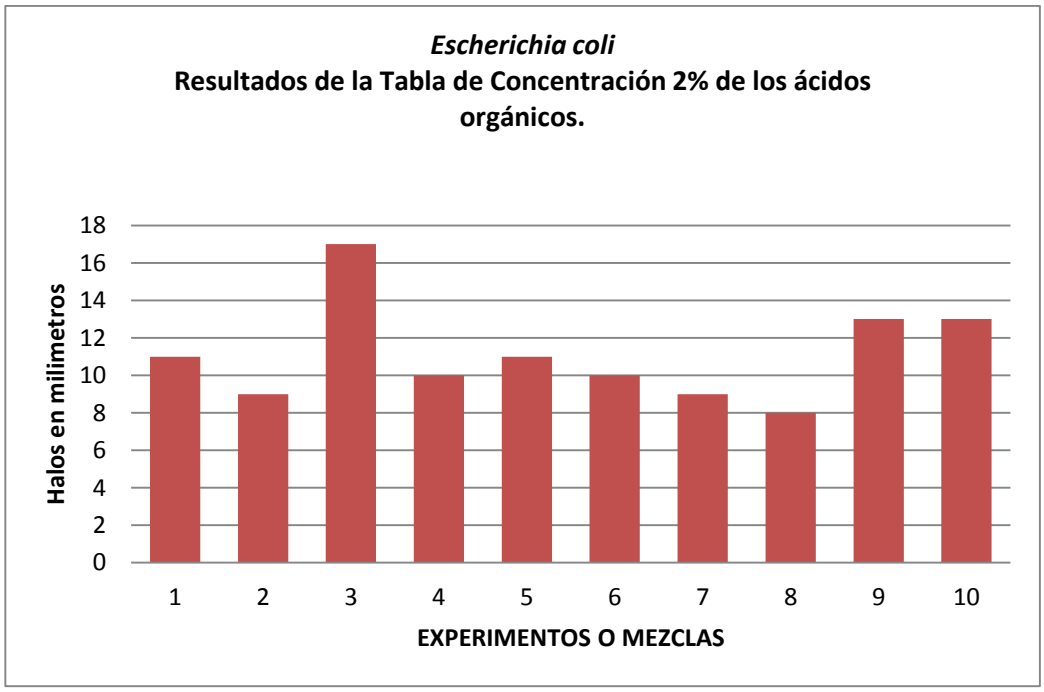


Figura 4**.** Halos de desinfección en mm obtenidos con una concentración del 2% de los ácidos orgánicos frente a *Escherichia coli.*

En la tabla 2, se observan los halos de inhibición expresados en milímetros, obtenidos con la aplicación de las diferentes mezclas de ácidos sobre *Escherichia coli*, se consideran aceptables los halos cuyo diámetro corresponde a un valor de 10mm en adelante, cabe destacar que se obtienen iguales resultados o valores de diámetro altos en las tres mezclas N° 5, N° 9 y N° 10, tanto en las mezclas cuya concentración es del 1% como en las mezclas cuya concentración es del 2%. (Figura 3 y Figura 4). Los experimentos del 1 al 10 están de acuerdo a la Tabla 1, en donde se explica el porcentaje de cada componente (ácidos orgánicos) del diseño de mezclas simplex aumentado.

3.1.3 Halos de desinfección diseño experimental concentración 1% y 2% respectivamente, frente a Salmonella Enteriditis.

Tabla 3**.** Halos de desinfección obtenidos con Salmonella Enteriditis.

Salmonella Enteriditis Concentración 1% de ácidos orgánicos.			**Salmonella Enteriditis Concentración 2% de los ácidos orgánicos.**		
EXP.	**HALO**	**p H**	**EXP.**	**HALO**	**p H**
1	8mm	3.43	1	9mm	3.28
2	9mm	3.52	2	12mm	3.35
3	10mm	3.86	3	11mm	3.71
4	8mm	3.51	4	9mm	3.43
5	9mm	3.60	5	11mm	3.50
6	9mm	3.61	6	9mm	3.51
7	9mm	3.55	7	8mm	3.49
8	9mm	3.63	8	8mm	3.53
9	10mm	3.54	9	10mm	3.51
10	10mm	3.51	10	11mm	3.52

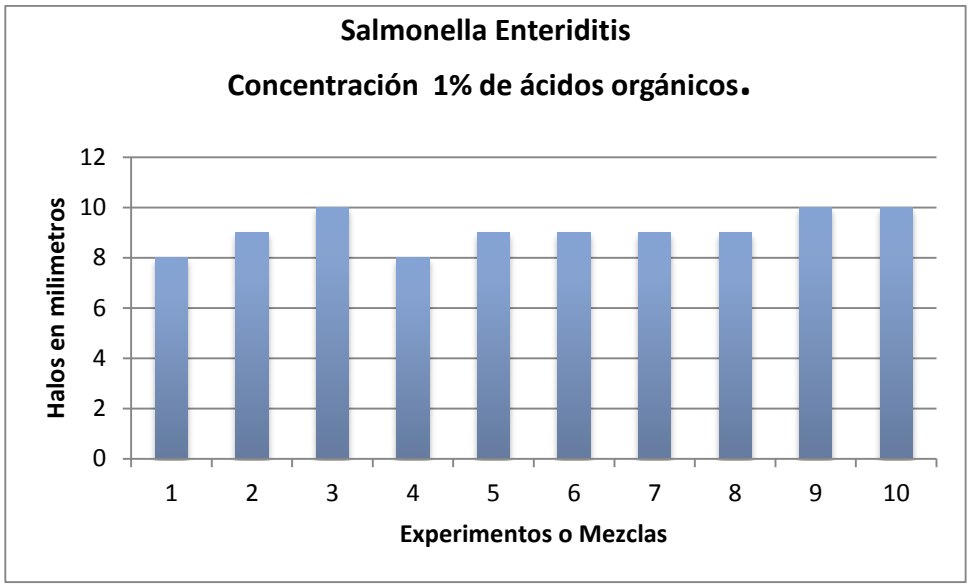


Figura 5.Halos de desinfección en mm obtenidos con una concentración del 1% de los ácidos orgánicos, frente a Salmonella Enteriditis.

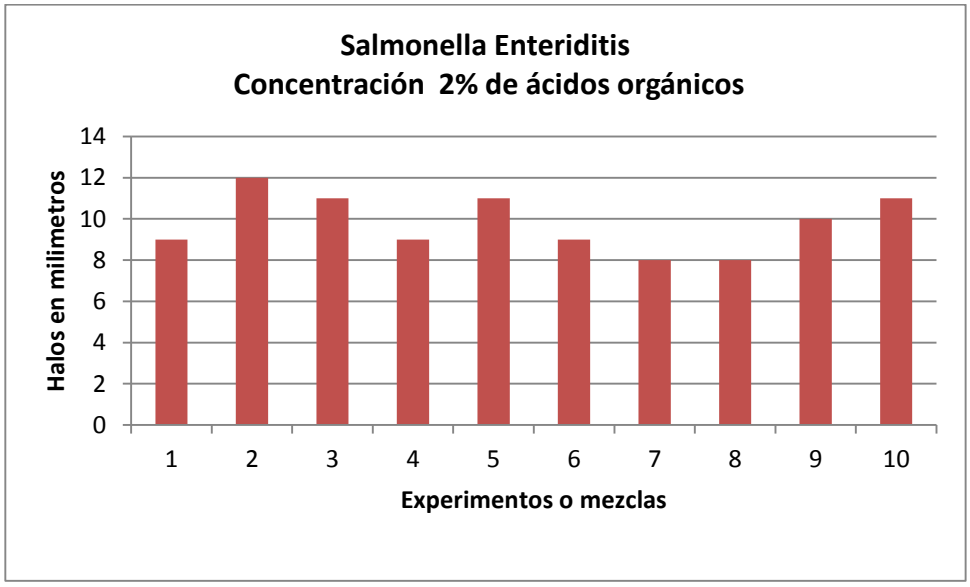


Figura 6.Halos de desinfección en mm obtenidos con una concentración del 2% de los ácidos orgánicos, frente a Salmonella Enteriditis

En la tabla 3, se observan los halos de desinfección obtenidos con la aplicación de las diferentes mezclas de ácidos sobre Salmonella Enteriditis, se consideran

aceptables los halos cuya diámetro corresponde a un valor de 9 mm en adelante, se obtienen iguales resultados o valores de diámetro altos en las tres mezclas N° 5, N°9 y N°10, tanto en las mezclas cuya concentración es del 1% como en las mezclas cuya concentración es del 2%, (Figura 5 y Figura 6), se puede observar también que los valores de pH en las diferentes concentraciones no presentan variaciones considerables.

3.1.4 Halos de desinfección diseño experimental concentración 1% y 2% respectivamente, frente a *Listeria monocytogenes.*

Tabla 4.Halos de desinfección obtenidos con *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes **Concentración 1% de los ácidos orgánicos.**			***Listeria monocytogenes*** **Concentración 2% de los ácidos orgánicos.**		
EXP.	**HALO**	**p H**	**EXP.**	**HALO**	**p H**
1	11mm	3.43	1	14mm	3.28
2	9mm	3.52	2	13mm	3.35
3	11mm	3.86	3	13mm	3.71
4	12mm	3.51	4	9mm	3.43
5	11mm	3.60	5	13mm	3.50
6	10mm	3.61	6	13mm	3.51
7	9mm	3.55	7	13mm	3.49
8	9mm	3.63	8	13mm	3.53
9	12mm	3.54	9	15mm	3.51
10	11mm	3.51	10	16mm	3.52

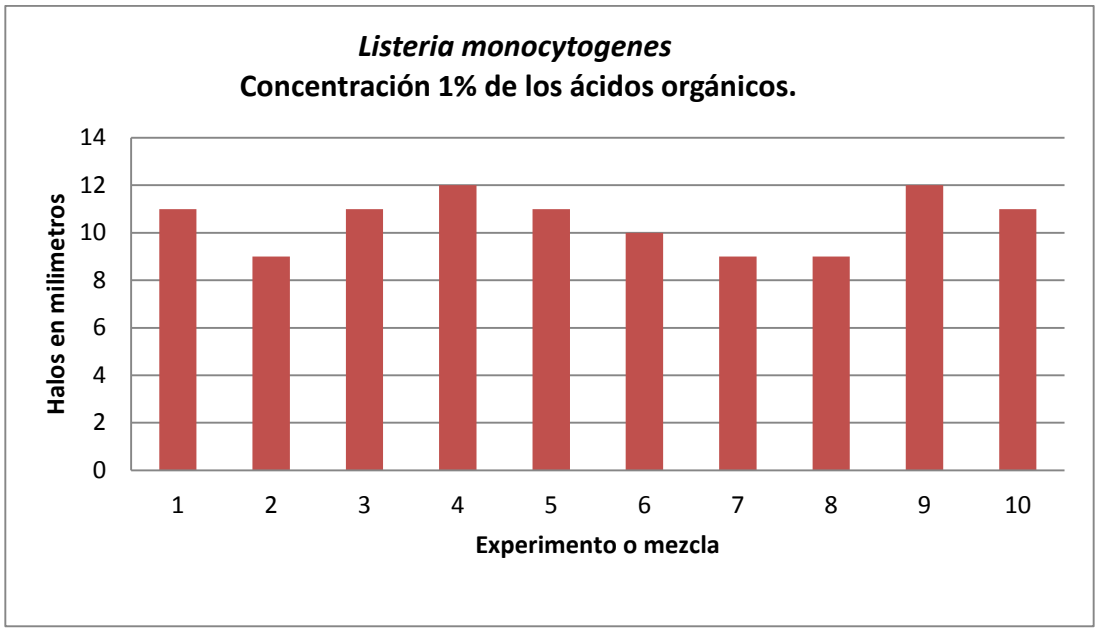


Figura 7**.** Halos de desinfección en mm obtenidos con una concentración del 1% de los ácidos orgánicos, frente a *Listeria monocytogenes*.

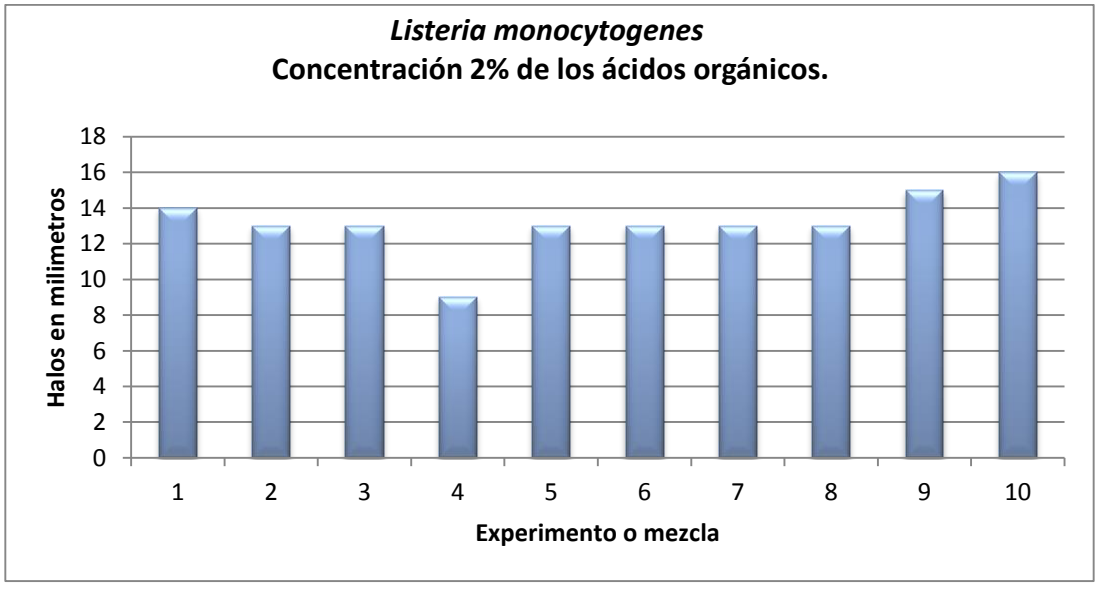


Figura 8.Halos de desinfección en mm obtenidos con una concentración del 2% de los ácidos orgánicos, frente a *Listeria monocytogenes*.

En la tabla 8, se observan los halos de inhibición obtenidos con la aplicación de las diferentes mezclas de ácidos sobre *Listeria monocytogenes*, se consideran aceptables los halos cuya diámetro corresponde a un valor de 11 mm en adelante, se obtienen iguales resultados o valores de diámetro altos en las tres mezclas N° 5,N° 9 y N° 10, tanto en las mezclas cuya concentración es del 1% como en las mezclas cuya concentración es del 2% (Figura 7 y Figura 8), se puede observar particularmente en este microorganismo una inhibición bacteriana bastante elevada. Según los resultados obtenidos se determina entonces a los experimentos N° 5, N°9 y N°10, que son las mezclas binarias y ternarias de los ácidos, como las que mayor capacidad de inhibición poseen frente a los microorganismos patógenos del presente estudio, las mismas serán las aplicadas en las pruebas in vivo.

3.2 Determinación de la carga microbiana de las hojas de lechuga.

Se analizó la carga microbiana inicial en las hojas de lechuga, las mismas que fueron adquiridas en el mercado municipal de la ciudad de Cuenca. Conjuntamente con la determinación de la carga microbiana inicial, se analizó la reducción de la misma aplicando la desinfección con la mezcla de ácidos orgánicos que mejor resultado obtuvo durante el diseño experimental y tomando en consideración los tiempos de exposición durante las pruebas in vivo.

3.2.1 Determinación de la carga microbiana inicial.

Se realizó un recuento de bacterias totales, consideradas como la carga microbiana inicial.

Tabla 5. Carga microbiana inicial presente en lechuga.

BACTERIAS TOTALES	**Log (UFC)**
	5,9

En la tabla 5, se muestra el valor obtenido una vez realizada la determinación de la carga microbiana inicial en lechugas frescas.

3.2.2 Determinación de la reducción de la carga microbiana inicial.

Se determinó la reducción de la carga microbiana inicial, una vez aplicadas las mezclas desinfectantes que mejores resultados obtuvieron durante el diseño experimental de mezclas (N°5, N°9 y N°10), con los diferentes tiempos de exposición para cada una, se evaluó el porcentaje de desinfección bacteriana según la reducción de colonias expresada logarítmicamente en donde la disminución de 1, 2 o 3 unidades logarítmicas de la población representa una reducción del 90%, 99% y 99,9% respectivamente, de la concentración bacteriana. (Klesper et al., 1996).

Tabla 6.Disminución logarítmica de la carga microbiana inicial.

REDUCCION CARGA MICROBIANA INICIAL						
TIEMPO	**EXP. 5**	**% DESINFECCION**	**EXP. 9**	**% DESINFECCION**	**EXP.10**	**% DESINFECCION**
0	2,36	99.9%	1,3	>100%	0	>100%
3	0	>100%	0	>100%	0	>100%
5	0	>100%	0	>100%	0	>100%
7	0	>100%	0	>100%	0	>100%

En la tabla 6, se aprecia la disminución logarítmica del número de colonias, una vez aplicada la mezcla de desinfección N °5, se obtiene ya una considerable reducción microbiana de 3.54 log o 99,9 % , a partir del tiempo de exposición de desinfección menor o tiempo 0 min.

En la disminución logarítmica del número de colonias, una vez aplicada la mezcla N° 9, a diferentes tiempos de desinfección, se observa una reducción bacteriana que corresponde a una disminución de 4,6 log o 99.99% prácticamente la desinfección completa de carga microbiana. La aplicación de la mezcla N° 10 obtiene los mejores resultados con la desinfección bacteriana equivalente al 100%.

3.3Evaluación de la reducción de la carga microbiana de *Escherichia coli,* Salmonella Enteriditis y *Listeria monocytogenes,* en hojas de lechuga inoculadas.

Mediante los resultados obtenidos en las pruebas in vitro se determinaron las mezclas N°5, N°9 y N°10, como las que mayor capacidad de desinfección poseen, se aplicaron en las pruebas in vivo en hojas de lechuga, a las cuales previamente se les inocularon los microorganismos involucrados en el presente estudio, se tomó en consideración diferentes tiempos de acción para evaluar el potencial desinfectante de las mismas 0 min, 3 min, 5 min y 7 min.

En estas pruebas se utilizó una concentración de los ácidos correspondiente al 1.5 %, esto debido a que no existía mayor variación de los valores de p H y los halos de inhibición, y con el afán de que una vez determinada la mezcla optima, al ser aplicada en las pruebas organolépticas la misma no sea muy ácida.

Tabla 7.Control positivo inoculación de *Escherichia coli.*

CONTROL POSITIVO	**Log (UFC)**
Escherichia coli	**6,9**

En la tabla 7, se aprecia la cantidad inicial de colonias expresadas en log (UFC) que se inocularon en las hojas de lechuga para las pruebas in vivo.

Tabla 8.Disminución Log (UFC), durante los diferentes tiempos de exposición a los experimentos o mezclas N° 5, N° 9 y N°10.

Patógeno: Escherichia coli						
TIEMPO	**EXP. 5**	**% INHIBICION**	**EXP. 9**	**% INHIBICION**	**EXP.10**	**% INHIBICION**
0	6,2	0%	5,69	90%	4,58	99.9%
3	4,34	99%	4,85	99%	3,23	99.9%
5	4	99.9%	3,83	99.9%	2,45	>100%
7	2,32	>100%	2,48	>100%	2,18	>100%

En la tabla 8, se aprecian los resultados de desinfección expresados en porcentajes, en los diferentes tiempos de exposición de desinfección. El porcentaje de desinfección desde el experimento N° 5, en el tiempo de desinfección intermedio (3 min) ya supera el 99% de desinfección, en el experimento N° 9 los resultados, incluso son mejores desde el tiempo de exposición cero, se obtienen valores similares para el tiempo intermedio de exposición en los experimentos N° 5 y N° 9, en donde el porcentaje de desinfección es mayor al 99%, sin embargo como se observa en los resultados del experimento o mezcla N°10, los resultados de desinfección bacteriana superan el 99.9% desde el tiempo de exposición mínimo o tiempo cero , para el tiempo de exposición intermedio (3 min) la inhibición ya estuvo por encima del 100%.

Los experimentos o mezclas que mejor resultados tienen sobre esta bacteria son las mezclas ternarias de ácidos orgánicos es decir los experimentos N °9 y N° 10.

Tabla 9.Control positivo inoculación Salmonella Enteriditis.

CONTROL POSITIVO	**Log (UFC)**
Salmonella Enteriditis	**6,6**

En la tabla 9, se aprecia la cantidad inicial de colonias de Salmonella Enteriditis expresadas en log (UFC) que se inocularon en las hojas de lechuga para las pruebas in vivo.

Tabla 10.Disminución Log (UFC), durante los diferentes tiempos de exposición a los experimentos N° 5, N° 9 y N°10.

Patógeno: **Salmonella Enteriditis**						
TIEMPO	**EXP. 5**	**% INHIBICION**	**EXP. 9**	**% INHIBICION**	**EXP.10**	**% INHIBICION**
0	3,72	>99%	2,41	>100%	3,18	>99%
3	2,3	>100%	2	>100%	2,32	>100%
5	2,3	>100%	2	>100%	1,3	>100%
7	2	>100%	1,85	>100%	0	>100%

En la tabla 10, se observa la disminución de colonias expresada logarítmicamente y en los diferentes tiempos de exposición, una vez que se aplican los experimentos mezclas de desinfección. El experimento de desinfección N° 5, obtiene una disminución logarítmica de 3.72 lo que se considera entonces que el mismo logró una desinfección bacteriana sobre el 99.9% de colonias y en el tiempo mínimo de exposición o tiempo cero.

En el tiempo considerado como intermedio (3min), se observa ya una inhibición por encima del 100% de colonias. En el caso de esta bacteria podemos observar que los experimentos N° 9 y N° 10 que corresponden a mezclas ternarias, son las que mejores resultados de desinfección bacteriana poseen, en el experimento N° 9, se puede observar una desinfección completa sobre el 100% de colonias bacterianas desde el tiempo mínimo de exposición al desinfectante, hasta el tiempo máximo (7 min).

Caso similar a la desinfección que tiene sobre la bacteria el experimento N° 10, en el cual se obtiene una disminución bacteriana sobre el 99,9% desde el tiempo de exposición de desinfección cero. El experimento N° 9, que es el que obtuvo los mejores resultados de inhibición sobre esta bacteria, corresponde a una mezcla ternaria de los ácidos en donde se encuentra en mayor volumen el ácido láctico. (Ácido Cítrico 16,67% - Ácido Láctico 66,67% -Ácido Acético 16,67%).

Tabla 11. Control positivo inoculación *Listeria monocytogenes*.

CONTROL POSITIVO	**Log (ufc)**
Listeria monocytogenes	**7**

En la tabla 11, se observa la cantidad inicial de colonias de *Listeria monocytogenes*, expresadas en log (UFC) que se inocularon en las hojas de lechuga para las pruebas in vivo. A partir de este valor se realizaron las pruebas de desinfección con las mezclas de ácidos antes mencionadas.

Tabla 12.Disminución Log (UFC), durante los diferentes tiempos de exposición a los experimentos N° 5, N° 9 y N° 10.

Patógeno*: Listeria monocytogenes*						
TIEMPO	**EXP. 5**	**% INHIBICION**	**EXP. 9**	**% INHIBICION**	**EXP.10**	**% INHIBICION**
0	4,45	>99%	5,3	>90%	3,18	>99,9%
3	3,78	>99%	3,32	>99,9%	2,32	>100%
5	3,58	>99%	2,7	>100%	1,3	>100%
7	2,3	>100%	2,6	>100%	0	>100%

La tabla 12, se observan los resultados de la reducción de colonias de *Listeria monocytogenes*, expresados logarítmicamente una vez que se aplican los diferentes experimentos (N° 5, N°9 y N°10) en los tiempos de desinfección antes determinados.

Sobre esta bacteria los resultados de las mezclas binarias como ternarias, tuvieron excelentes resultados, la mezcla N° 5 y N° 9 obtienen una desinfección bacteriana sobre el 99% en el tiempo cero de exposición, y en el tiempo intermedio las tres superan el 99.9%, en el caso de la mezcla N° 10 se observa una inhibición completa de colonias desde el tiempo de exposición mínimo (3 min) hasta el tiempo de exposición considerado como máximo (7 min).

Esta mezcla constituida en su mayoría por acido cítrico (66,67%), es la que mejor resultados de desinfección bacteriana obtiene en las bacterias de estudio que fueron inoculadas.

3.4Evaluación organoléptica de las hojas de lechuga.

Mediante el diseño de mezclas y las pruebas in vivo se determinó que la mezcla de ácidos que mejor resultados de desinfección obtuvo fue la mezcla Nº 10**.**

Se evaluó entonces la mezcla en hojas de lechuga fresca para determinar si la misma no altera las características sensoriales y las características físicas de las hojas de lechuga y si no resulta ser muy ácida al paladar. Para esto se realizaron pruebas de degustación, y se consideraron los cuatro tiempos de exposición para la desinfección es decir 0 min, 3 min, 5 min y 7 min.

Las características sensoriales a evaluar fueron las siguientes obteniendo los siguientes resultados:

3.4.1 Pruebas de degustación: Evaluación del aspecto: visual y color, durante diferentes tiempos de exposición a desinfección (0 min, 3 min, 5 min, 7min).

Tabla 13.Evaluación del aspecto: visual y color.

Parámetro Evaluado	**Apreciación**	**TIEMPO (0 min)**	**TIEMPO (3 min)**	**TIEMPO (5 min)**	**TIEMPO (7 min)**
ASPECTO		**Porcentaje**	**Porcentaje**	**Porcentaje**	**Porcentaje**
Visual	**Excelente**	23%	23%	27%	20%
	Muy buena	60%	54%	50%	60%
	Buena	10%	23%	17%	17%
	Regular	7%	0%	6%	3%
	Mala	0%	0%	0%	0%
Color	**Excelente**	17%	27%	23%	17%
	Muy buena	53%	50%	54%	53%
	Buena	20%	10%	13%	23%
	Regular	10%	10%	7%	7%
	Mala	0%	3%	3%	0%

En la tabla 13, se pueden observar los resultados de las pruebas de degustación en donde se evalúa el aspecto de la hoja de lechuga, en los diferentes tiempos de exposición. El aspecto visual obtiene mejores resultados siendo considerado como muy bueno en todos los tiempos de desinfección (Figura 9).

En cuanto al color de la hoja la mejor apreciación calificada como excelente, se obtiene en el tiempo de exposición intermedio o de 3 minutos, con un 27%. (Figura 10).

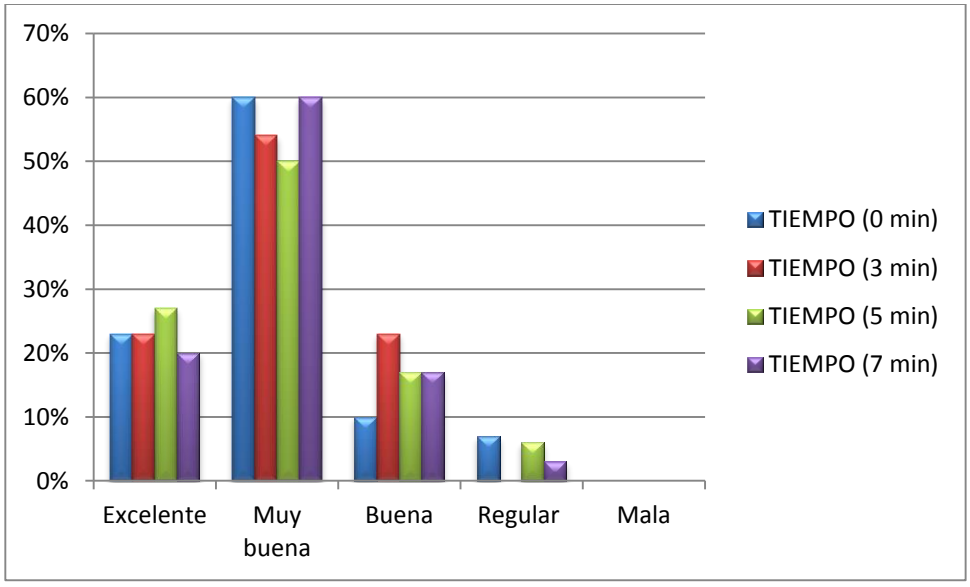


Figura 9. Evaluación del aspecto visual de la hoja de lechuga, frente a los diferentes tiempos de exposición a desinfección 0 min, 3 min, 5 min y 7 min.

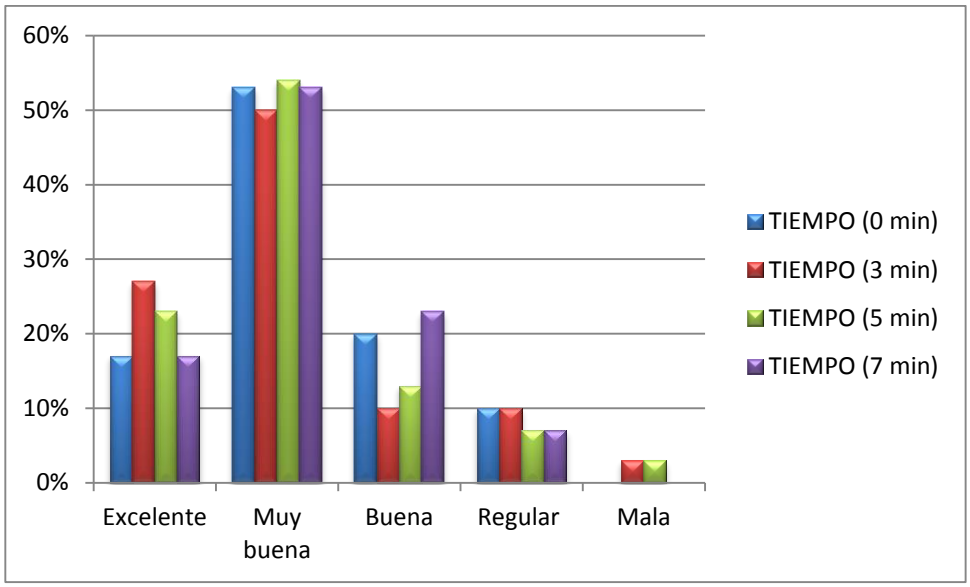


Figura 10.Evaluación del color de la hoja de lechuga, frente a los diferentes tiempos de exposición a desinfección 0 min, 3 min, 5 min y 7 min.

3.4.2 Evaluación de la textura: crujiente suave, dura, durante diferentes tiempos de exposición a desinfección (0 min, 3 min, 5 min, 7min).

Tabla 14.Evaluación de la textura: crujiente, suave, dura**.**

Parámetro Evaluado	**Apreciación**	**TIEMPO (0 min)**	**TIEMPO (3 min)**	**TIEMPO (5 min)**	**TIEMPO (7 min)**
TEXTURA		**Porcentaje**	**Porcentaje**	**Porcentaje**	**Porcentaje**
Crujiente	**Excelente**	40%	20%	17%	32%
	Muy buena	40%	47%	60%	39%
	Buena	20%	30%	13%	23%
	Regular	0%	3%	7%	3%
	Mala	0%	0%	3%	3%
Suave	**Excelente**	17%	7%	3%	3%
	Muy buena	30%	43%	23%	23%
	Buena	20%	20%	37%	37%
	Regular	13%	10%	14%	14%
	Mala	20%	20%	23%	23%
Dura	**Excelente**	20%	10%	13%	13%
	Muy buena	34%	33%	13%	13%
	Buena	23%	27%	40%	40%
	Regular	3%	7%	7%	7%
	Mala	20%	23%	27%	27%

En la tabla 14, se observan los resultados de la evaluación en el parámetro textura de la hoja, una vez aplicada la mezcla desinfectante durante los diferentes tiempos de exposición. Las hojas de lechuga conservan su textura crujiente, cuando el tiempo de exposición a desinfección es el menor posible es decir 0 minutos.(Figura 11).

La característica de suavidad evaluada en las hojas del lechuga (la misma que no se desea), se observa a partir de los tiempos de exposición a desinfección de 5 min y 7 min. (Figura 12).

La evaluación de la dureza de la hoja, la cual tampoco se desea que exista, de igual forma se presenta con mayor incidencia a partir del tiempo de exposición a desinfección de 5 min y 7 min. (Figura 13).

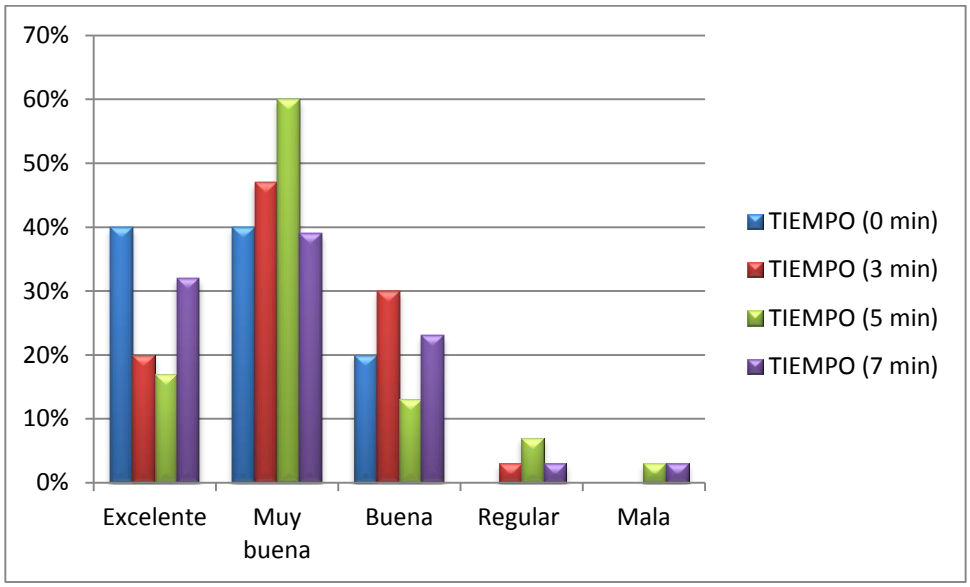


Figura 11. Evaluación de la textura crujiente de la hoja de lechuga, frente a los diferentes tiempos de exposición a desinfección 0 min,3 min,5 min,7min.

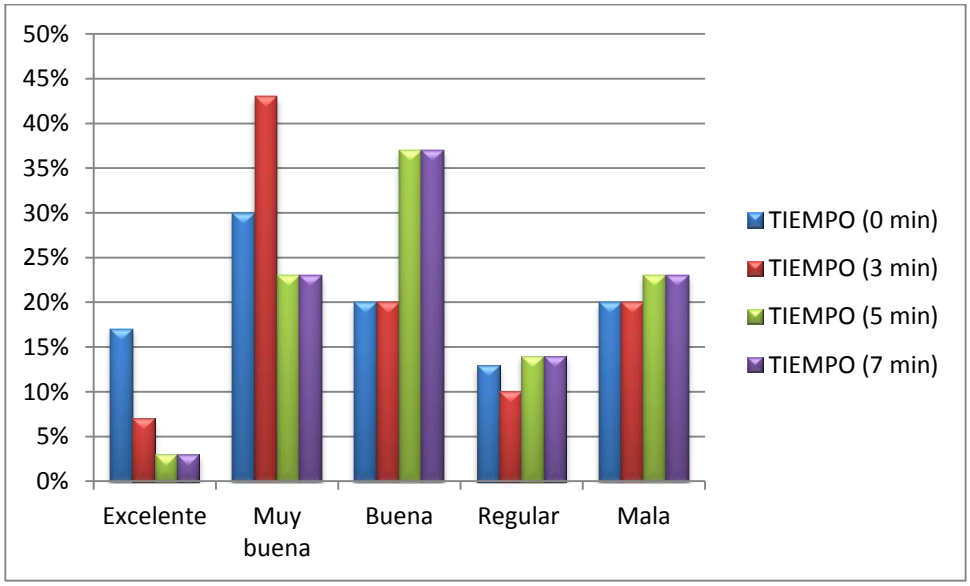


Figura 12. Evaluación de la suavidad de la hoja de lechuga frente a los tiempos de exposición a desinfección (0 min, 3 min, 5 min y 7 min)

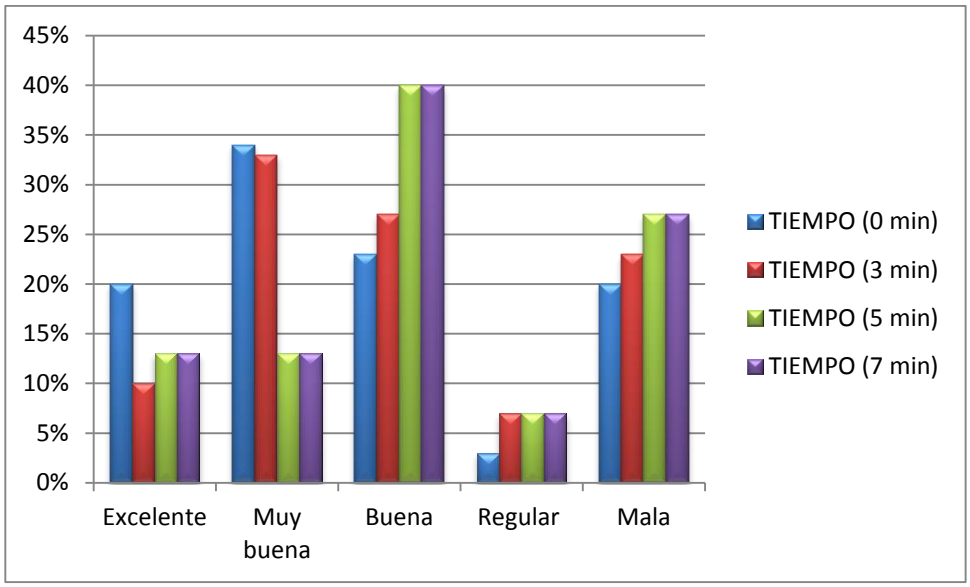


Figura 13.Evaluación de la dureza de la hoja de lechuga frente a los tiempos de exposición a desinfección (0 min, 3 min, 5 min y 7 min).

3.4.3 Evaluación del sabor: ácido y característico, durante diferentes tiempos de exposición a desinfección (0 min, 3 min, 5 min, 7 min).

Tabla 15.Evaluacióndel sabor: ácidos y característico.

Parámetro Evaluado	**Apreciación**	**TIEMPO (0 min)**	**TIEMPO (3 min)**	**TIEMPO (5 min)**	**TIEMPO (7 min)**
SABOR		**Porcentaje**	**Porcentaje**	**Porcentaje**	**Porcentaje**
Acido	**Excelente**	10%	20%	23%	20%
	Muy buena	47%	34%	44%	27%
	Buena	40%	43%	20%	33%
	Regular	3%	3%	13%	17%
	Mala	0%	0%	0%	3%
Característico	**Excelente**	3%	10%	10%	14%
	Muy buena	57%	50%	54%	40%
	Buena	30%	27%	13%	23%
	Regular	3%	13%	13%	20%
	Mala	7%	0%	10%	3%

La tabla 15, indica los resultados obtenidos de la evaluación del sabor que puede producir en la hoja la aplicación de la mezcla desinfectante, en los diferentes tiempos de exposición del mismo. Cabe mencionar que se busca el menor cambio en el sabor de la hoja de lechuga, o caso contrario al producirse un sabor acido el mismo sea tolerable al paladar.

El sabor ácido tolerable que mejor resultados obtiene, es en los tiempos de exposición a desinfección mínimo 0 min, intermedio 3 min y en el de 5 min, en donde se observaron porcentajes excelentes y muy buenos, y no se obtienen porcentajes de evaluación malos. (Figura 14)

En cuanto al sabor característico el mismo no presenta alteración mayor en los tiempos de desinfección mínimo e intermedio. (Figura 15)

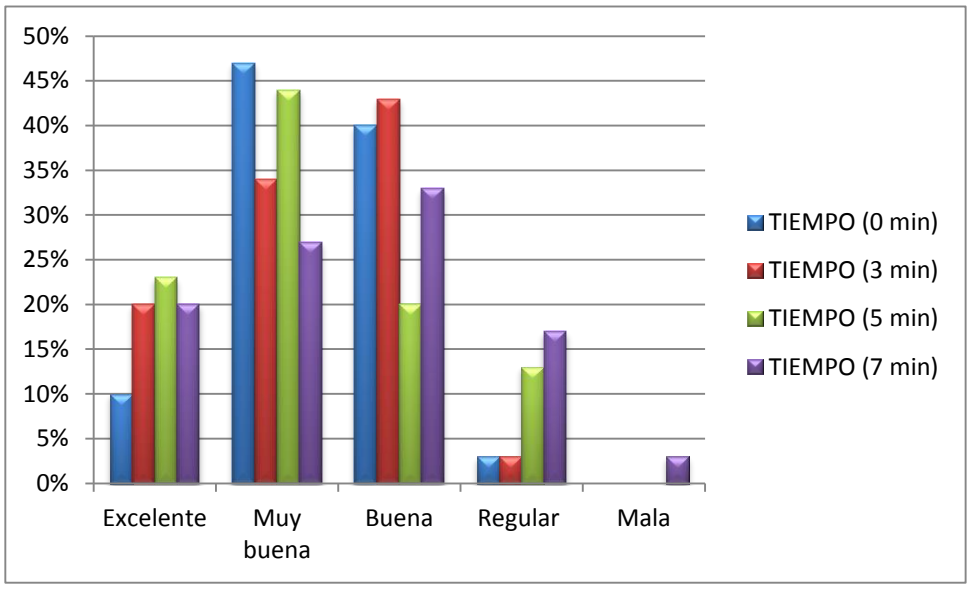


Figura 14.Evaluación del sabor ácido en la hoja de lechuga, frente a los diferentes tiempos de exposición a desinfección (0 min, 3 min, 5 min y 7 min).

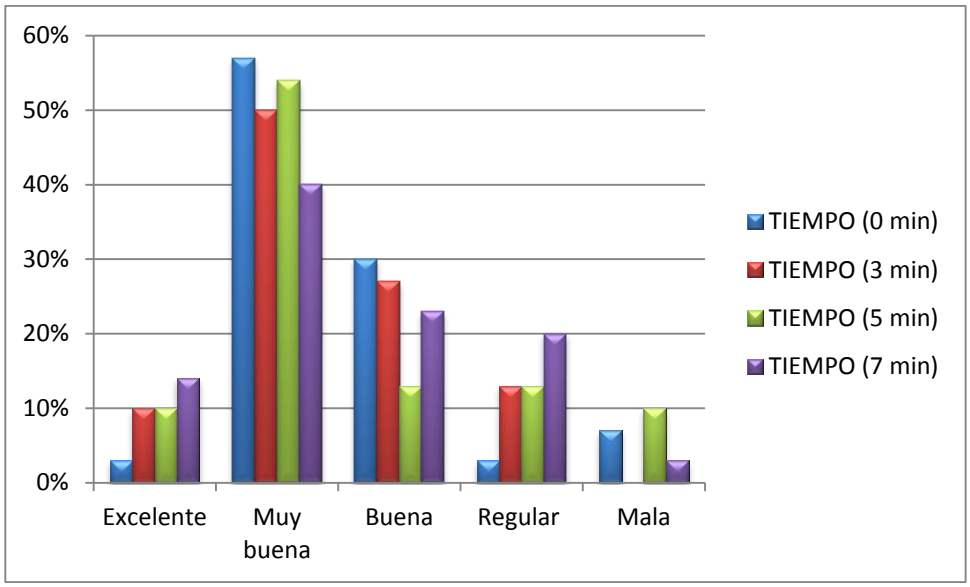


Figura 15**.** Evaluación del sabor característico en la hoja de lechuga, frente a los diferentes tiempos de exposición a desinfección (0 min, 3 min, 5 min y 7 min).

3.4.4 Evaluación del agrado en general, durante los tiempos de exposición a desinfección (0 min, 3 min, 5 min, 7 min).

Tabla 16.Evaluación del agrado en general.

Parámetro Evaluado	**Apreciación**	**TIEMPO (0 min)**	**TIEMPO (3 min)**	**TIEMPO (5 min)**	**TIEMPO (7 min)**
		Porcentaje	**Porcentaje**	**Porcentaje**	**Porcentaje**
AGRADO GENERAL	**Excelente**	0%	7%	3%	7%
	Muy buena	47%	53%	47%	40%
	Buena	50%	30%	30%	33%
	Regular	3%	7%	20%	20%
	Mala	0%	3%	0%	0%

En la tabla 16, se puede observar los resultados obtenidos de las degustaciones con respecto al agrado en general de la hoja de lechuga, una vez que se aplica la mezcla desinfectante de ácidos orgánicos, el porcentaje mayor corresponde al 53%, considerado como muy bueno, esto en el tiempo intermedio de exposición 3 min.(Figura 16).

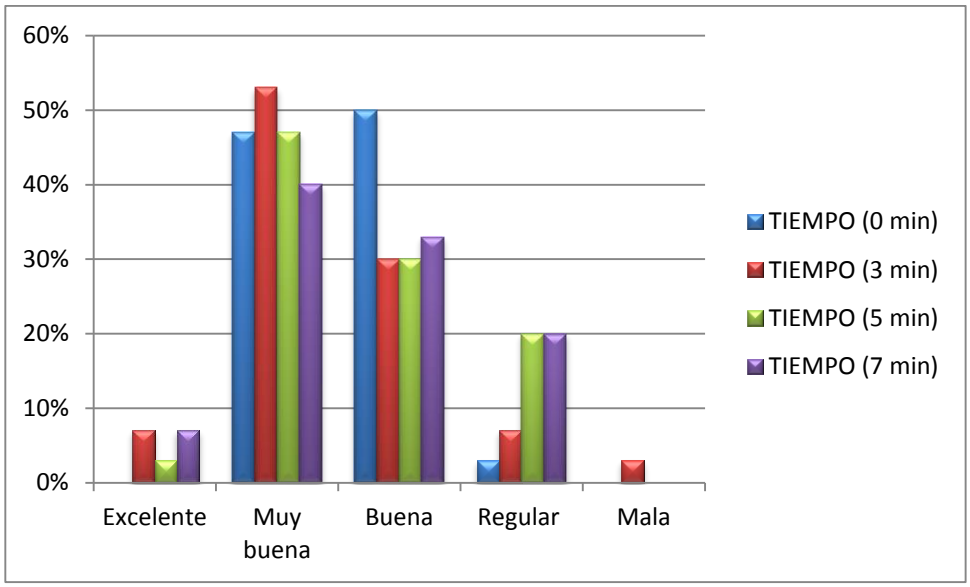


Figura 16. Evaluación del agrado general de la hoja del lechuga frente a los Diferentes tiempos de exposición a desinfección (0 min 3 min, 5 min y 7 min)

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

Introducción

En este capítulo se discutirá los términos de mayor importancia, referente a este trabajo de investigación.

4.1 Determinación de la carga microbiana inicial en lechugas adquiridas en el mercado Municipal de la Ciudad de Cuenca.

Al determinar la carga microbiana inicial de bacterias totales en las lechugas frescas se obtuvo como valor de referencia 5,9 log (Tabla 5), después de la desinfección con la mezcla de ácidos orgánicos formulados en el diseño experimental de mezclas, se obtuvo una reducción promedio de la carga microbiana inicial de 99.9% de bacterias totales , con la mezcla Nº 5 (Acido cítrico 50 ml, Acido acético 50 ml), en el tiempo de exposición de desinfección mínimo 0 min, 99.9% de reducción promedio de bacterias totales, con la mezcla Nº 9 (Acido cítrico 16ml, Acido láctico 66ml, Acido acético 16 ml), en el tiempo de exposición de desinfección mínimo de 0 min y un 100% de reducción de la carga microbiana inicial con la mezcla Nº 10 (Acido cítrico 66ml, Acido láctico 16ml, Acido acético 16 ml), de igual forma en el tiempo mínimo de exposición de desinfección, (Tabla 6).

Si bien la reducción de la carga microbiana inicial con las mezclas Nº 5 y Nº 9 fueron buenas, considerando que la lechuga es un vegetal que se consume sin mayor tratamiento de cocción sino al contrario se lo consume crudo se determino que la mezcla que debe utilizarse es la Nº 10 (Acido cítrico 66ml, Acido láctico 16ml, Acido acético 16 ml) ya que logró la inhibición completa de bacterias totales.

4.1.1 *Escherichia coli* en hojas de lechuga fresca

Las muestras de lechugas analizadas no excedieron el valor considerado como nivel de rechazo de la carga microbiana inicial de *Escherichia* coli, según la norma Peruana RM 615 2003 para Frutas y Hortalizas Frescas sin tratamiento, la que se tomó como referencia en este trabajo de investigación, la misma que indica un nivel de aceptación de 10^2 o 100 UFC/ g, como valor mínimo.

Tomando en consideración esto, el valor inicial de inoculación de la bacteria fue de 6,9 log (Tabla 7).

La desinfección con la mezcla Nº 5 (Acido cítrico 50 ml, Acido acético 50 ml), redujo un valor de 2,56 log correspondiente a una desinfección bacteriana de 90% en el tiempo de exposición de desinfección intermedio de 3 min, y una reducción de 4,58 log correspondiente a un 99,9 % de desinfección bacteriana, en el tiempo de desinfección máximo de 7 minutos.

En el tratamiento de desinfección con la mezcla Nº 9 (Acido cítrico 16ml, Acido láctico 66ml, Acido acético 16 ml), se obtuvo una disminución de 2,05 log en el tiempo de exposición intermedio de desinfección de 3 min, es decir una disminución bacteriana del 90%, y en el tiempo máximo de desinfección 7 min, una reducción de 4,42 log equivalente a un 99.9%.

Aplicada la mezcla Nº 10 (Acido cítrico 66ml, Acido láctico 16ml, Acido acético 16 ml), se obtuvieron mejores resultados desde el tiempo de exposición mínimo 0 min correspondiente a una disminución de 2,32 log o 90% de desinfección, en el tiempo intermedio de exposición 3 min una reducción logarítmica de 3,67 o 99.9% de desinfección bacteriana y en el tiempo máximo de exposición una disminución de 4,72 log, (Tabla 8).Se determina que la mezcla que mejores resultados de inhibición bacteriana tiene con respecto a *Escherichia coli,* es la mezcla 10 (Acido cítrico 66ml, Acido láctico 16ml, Acido acético 16 ml).

Suarez y Álvarez (2013), realizaron estudios en lechugas en cuya caracterización se evidencio niveles de *Escherichia coli* en 1.02 ± 0,46 Log UFC/g, con un inoculo de trabajo utilizado de 5,45 ± 0,43 Log UFC/g y usando una concentración de 2000 ppm del desinfectante Citrosan® (producto desinfectante a base de ácidos orgánicos), con un tiempo de 5 minutos de exposición.

La mezcla de ácidos orgánicos puros usada en el estudio logro una disminución de 4,72 log, usando un inoculo de trabajo de 6,9 log es decir se obtienen resultados similares de capacidad de inhibición aplicando ambas sustancias desinfectantes con respecto a esta bacteria.

4.1.2 Salmonella Enteriditis en lechuga fresca

Se obtuvo resultados de ausencia total de Salmonella Enteriditis en las muestras de lechuga fresca, de acuerdo a la norma de referencia RM 615 2003 efectivamente señala que no debe existir colonia alguna o ausencia completa sobre una muestra de 25 g. El inoculo inicial fue de 6,60 log (Tabla 9), de Salmonella Enteriditis valor utilizado como control positivo.

La aplicación de la mezcla N^{o} 5 (Acido cítrico 50 ml, Acido acético 50 ml), en el tiempo de exposición de desinfección 3 minutos disminuye 4,33 log o 99,9% de colonias de Salmonella, para el tiempo máximo de desinfección 7 minutos se tiene una reducción de 4,6 log. La desinfección con la mezcla N^{o} 9 (Acido cítrico 16ml, Acido láctico 66ml, Acido acético 16 ml), obtiene mejores resultados desde el tiempo de exposición cero minutos disminuyendo 4,19 log y en el tiempo intermedio de exposición 3 min, al desinfectante 4, 6 log en ambos casos por encima del 99,9 % de desinfección bacteriana.

Los resultados de la desinfección bacteriana aplicando la mezcla N^{o} 10 (Acido cítrico 66ml, Acido láctico 16ml, Acido acético 16 ml), demostraron valores de reducción en el tiempo intermedio de desinfección 3 minutos de 4,28 o un 99,99% de inhibición de bacterias y para el tiempo de desinfección máximo 7 minutos se logró

ya la eliminación completa de colonias de Salmonella Enteriditis (Tabla 10), razón por la cual en este microorganismo patógeno de igual forma se considera como la mejor mezcla desinfectante a la mezcla Nº 10, que contiene en su composición 66% de Acido cítrico, 16% de Acido Láctico y 16% de Acido Acético.

Suarez y Álvarez (2013), realizaron estudios en lechugas en cuya caracterización se evidencio ausencia total de Salmonella Enteriditis, para todas las muestras analizadas, utilizando una concentración de 2000 ppm del desinfectante Citrosan® (producto desinfectante a base de ácidos orgánicos), y 5 minutos de exposición al desinfectante, usando un inoculo de trabajo de 5,40 ± 0,68 log.

Se evidencia entonces que la mezcla de ácidos orgánicos puros usados como desinfectantes, logran inhibir de manera total la presencia de Salmonella Enteriditis en las lechugas, partiendo de un inoculo de trabajo superior al usado en el estudio en donde se utiliza el compuesto Citrosan®.

4.1.3 *Listeria monocytogenes* en lechugas frescas

Inicialmente no se obtuvieron colonias de dicha bacteria presentes en las hojas de lechuga, el valor del inoculo del que se partió fue de 7 log considerado como control positivo (Tabla 11), de acuerdo a la norma de referencia RM 615 2003, la misma contempla ausencia completa de dicha bacteria sobre vegetales crudos. En las pruebas in vivo se obtuvieron resultados de desinfección bacteriana con la mezcla Nº 5 (Acido cítrico 50 ml, Acido acético 50 ml), en el tiempo intermedio de desinfección de 3 minutos una reducción de 3,22 log y en el tiempo máximo de exposición 7 minutos una disminución de 4,7 log.

Para la mezcla Nº 9 (Acido cítrico 16ml, Acido láctico 66ml, Acido acético 16 ml), los resultados de desinfección bacteriana son relativamente parecidos a los que se

obtuvieron con la mezcla anterior, con una disminución de 3,68 log en el tiempo intermedio de exposición a desinfección equivalente a una reducción de 99.99% de colonias, y en el tiempo máximo de exposición 7 minutos una reducción de 4, 4 log.

Los resultados de inhibición bacteriana con la mezcla Nº 10 (Acido cítrico 66ml, Acido láctico 16ml, Acido acético 16 ml) nos permitieron determinar que la misma tuvo mayor poder desinfectante ya que los resultados de reducción bacteriana se pudieron observar desde el tiempo de exposición de desinfección mínimo 0 minutos logrando una reducción de 3,39 log equivalente a un 99.99% de inhibición bacteriana, para el tiempo intermedio 3 minutos disminuye una cantidad logarítmica de 4,4 log y en el tiempo de exposición máximo 7 minutos disminuye 5 log.

Los resultados que se obtuvieron en las pruebas in vivo, permitieron determinar que la mezcla con mayor poder de desinfección sobre los microorganismos patógenos del trabajo de investigación fue la mezcla Nº10, (66% de Acido cítrico, 16% de Acido Láctico,16% de Acido Acético), la cual tiene buenos resultados en el tiempo intermedio de exposición de desinfección, lo que también favoreció en las pruebas de evaluación de las características sensoriales en las hojas de lechuga.(Tabla 12)

Herrera (2015), realizó estudios con una solución de amonio cuaternario logrando una efectividad de 99,999% correspondiente a una disminución de 6.2 log, con respecto a *Listeria monocytogenes,* con un tiempo de exposición de desinfección de 10 min, la mezcla de ácidos orgánicos puros tiene una capacidad de desinfección igual a la solución de amonio cuaternario correspondiente a 99,99 % en un tiempo de exposición de desinfección de 7 min.

4.2 Diseño de mezclas

4.2.1 Evaluación de las mezclas antimicrobianas en las pruebas in vitro.

En las pruebas in vitro llevadas a cabo en el Laboratorio de microbiología de la Universidad del Azuay, las hojas de lechuga fueron previamente inoculadas con las bacterias de estudio del presente trabajo de investigación, para determinar cuál de las mezclas antimicrobianas era la que mejor resultados de inhibición tenia sobre las bacterias de estudio se realizo un diseño de mezclas simplex reticular aumentado (Montgomery, 2003).

Las diferentes mezclas para las pruebas in vitro se realizaron con una concentración de los ácidos al 1%, en las cuales se tomó en consideración los halos de inhibición que mayor diámetro presentaban, las mismas pruebas se realizaron con concentraciones de ácidos de 2%, esto se realizo con el fin de determinar si el p H de los mismos interfería con los resultados de inhibición bacteriana.

Considerando que los valores de pH de las mezclas tanto con la concentración del 1% como con la concentración del 2%, no variaban de manera notoria y que los resultados de inhibición coincidieron en ambas pruebas con incluso los mismos valores de diámetro de inhibición, se tomó la decisión de aplicar para las pruebas in vivo una media de ambas concentraciones es decir en las pruebas in vivo se tomó una concentración de 1,5%, obteniendo resultados de inhibición positivos en *Escherichia coli*, Salmonella Enteriditis y *Listeria monocytogenes* bacterias de estudio, con la mezcla desinfectante elegida, evaluado su capacidad de inhibición a cuatro tiempos de exposición en donde se obtuvieron excelentes resultados, razón por la cual para las pruebas organolépticas se consideraron cuatro muestras de degustación, esto en función de los tiempos 0 min,3 min, 5 min y 7 min.

4.3 Evaluación de Pruebas Organolépticas en hojas de lechuga.

Los resultados de las pruebas in vivo en las hojas de la lechuga permitieron determinar que la mezcla de desinfección con mejores resultados fue la Nº10, (66% de Acido cítrico, 16% de Acido Láctico, 16% de Acido Acético), la cual se aplicó en las hojas de lechuga en los tiempos de acción de desinfección establecidos (0 min, 3 min,5 min y 7 min) para realizar las pruebas de degustación.

Aun cuando se obtuvieron buenos resultados de desinfección bacteriana, en los tiempos de exposición mínimos como máximos, se realizaron las pruebas de degustación en los cuatro tiempos de desinfección, esto con la finalidad de determinar el tiempo en el que las características evaluadas eran las más aceptables por el panel de degustación, es decir el tiempo en el cual la hoja no sufría mayores alteraciones de apariencia, textura, color y agrado en general.

Se determinó entonces que la prueba que más agradó al panel de degustación fue la hoja sometida al tiempo de 3 minutos de desinfección.
La tabulación de los datos que se obtuvieron nos indica un porcentaje de agrado general de 47% considerado muy buena y 30% considerado como buena. (Tabla 16)
En cuanto al aspecto visual fue calificada con un 54% muy buena, 23% buena y 23% excelente. (Figura 9). El color de la hoja evaluado por el panel de degustación fue de 50% muy bueno y 27% excelente. (Tabla 13).

La característica de crujiente que es una de las características que más se consideraba preservar en las hojas, tuvo una aceptación de 47% muy buena, 30 % buena y 20% excelente. (Tabla 14). En cuanto al sabor característico de la lechuga se obtuvieron valores de 50% muy bueno y 27% bueno, valores importantes que demostraron que la mezcla desinfectante no altera mayormente el sabor de la hoja. (Tabla 15)

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones:

- Para la determinación de las propiedades antimicrobianas de la mezcla de ácidos orgánicos, la cual se aplicó en las hojas de lechuga con y sin inoculo, se realizó un diseño de mezclas simplex aumentado, los resultados del diseño de mezclas permitieron escoger tres mezclas de ácidos orgánicos, valorando aquellas que lograron mayor capacidad desinfectante, estas fueron las mezclas N°5(ácido cítrico 50ml, ácido acético 50 ml), N° 9(ácido cítrico 16ml, ácido láctico 66ml, ácido acético 16 ml) y N° 10 (ácido cítrico 66ml, ácido láctico 16ml, ácido acético 16 ml).

- La mezcla N° 10 cuya composición es la siguiente: Ácido cítrico 66ml, Acido láctico 16ml, Acido acético 16 ml, desarrollada en el diseño experimental o diseño de mezclas, fue la que mejor resultados de desinfección bacteriana obtuvo frente a los microorganismos patógenos inoculados, incluso desde el tiempo de exposición de desinfección mínimo 0 minutos.

- Para las pruebas sensoriales, se evaluaron cuatro muestras de hojas de lechuga, sometidas a los cuatro tiempos de exposición a desinfección: 0 min, 3 min, 5 min y 7 min, se obtuvieron mejores resultados de agrado general en la muestra sometida a un tiempo de 3 min, es decir al tiempo intermedio de desinfección, lo cual se considera un resultado positivo ya que el desinfectante cumple con la función de desinfección a partir incluso del tiempo 0 de exposición.

Recomendaciones:

- Buscar una forma adecuada de lavado y desinfección de lechuga fresca para evitar enfermedades transmitidas por la misma.

- Someter las hojas al tiempo de exposición de desinfección de 3 minutos como mínimo para así obtener la mayor inocuidad posible.

- Asesorar a las personas que manipulan alimentos sobre el peligro de una incorrecta desinfección de la lechuga y de los riesgos en la salud que esto pudiera ocasionar.

BIBLIOGRAFIA

GUTIÉRREZ Ramírez, Luz; Montoya Campuzano, Olga; Ruiz Villadiego; Orlando. 2005 "*Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias acido lácticas sobre el crecimiento in vitro de E. coli, Salmonella sp. Y Listeria monocytogenes*. (Revista CENIC Ciencias Biológicas. Supplement, Vol. 36, p1. 6p)

BOOTH. I. R. 1985 Microbiological Reviems. Pages: 359-378.

FOSTER, J. W. 1999. Current Opinion in Microbiology. Pages: 170-174.

KWON, Y.M Y Ricke, S.C 1998. Applied and Environmental Microbiology, Pages: 3458 -3463.

SLONCZEWKI, J.L Y Foster, J.W. 1987. *Escherichia coli* and Salmonella Typhimorium. Cellular and Molecular Biology, Ingraham J.L. et al., American Society of Microbiology, capitulo 96, Pages: 1534 – 1549.

VALENZUELA, P. R. (2000). *Los ácidos orgánicos como agentes antimicrobianos*. In *Avances en nutrición y alimentación animal: XVI Curso de especialización FEDNA* (pp. 155-167). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.

MONTGOMERY, D. (2003). Diseño y Análisis de Experimentos; Universidad Estatal de Arizona; Editorial Limusa; S.A. Pág. 65-75

ANZALDUA- Morales Antonio (1994). La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. Editorial Acribia; S.A. Pág. 67-84.

Referencias Electrónicas

CAMPOS Duran, María; Manzano Polio, Wendy. "*Evaluación de métodos de desinfección para hortalizas que se consumen en crudo*" 2007. (Tesis de Pregrado). (Internet). Disponible en: http://ri.ues.edu.sv/2015/1/Evaluaci%C3%B3n_de_m%C3%A9todos_de_desinfecci%C3%B3n_para_hortalizas_que_se_consumen_en_crudo.pdf. Consulta: octubre 2014

ORGANIZACION de las Naciones Unidas: http://www.un.org/es/documents/udhr/, Consulta Marzo 2015.

ORGANIZACION de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion (FAO). http://www.fao.org/docrep/014/al936s/al936s00.pdf, Consulta Marzo 2015.

ARISPE, Ivelio, and María Soledad Tapia. "*Inocuidad y calidad: requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. Innocuity and quality: essential requirements for consumer health protection.*"*Agroalimentaria* 13.24 (2007). Consulta Marzo 2015.

Prieto, M., Mouwen, J. M., Puente, S. L., & Sánchez, A. I. C. (2008). Concepto de calidad en la industria agroalimentaria. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, *33*(4), 258-264.http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442008000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=esConsulta Marzo 2015

MUÑOZ J., Silvia, et al. "*Frecuencia de entereobacterias en verduras fresas de consumo crudo expedidas en cuatro mercados de Lima, Peru*." Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru 24.3 (2013): 300. Religion & Philosophy Collection. Web. 26 May 2015. http://go.galegroup.com/ps/i.do?id=GALE%7ca371190601&v=2.1&u=uazuay_cons&it=r&p=GPS&sw=w&asid=debb8431f20290b80ca9eecb97ea268. Consulta Marzo 2015

ROMERO Reyes, José, Ureta V., Fernando, Lopez Valladares, Luis. *Acción germicida in vitro de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos*. 2002-03 [en línea]. [consulta: 2 de Junio 2015]. http://www.repositorio.uchile.cl/handle/2250/121207

MENDOZA Velásquez, Mario, and Félix Roberto Cantor Barreiro. "*Efecto del uso de ácido acético, cítrico e hipoclorito de calcio para control de Escherichiacoli* (ATCC 25922*) en lechuga* (Lactuca sativa L.) *y chile dulce* (Capsicumannuum L.)." (2012). http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/952/1/T3248.pdf. Consulta Junio 2015

DEL MES, C. L. A. V. E. "*Higiene e Inocuidad de los Alimentos: Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento* (POES)."
Consulta Junio 2015

FLORES, Tania González, and Rafael Antonio Rojas Herrera. "*Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico.*" *Salud pública de México* 47.5 (2005): 388-390.
Consulta Junio 2015

SUAREZ James, Sonia; Gómez Álvarez, Luz Marina. "*Evaluación de un producto a base de ácidos orgánicos (CITROSAN), frente a E. coli y Salmonella spp, en la desinfección de lechuga fresca*" 2013. (Internet). Disponible en: http://alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/viewFile/229/222. Consulta: Octubre 2014.

KLESPER, E. Michael, Mary Anne Banevicius, Richard Quintiliani and Charles H. Nightingale. *Characterization of Bactericidal Activity of Clindamycin against Bacteroidesfragilis via Kill Curve Methods* (Internet). Disponible en: http://aac.highwire.org/content/40/8/1941.full.pdf. Consulta Junio 2015.

NORMA Peruana de referencia RM 615 2013. Disponible en : http://www.digesa.sld.pe/norma_consulta/RM%20615-2003MINSA.pdf. Consulta Enero 2015.

MARIN Morocho, K., & Medina, R. (2011). *Desarrollo de un método experimental para la desinfección de canales de avestruz.* http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/17028 Consulta Marzo 2015.

OJEDA, C., &Vázquez, G. (2009). *Aplicación de ácidos orgánicos en la reducción de microorganismos aerobios mesófilos y, coliformes totales y fecales en canales de bovinos.* http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/210 Consulta Agosto 2015

ROJAS, C. *Evaluación de cuatro desinfectantes sobre Listeria monocytogenes aislada de productos cárnicos crudos de una planta de procesados de*

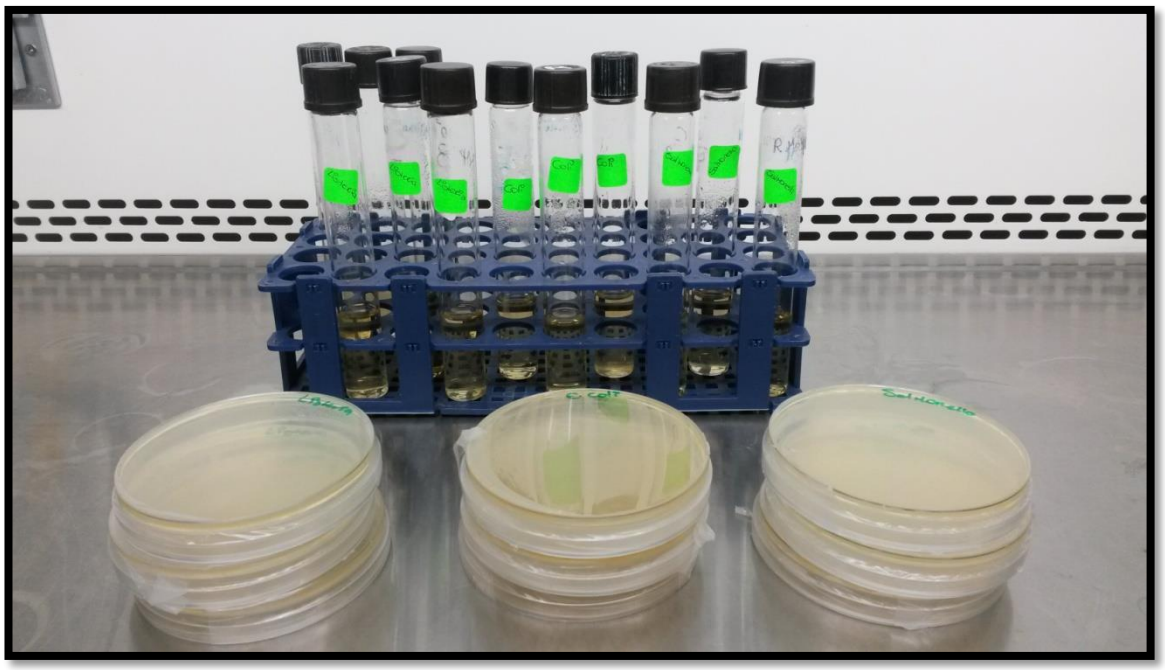
*Bogotá.*Departamento de Microbiología (Doctoral dissertation, Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, DC Colombia. 2007. pg. 104).
http://hdl.handle.net/10554/8302
Consulta Diciembre 2015

HERRERA, Malena. (2015) *Incidencia de coliformes/ E.coli y Listeria spp. en lechuga variedad criolla expendida en los mercados, ferias agroecológicas y supermercados de la ciudad de Cuenca frente a soluciones desinfectantes de uso casero.*
http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/4834
Consulta Mayo2016

ANEXOS

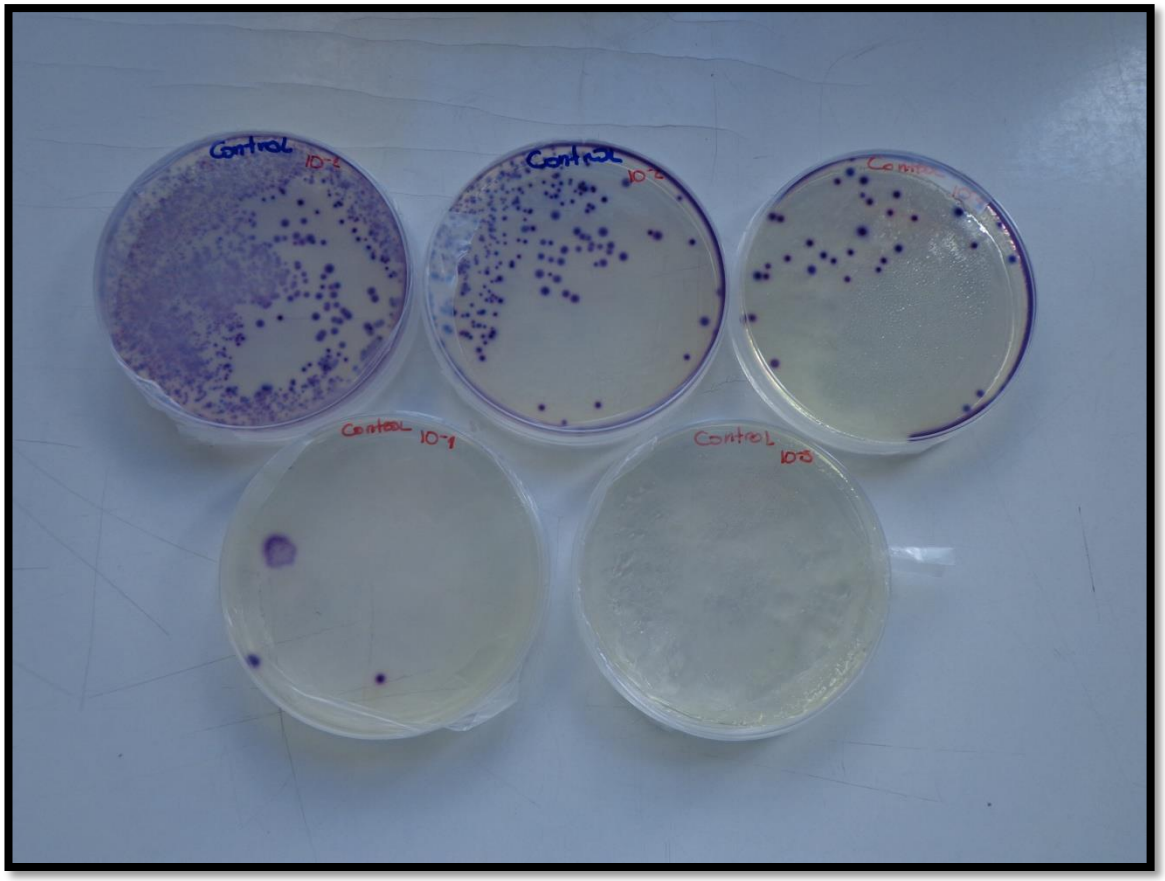
ANEXO 1: Inoculación de Bacterias en Hojas de Lechuga

ANEXO 2: Preparación Diluciones

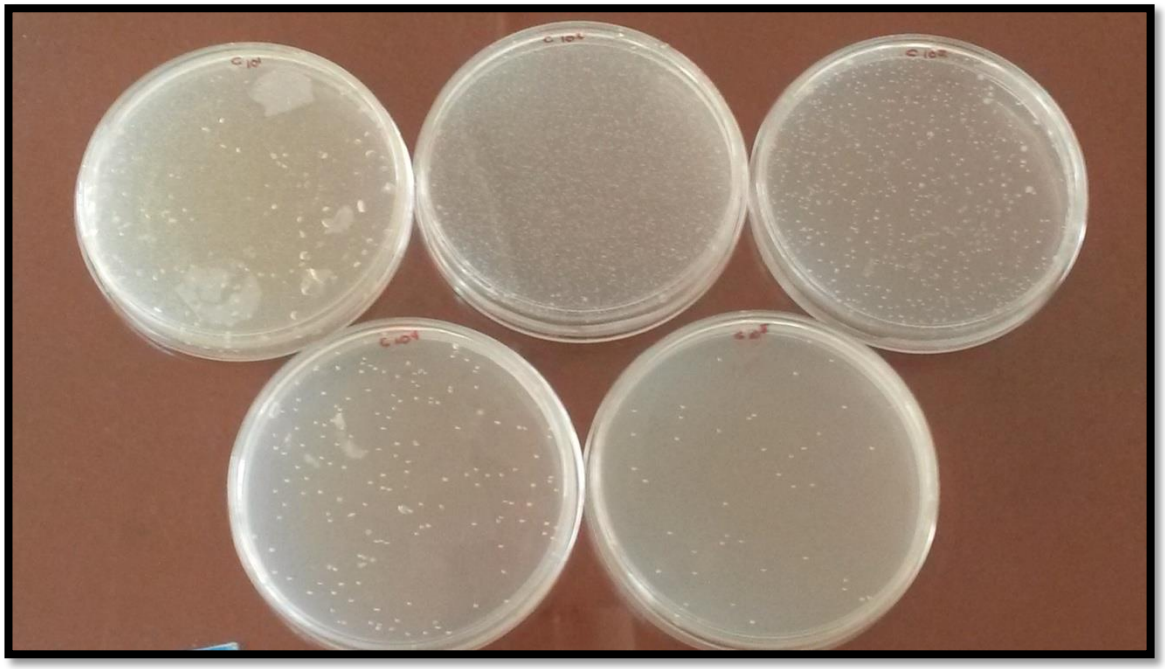


ANEXO 3: Incubación de bacterias

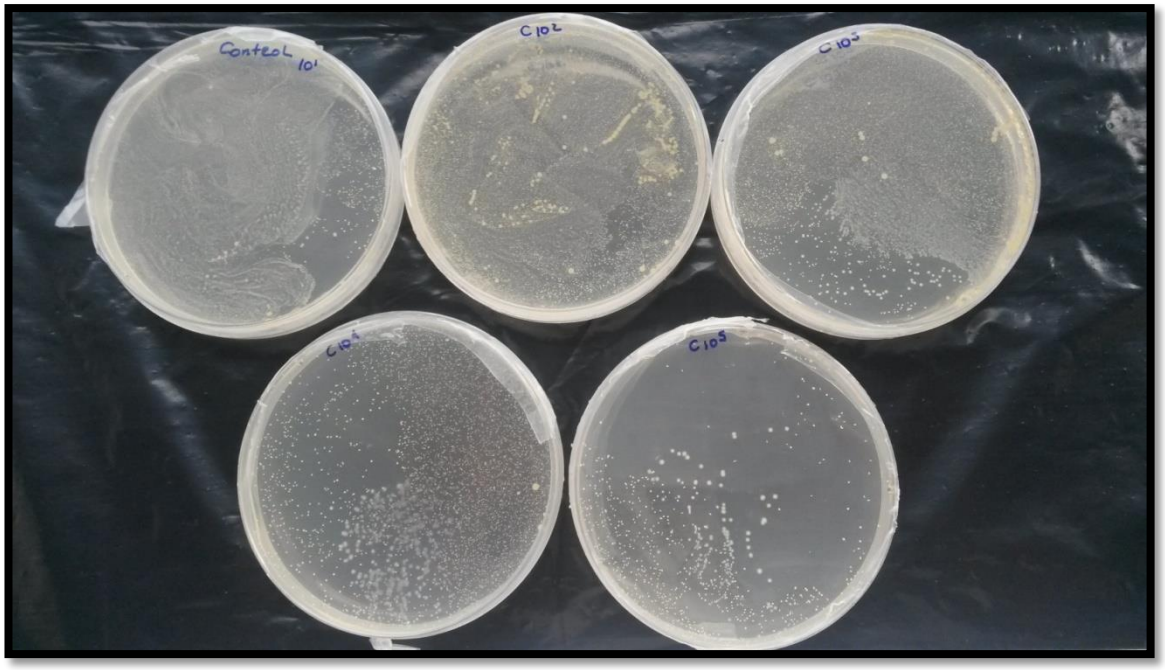
ANEXO 4: Control Positivo *Escherichiacoli*



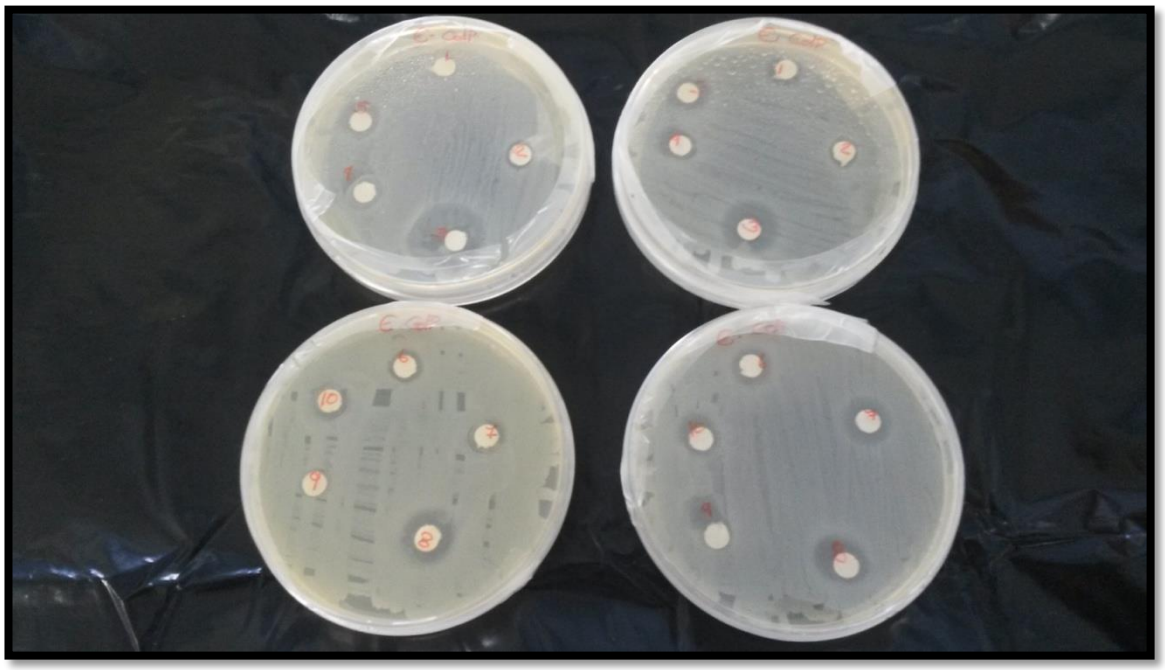
ANEXO 5: Control Positivo Salmonella Enteriditis



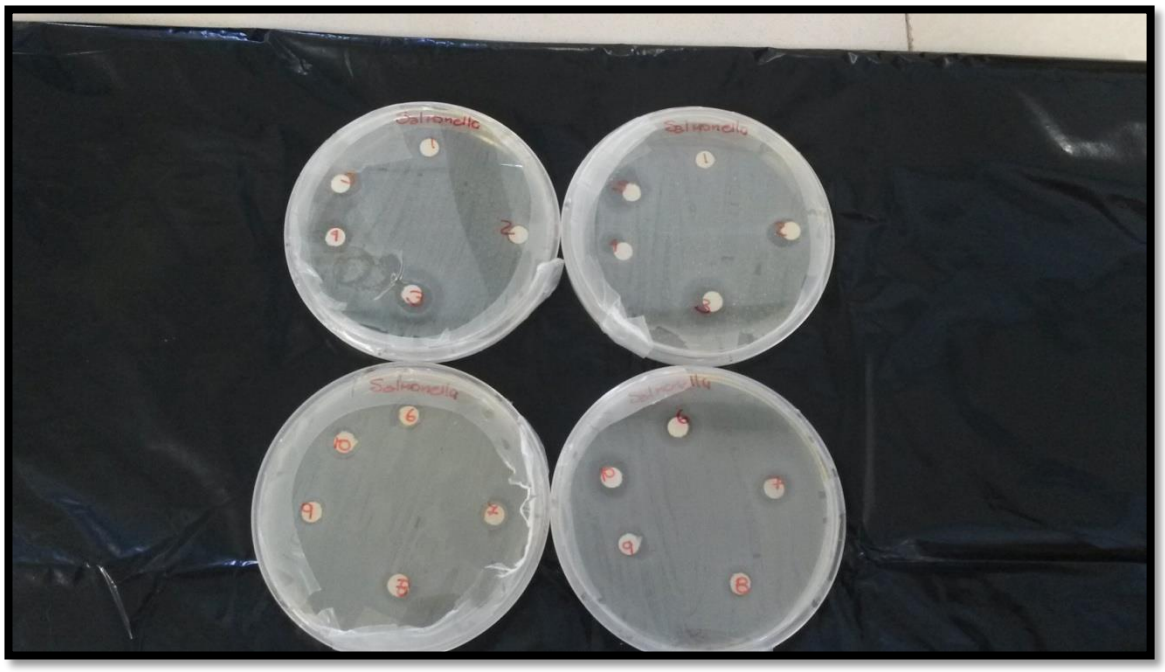
ANEXO 6: Control Positivo *Listeria monocytogenes*



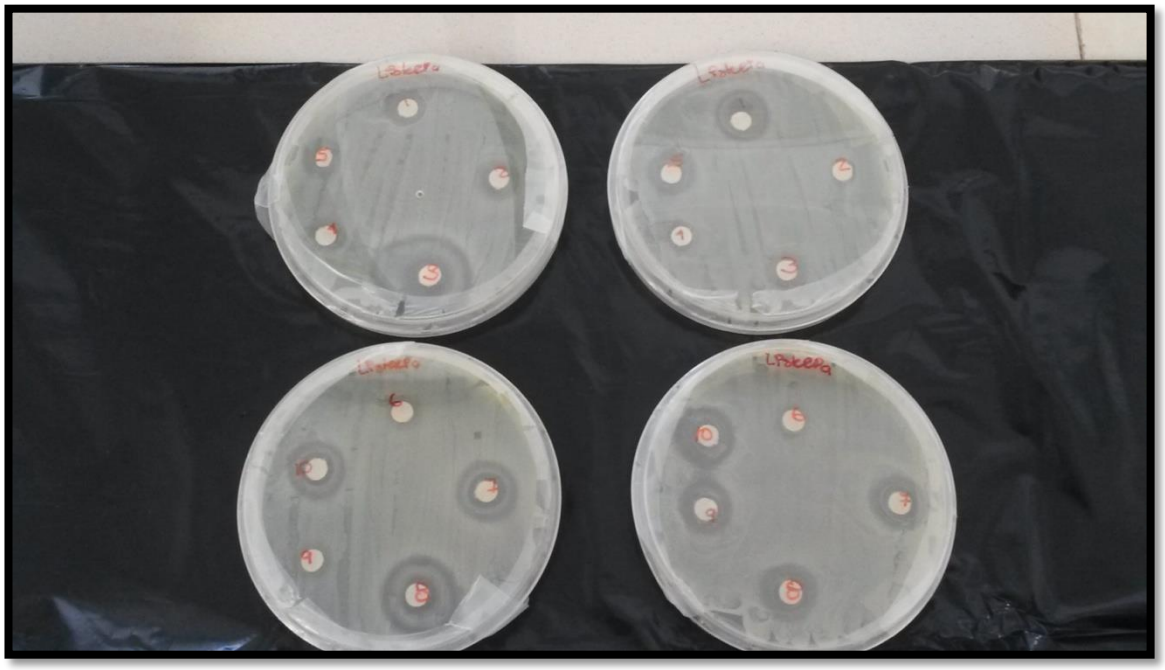
ANEXO 7: Halos de inhibición *Escherichiacoli.*



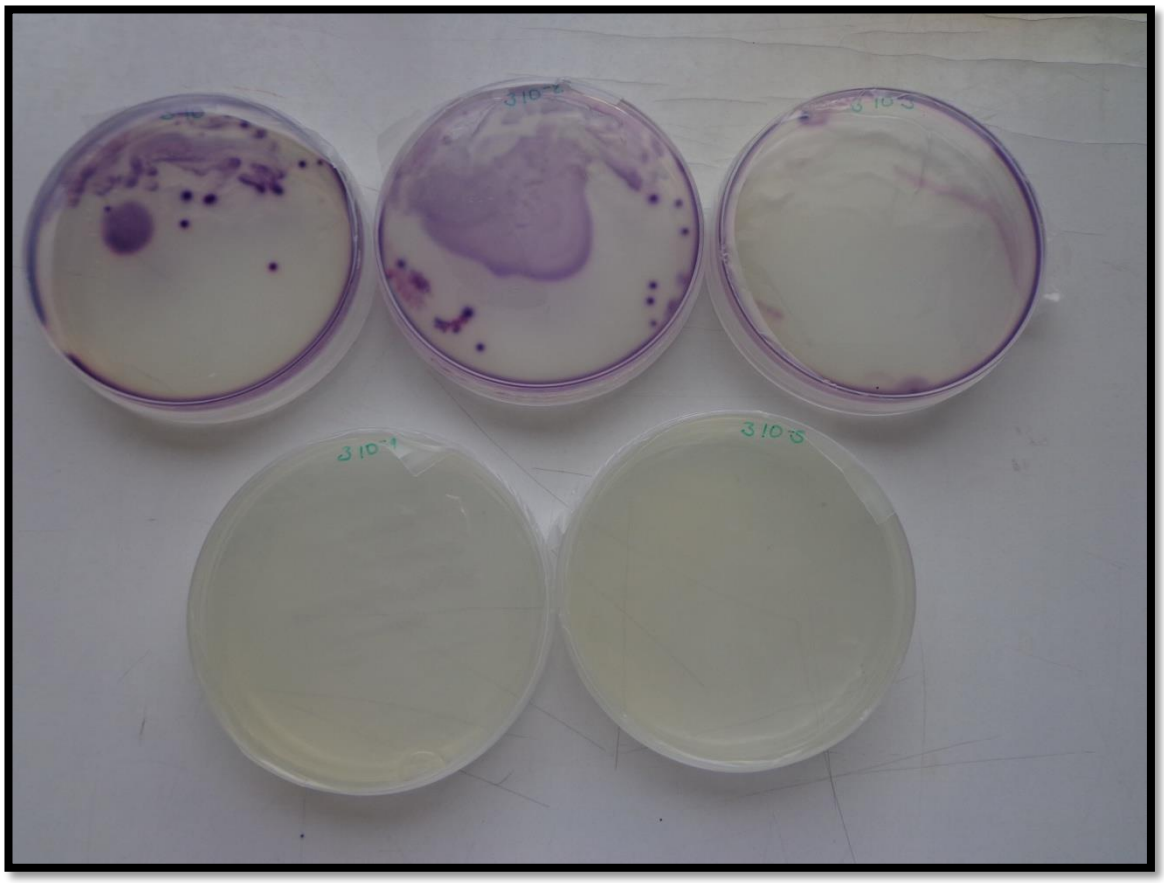
ANEXO 8: Halos de inhibición Salmonella Enteriditis.



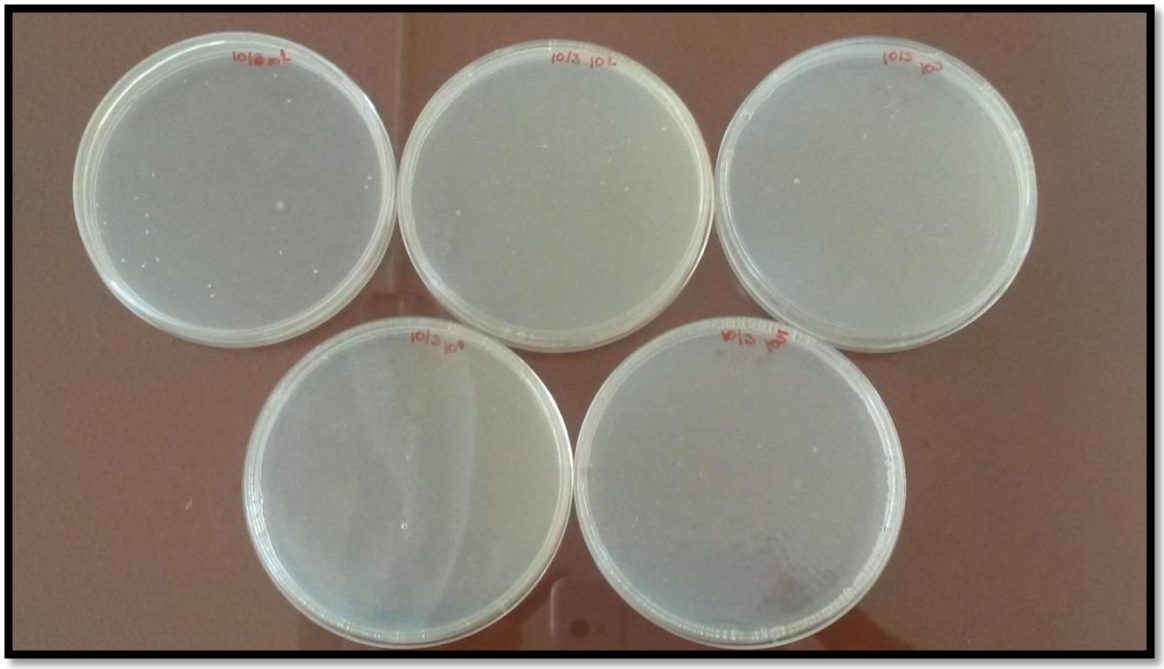
ANEXO 9: Halos de inhibición *Listeria monocytogenes.*



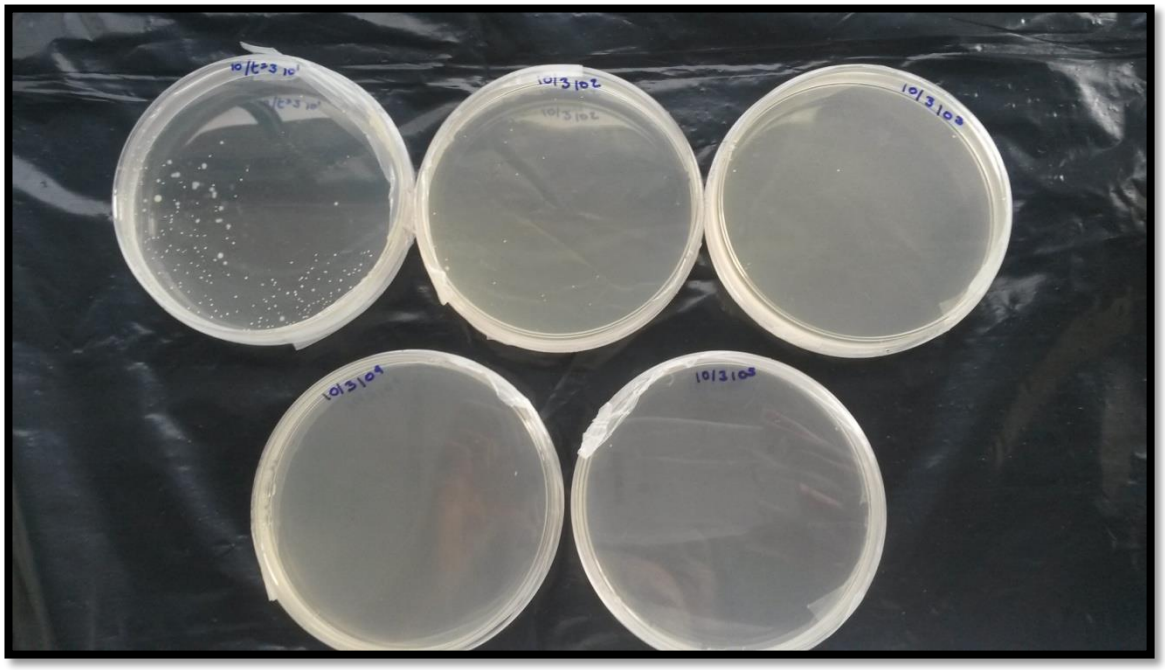
ANEXO 10: Inhibición *Escherichiacoli*, mezcla 10 tiempo 3 min**.**



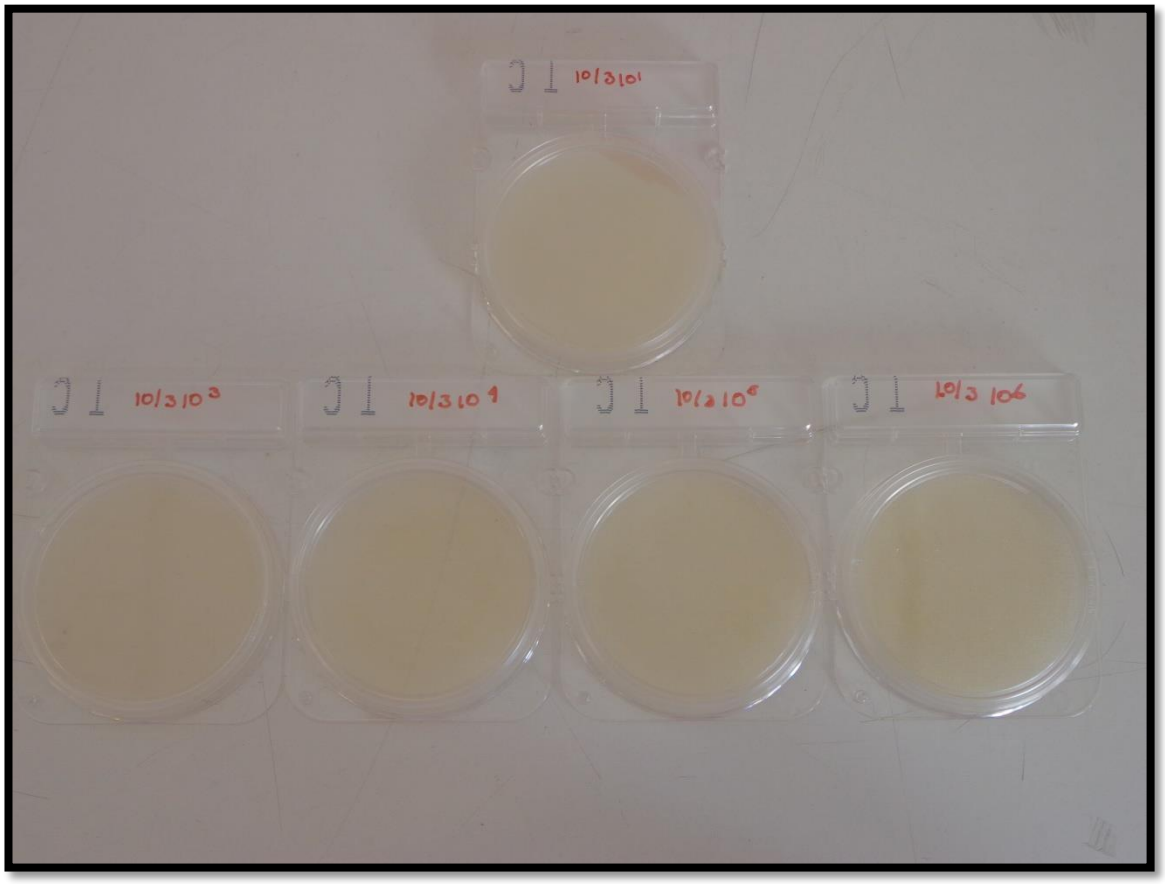
ANEXO 11: Inhibición Salmonella Enteriditis, mezcla10, tiempo 3 min.



ANEXO 12: Inhibición *Listeria monocytogenes*, mezcla 10 tiempo 3 min



ANEXO 13: Inhibición Bacterias Totales, mezcla 10, tiempo 3 min.



ANEXO 14

FICHA DE CATACION DE LECHUGAS

Ficha N°	Fecha	N° Muestra

Observe la muestra y califíquela marcando en las tablas según lo expuesto en las mismas.

Nomenclatura: E: Excelente (5), MB: Muy Bueno (4), B: BUENO (3), R: Regular (2), M: Malo (1)

1. **ASPECTO**

Factor	**E (5)**	**MB (4)**	**B (3)**	**R(2)**	**M (1)**
VISUAL					
COLOR					

2. **TEXTURA**

Factor	**E (5)**	**MB (4)**	**B (3)**	**R(2)**	**M (1)**
CRUJIENTE					
SUAVE					
DURA					

3. **SABOR**

Factor	**E (5)**	**MB (4)**	**B (3)**	**R(2)**	**M (1)**
ACIDO					
CARACTERISTICO					

4. **AGRADO**

Factor	**E (5)**	**MB (4)**	**B (3)**	**R(2)**	**M (1)**
AGRADO					

ANEXO 15

Norma Peruana de referencia RM 615 2013

NTS N° - MINSA/DIGESA-V.01
NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g o mL	
					m	M
Aerobios mesófilos (*)	2	3	5	2	10	10^2
Salmonella sp. (*)	10	2	5	0	Ausencia /25 g ó mL	------

(*) Determinación en el contenido del huevo.

XII.2 Huevo (clara y/o yema) y ovo productos pasteurizados, líquidos, congelado y/o deshidratado.

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g o mL	
					m	M
Aerobios mesófilos	2	3	5	2	5×10^4	10^6
Mohos (*)	2	3	5	2	10	10^2
Coliformes	5	3	5	2	10	10^2
Salmonella sp.	10	2	5	0	Ausencia /25 g ó mL	------

(*) Sólo para productos deshidratados.

XIII. ESPECIAS, CONDIMENTOS Y SALSAS.

XIII.1 Mayonesa y otras salsas a base de huevos.

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g	
					m	M
Aerobios mesófilos	2	3	5	2	10^4	5×10^4
Levaduras	2	3	5	2	10	10^2
Staphylococcus aureus	8	3	5	1	10	10^2
Salmonella sp.	10	2	5	0	Ausencia /25 g	------

XIII.2 Salsas (de tomate, picantes, de tamarindo, de mostaza) y aderezos industrializados.

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g ó mL	
					m	M
Mohos	2	3	5	2	10^2	10^3
Levaduras	2	3	5	2	10^2	10^3
Coliformes	5	3	5	2	10^2	10^3

XIII.3 Productos a base de soja fermentada: soja fermentada, cuajada (queso de soja), pasta, salsa sillao, otros.

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g ó mL	
					m	M
Mohos	2	3	5	2	10^3	10^4
Coliformes	5	3	5	2	10^2	10^3
Salmonella sp	10	2	5	0	Ausencia /25 g	------

XIII.4 Especias y condimentos deshidratados.

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
					m	M
Aerobios mesófilos	2	3	5	2	10^5	10^6
Mohos	2	3	5	2	10^3	10^4
Coliformes	5	3	5	2	10^2	10^3
Escherichia coli (*)	5	3	5	2	10	10^2
Salmonella sp.	10	2	5	0	Ausencia /25 g	----

(*) Sólo para los productos de consumo directo.

XIV. FRUTAS, HORTALIZAS, FRUTOS SECOS Y OTROS VEGETALES.

XIV.1 Frutas y hortalizas frescas (sin ningún tratamiento).

ANEXO 15

Norma Peruana de referencia RM 615 2013

NTS N° - MINSA/DIGESA-V.01
NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
					m	M
Escherichia coli	5	3	5	2	10^2	10^3
Salmonella sp.	10	2	5	0	Ausencia /25 g	-----
XIV.2 Frutas y hortalizas frescas semiprocesadas (lavadas, desinfectadas, peladas, cortadas y/o precocidas) refrigeradas y/o congeladas.						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
					m	M
Aerobios mesófilos	1	3	5	3	10^4	10^6
Escherichia coli	5	3	5	2	10	10^2
Salmonella sp.	10	2	5	0	Ausencia /25 g	-----
Listeria monocytogenes (*)	10	2	5	0	Ausencia /25 g	-----
(*) Solo para frutas y hortalizas de tierra (a excepción de las precocidas).						