

UNIVERSIDAD PARA LA COOPERACION INTERNACIONAL
(UCI)



EVALUACIÓN DE UN PRODUCTO A BASE DE ÁCIDOS ORGÁNICOS
(CITROSAN®), FRENTE A *E.coli* y *Salmonella spp*, EN LA DESINFECCIÓN DE
LECHUGA FRESCA.

SONIA JAIMES SUAREZ

PROYECTO FINAL DE GRADUACION PRESENTADO COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OPTAR AL TITULO DE MASTER EN GERENCIA DE
PROGRAMAS SANITARIOS EN INOCUIDAD DE ALIMENTOS

San José, Costa Rica

Junio 2011

**UNIVERSIDAD PARA LA COOPERACION INTERNACIONAL
(UCI)**

**Este proyecto final de graduación fue aprobado por la Universidad como
requisito parcial para optar al grado de Master en Gerencia de Programas
Sanitarios en Inocuidad de Alimentos**

Doctor Eduard Müller

RECTOR UNIVERSIDAD PARA LA COOPERACION INTERNACIONAL

Doctora Mayra Márquez González

TUTORA

Doctor Nolán Quiros

LECTOR

Sonia Jaimes Suárez

SUSTENTANTE

DEDICATORIAS

A mi familia

Por ese inmenso amor, único, incomparable...mi motor

RECONOCIMIENTOS

A Tecnas S.A

Por el apoyo, la confianza y las tantas oportunidades...mil gracias

A la Fundación Intal

Por la disponibilidad y el profesionalismo del equipo de trabajo

A la Doctora Mayra (Tutora)

Por sus valiosos aportes y por compartirme parte de su experiencia

INDICE GENERAL	Pág.
INDICE GENERAL	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN EJECUTIVO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCION	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Problemática.....	3
1.3. Justificación.....	4
1.4. Objetivo principal.....	5
1.5. Objetivos específicos.....	5
2. MARCO TEORICO	6
3. METODOLOGIA	20
3.1. Protocolo.....	20
3.1.1. Etapa I. Caracterización.....	20
3.1.2. Etapa II. Prueba in vitro.....	22
3.1.3. Etapa III. Inoculación.....	24
3.2. Procesamiento y análisis de la información.....	29
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSION DE RESULTADOS	33
6. CONCLUSIONES	35
7. RECOMENDACIONES	37
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38
9. ANEXOS	43

INDICE DE FIGURAS

Pag.

Figura 1. Corte de trozos de lechugas con plantilla estéril	21
Figura 2. Centrifugación de cultivos de patógenos.....	23
Figura 3. Secado de patógenos sobre lechugas inoculadas	27
Figura 4. Tratamiento con desinfectante de lechugas inoculadas.....	28

INDICE DE CUADROS

Pag.

Cuadro 1. Brotes de enfermedades de origen alimenticio asociadas con frutas y hortalizas frescas	8
Cuadro 2. Resultados prueba in vitro <i>Salmonella spp.</i>	32
Cuadro 3. Resultados prueba in vitro <i>E. coli</i>	32
Cuadro 4. Efecto de la mezcla de ácidos orgánicos Citrosan® frente a <i>E. coli</i> y <i>Salmonella spp</i> en lechugas inoculadas.	33

INDICE DE ABREVIATURAS

APE	Agua peptona estéril
APT	Agua peptona tamponada
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
CAST	Consejo de Ciencia y Tecnología Agrícola (Council for Agricultural Science and Technology).
CFSAN	Centro para la Inocuidad Alimentaria y Nutrición Aplicada (Center of Food Service and Applied Nutrition).
ETA's	Enfermedades transmitidas por alimentos
FDA	Departamento de Drogas y alimentos de los Estados Unidos (U.S Food and Drug Administration)
GRAS	Generalmente reconocido como inocuo (Generally Recognized as Safe)
HACCP	Análisis de peligros y puntos críticos de control (Hazard Analysis and Critical Control Point).
JIFSAN	Instituto de Inocuidad de los Alimentos y Nutrición Aplicada / Universidad de Maryland (Joint Institute of Food Safety and Applied Nutrition/University of Maryland).
LIA	Agar lisina hierro (Lysine iron agar)
NMP	Número más probable
MUG	4-metilumbeliferil- β -D-glucorónido
SS	Agar Salmonella Shigella
PPM	Partes por millón
TSI	Triple azúcar hierro (Triple sugar iron)
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN EJECUTIVO

La idea del presente estudio surgió de la motivación por atender a una necesidad identificada desde el campo laboral, misma que fue apoyada y avalada por la compañía en la cual laboro, Tecnas S.A.

El uso del cloro como desinfectante de frutas y vegetales no está regulado en Colombia, sin embargo constituye el principio activo más utilizado para tal fin, básicamente por su bajo costo y fácil alcance.

Es preocupante la práctica común de no controlar la concentración ni condiciones de uso del cloro, hecho que se observa con más frecuencia en restaurantes y servicios de alimentación industrial, en la desinfección de frutas y vegetales para ensaladas. En muchos casos se utiliza indiscriminadamente, lo que además de posibles efectos para la salud, genera la alteración de las características sensoriales de los productos y con ella el rechazo por parte del consumidor.

Los ácidos orgánicos se presentan como una alternativa para sustituir al cloro, por su buen desempeño antimicrobiano, su condición de productos GRAS (generalmente reconocidos como inocuos) y el riesgo menor que implica para quienes lo manejan, así como para el consumidor.

Este estudio, se propuso como objetivo principal determinar la reducción de *E.coli* y *Salmonella spp* en lechuga fresca utilizando un producto a base de ácidos (Citrosan®).

Adicional a este propósito, el trabajo buscó determinar la concentración de uso más efectiva, así como el tiempo de contacto óptimo en el tratamiento de desinfección de lechuga con Citrosan®.

Para el ensayo, se inocularon lechugas frescas con poblaciones conocidas de cuatro cepas de *Salmonella spp* y *E.coli*, que luego se sometieron a un tratamiento de desinfección con un producto a base de ácidos (Citrosan®). Posterior a la desinfección, se cuantificó la reducción de la población de los microorganismos inoculados.

Las variables concentración y tiempo de contacto para la desinfección, fueron definidas previamente en un ensayo in vitro, enfrentando estos mismos patógenos al desinfectante.

Los resultados de este estudio mostraron reducciones superiores al 99% en las poblaciones inoculadas de *E. coli* y cercanas al 90% en las de *Salmonella spp*.

En las lechugas inoculadas con *E. coli*, la reducción de la población alcanzó los 2.09 ± 0.14 Log UFC/g, en tanto que en las inoculadas con *Salmonella spp* la reducción fue de 0.98 ± 0.19 Log UFC/g.

El estudio reveló que el mejor efecto antimicrobiano de la mezcla a base de ácidos orgánicos (Citrosan®) frente a poblaciones altas (10^5 UFC/g) de los patógenos inoculados, se obtuvo con una concentración de 2000 ppm y un tiempo de contacto de 5 minutos.

Los ensayos in vitro y de inoculación demostraron mayor sensibilidad de *E.coli* respecto a *Salmonella spp* frente al tratamiento de desinfección con el producto a base de ácidos orgánicos Citrosan®.

El desinfectante a base de ácidos orgánicos Citrosan® constituye una alternativa efectiva y segura como tratamiento para reducir microorganismos patógenos en vegetales, dada la necesidad imperante de mitigar el riesgo microbiológico asociado al consumo de este tipo de productos, que generalmente se consumen crudos.

ABSTRACT

This study evaluated a sanitizer product based on organic acids (Citrosan®) on reducing *E. coli* and *Salmonella spp.* A mixture of two strains of each pathogen in a high population size (10^5 CFU /g) was inoculated directly onto lettuce pieces (5x5 cm), distinguishing the inner and outer surfaces of the lettuce leaf. Disinfection treatment of inoculated lettuce was performed by immersion in 1.5 L of sanitizer solution (2000 ppm) for 5 minutes, with agitation (150 rpm) at room temperature. Results showed that *E. coli* was more sensitive than *Salmonella spp.* against the action of the Citrosan®. Inoculated lettuce with *E. coli*, showed population reductions of 2.9 ± 0.14 log CFU/g, whereas in those inoculated with *Salmonella spp.* population reductions were 0.98 ± 0.19 log CFU/g. These reductions showed an effective disinfectant capacity of the product Citrosan® on lettuce.

1. INTRODUCCION

1. 1. Antecedentes

Tecnas S.A es una empresa colombiana ubicada en la ciudad de Medellín, con 24 años de experiencia y más de 260 empleados; se especializa en el diseño, desarrollo, fabricación, maquila y venta de productos, ingredientes y aditivos para la industria de alimentos en general, brindando un acompañamiento técnico integral.

El principal compromiso de Tecnas S.A, está en satisfacer al cliente, mediante el suministro de productos para la industria de alimentos de consumo humano, seguros, sanos, innovadores y de calidad. A través de la División Limpieza, Desinfección e Inocuidad *LDI*, Tecnas S.A de la mano de la firma Mexicana Diken Internacional, ofrece un portafolio de productos variado y de especialidad y con un equipo técnico de alta competencia, orienta a la industria de alimentos en el propósito fundamental de asegurar la inocuidad de sus productos.

El trabajo experimental de este estudio se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Fundación INTAL (Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria), el cual es un centro de investigación y formación técnica en el sector Agroalimentario.

Desde el contexto anterior, el presente trabajo de grado resultó en una oportunidad de avanzar en un estudio que ayudaría a dar respuestas y alternativas ante una necesidad identificada en el sector de los alimentos y que daría a Tecnas herramientas sólidas para argumentarlas. El consumo de frutas y vegetales frescos ha mostrado un aumento a nivel mundial y con él también se ha incrementado el número de brotes de enfermedades asociadas a este tipo de

productos. Diversos microorganismos patógenos son frecuentemente vinculados con vegetales crudos, los cuales en su mayoría provienen del tracto intestinal de animales de sangre caliente, incluido el hombre. Se destacan *Salmonella spp*, *E. coli*, entre otros. (Harris *et al.*, 2003; Beuchat, 1998).

El tema de inocuidad alimentaria ligada al consumo de productos agrícolas frescos trae consigo una preocupación, dado que normalmente se consumen crudos, no son sometidos a un tratamiento letal como la cocción que elimine los microorganismos presentes. En este sentido, se han dirigido esfuerzos tendientes a generar medidas que contribuyan a minimizar el riesgo de enfermedades asociadas a los ya mencionados productos.

Las medidas más efectivas, se enfocan a trabajar desde la prevención, empezando por el campo con las Buenas Prácticas Agrícolas, avanzando en los diferentes eslabones de la cadena, que involucran etapas de procesamiento y transformación a nivel industrial, transporte y distribución, hasta llegar al consumidor final; allí cobran importancia las Buenas Prácticas de Manufactura. (Universidad de Maryland; FDA, 2002).

No obstante la prevención no es suficiente, es inevitable establecer mecanismos adicionales que corresponden a la descontaminación de los vegetales y para tal fin se dispone de métodos variados que incluyen la aplicación de productos químicos, la utilización de técnicas como la irradiación, ozonización, tratamiento con luz UV-C (Gil, 2009), y más recientemente con agua electrolizada. (Koseki y colaboradores, 2003).

En el tratamiento con agentes químicos, existen diversas alternativas, que varían según sean los principios activos y su mecanismo de acción en la eliminación de microorganismos; cada uno de ellos tiene sus ventajas y desventajas y en la

mayoría de los casos, su efectividad está ligada a factores como pH, temperatura, cantidad de materia orgánica presente, entre otros. (Beuchat, 1998).

A nivel mundial el cloro es el desinfectante más utilizado para la desinfección de frutas y vegetales crudos, así como para otros usos en la industria de los alimentos. Constituye una alternativa económica, de fácil alcance y medianamente efectiva. Al cloro también se le han atribuido características negativas, como los son los efectos adversos para la salud, asociados la formación de compuestos potencialmente cancerígenos, aunque estos no se tienen claramente definidos; altas cargas de contaminación en las aguas de vertido, marcada inestabilidad frente a la presencia de materia orgánica, así como frente a otros factores (Gil y colaboradores, 2009); además de ser altamente corrosivo.

La actividad inhibitoria o letal del cloro está influenciada por ciertos parámetros, por lo que es clave brindar las condiciones adecuadas para su desempeño; uno de ellos es la temperatura y más crítico aún es el control del pH de la solución, el cual determina su eficacia en gran medida. (Parish *et al.*, 2003). Estas condiciones en muchos casos o bien, son desconocidas por el personal responsable de su manejo, o simplemente se les resta importancia al momento del uso, lo que puede llevar a su inefectividad, aún cuando las dosis aplicadas sean altas.

1.2. Problemática

En Colombia, tal como en otros países del mundo, el uso del cloro no está regulado. Es muy utilizado para la desinfección de frutas y vegetales en restaurantes, servicios de alimentación, plantas de procesos de transformación de e incluso en el hogar.

Es inaceptable encontrar que en ocasiones, usuarios del cloro motivados más por su afán de lograr en sus productos resultados microbiológicamente admisibles por las autoridades sanitarias, que por el concepto de inocuidad, sobredosifican el químico al punto de convertirlos en productos reprobables por parte del consumidor. Este hecho es más frecuentemente observado en vegetales en mezcla para ensaladas.

1.3. Justificación

Los ácidos orgánicos prometen ser una alternativa viable en el intento de reducir el amplio uso del cloro en la desinfección de frutas y vegetales crudos, dado el reconocimiento de su buen desempeño como antimicrobianos (Beuchat, 1998). Adicionalmente, no implican un riesgo mayor en el manejo, como tampoco para el consumidor.

Ante la preocupación que deriva del riesgo microbiológico en vegetales frescos, específicamente lechugas y ensaladas que la contienen, por su frecuente vinculación con patógenos como *Salmonella* spp y *E.coli*, este proyecto de grado se enfocó en evaluar un producto a base de ácidos orgánicos (Citrosan®), como alternativa de desinfectante para frutas y vegetales frescos.

Diversos tipos de ácidos orgánicos están contenidos naturalmente en muchas frutas y vegetales, algunos de ellos son el ácido láctico, acético, succínico, tartárico, benzoico y sórbico. Su actividad antimicrobiana está directamente ligada al pH por cuanto la mayoría de los microorganismos no resisten valores inferiores a 4.0. (Beuchat 1998, Universidad de Maryland; FAO 2002).

El Citrosan®, contiene en su composición proporciones de varios de estos ácidos orgánicos como son el ácido láctico, cítrico y sórbico, entre otros; que en

combinación con extractos de semillas de cítricos, produce un efecto sinérgico antimicrobiano.

1.4. Objetivo Principal:

Determinar la reducción de *E.coli* y *Salmonella spp* sobre lechuga fresca utilizando un producto desinfectante a base de ácidos orgánicos (Citrosan®).

1.4.1. Objetivos específicos:

- Evaluar la concentración de uso de un producto a base de ácidos orgánicos (Citrosan®), recomendada por el fabricante en la desinfección de lechuga fresca.
- Determinar el tiempo de contacto para la desinfección de lechuga fresca con un producto a base de ácidos orgánicos (Citrosan®).

2. MARCO TEORICO

Los frutas y hortalizas frescas constituyen un componente esencial de la dieta de muchas personas a nivel mundial y día a día su consumo viene en aumento, obedeciendo a varios factores como la tendencia hacia una alimentación más sana, los cambios que demandan los nuevos estilos de vida, el aumento en el comercio global, entre otros.

En el mismo sentido, en los últimos años la frecuencia de brotes asociados epidemiológicamente a frutas y vegetales crudos ha mostrado incremento en países industrializados; por ejemplo, en los Estados Unidos la proporción de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos asociados a productos frescos pasó del 0.7% en los años 70s a 6% en los años 90s. (Sivapalasingam, 2004), hecho que se atribuyó a los cambios en la dieta de la población y al aumento en las importaciones de alimentos (Altekruse *et al.*, 1997 citado por Beuchat).

También en Estados Unidos, entre 1996 a 2008, se dieron ochenta y dos brotes de enfermedades relacionados con productos frescos; de estos, 28 (34%) fueron asociados al consumo de verduras de hoja verde. Las enfermedades transmitidas por los alimentos en la mayoría de estos brotes (85,7%) fueron causadas por *Escherichia coli* (*E. coli* O157: H7). Otros patógenos como *Cyclospora* y *Salmonella* también han sido la causa de los brotes vinculados con verduras. (FDA, 2003).

No obstante, y en concordancia con lo expresado por Beuchat (1998), los brotes documentados en países industrializados son más escasos respecto a países en vía de desarrollo, en donde las enfermedades causadas por frutas y vegetales contaminados son frecuentes; sin embargo es de tener en cuenta que en la

mayoría de estos países la investigación no está en un alto grado de desarrollo, sumado a que no existen sistemas fuertes de vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), lo que implica de un lado, que muchos brotes no sean detectados y de otro, que al no existir la cultura de reportarlos, predomine el subregistro.

La contaminación de los vegetales en el campo es muy probable por diversos factores que incluyen el riego con agua contaminada con heces fecales, infiltración de aguas residuales en los campos, presencia de animales en el campo o una fertilización de suelos de forma incorrecta. (FDA/CFSAN2001; Universidad de Maryland; FAO 2002). De igual manera, la contaminación puede darse en la post cosecha, esto es en las etapas de transporte, transformación, en servicios de alimentación e incluso en el hogar. (Beuchat 1998, Harris 2003).

Una amplia variedad de microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos que son frecuentemente asociados con los productos frescos provienen en su mayoría de ambientes entéricos, es decir, que se encuentran en el tracto intestinal y la materia fecal de los animales y el hombre.

Estos incluyen entre otros *Salmonella spp*, *E.coli O157:H7*, *Campylobacter jejuni*. También pueden provenir de otras fuentes como el suelo, agua, vegetales en descomposición, animales; este es el caso de *C. botulinum*, así como de *Listeria monocytogenes*, que además de los entornos ya mencionados, puede ser fácilmente aislada en las instalaciones de procesamiento de alimentos. (Harris *et al.*, 2003). Al mismo tiempo, se han visto comprometidos una variedad de productos vegetales, de donde la lechuga aparece en repetidos casos. (Ver Cuadro 1)

Cuadro 1. Brotes de enfermedades de origen alimenticio asociados con frutas y hortalizas frescas.

Agente	Alimento implicado/sospechoso	Referencia bibliográfica
<i>Bacillus cereus</i>	Semillas germinadas	Portnoy et.al. (1976)
<i>Campylobacter</i>	Pepino	Kirk et al. (1997)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Lechuga	CDC (1998)
<i>Clostridium botulinum</i>	Ensalada de hortalizas	PHLS (1978)
<i>Clostridium botulinum</i>	Tallos de bambú	CDC (1999)
<i>Cryptosporidium</i>	Sidra de manzana	CDR (1991)
<i>Cyclospora</i>	Frambuesas	Herwaldt et al. (1997)
<i>Cyclospora</i>	Albahaca	CDC (1997)
<i>Cyclospora</i>	Frambuesas	CDC (1998)
<i>E. coli</i> O157	Semillas germinadas de rábano	OMS (1996)
<i>E. coli</i> O157	Jugo de manzana	CDC (1996)
<i>E. coli</i> O157	Sidra de manzana	Besser et al. (1993)
<i>E. coli</i> O157	Lechuga iceberg	CDR (1997)
<i>E. coli</i> O157	Semillas germinadas de alfalfa	CDC (1997)
<i>Fasciola hepática</i>	Berros	Hardman (1970)
<i>Giardia</i>	Hortalizas incluidas las zanahorias	Mintz et al. (1993)
<i>Virus de la hepatitis A</i>	Lechuga iceberg	Rosenblum et al. (1990)
<i>Virus de la hepatitis A</i>	Frambuesas	Ramsey et al. (1989)
<i>Virus de la hepatitis A</i>	Fresas o Frutillas	Niu et al. (1992)
<i>Virus de Norwalk</i>	Ensalada rápida	Lieb et al. (1985)
<i>Salmonella agona</i>	Repollo picado y cebollas	Clark et al. (1973)
<i>Salmonella miami</i>	Sandía	Gayler et al. (1955)
<i>Salmonella muenchen</i>	Jugo de naranja	CDC (1999)
<i>Salmonella oranienburg</i>	Sandía	CDC (1979)
<i>Salmonella poona</i>	Melones “Cantaloupe”	CDC (1991)
<i>Salmonella saint-paul</i>	Semillas germinadas de frijoles	O’Mahony et al. (1990)
<i>Salmonella stanley</i>	Semillas germinadas de alfalfa	Mahon et al. (1997)
<i>Salmonella thompson</i>	Hortalizas de raíces y algas secas	Kano et al. (1996)
<i>Shigella flexneri</i>	Ensalada mixta	Dunn et al. (1995)
<i>Shigella sonnei</i>	Lechuga iceberg	Kapperud et al. (1995)
<i>Shigella sonnei</i>	Perejil	CDC (1999)
<i>Shigella sonnei</i>	Ensalada rápida	Martin et al. (1986)

Fuente Universidad de Maryland/FDA, 2002 adaptado de Beuchat 1998).

Con frecuencia los productos agrícolas frescos son identificados como vehículo de patógenos causantes de gastroenteritis humana; las ensaladas que contienen mezclas de vegetales crudos han sido asociadas como la causa de patógenos causantes de la llamada diarrea del viajero. (Beuchat, 1996).

El Departamento de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos FDA, en procura de minimizar la incidencia de brotes de enfermedades transmitidas por productos frescos, emprendió en el 2004 un Plan de Acción de Seguridad de Productos (FDA, 2004); en donde para el 2006 como parte dicho plan, surgió la Iniciativa Plurianual de seguridad de Hojas verdes. El primer año estuvo enfocado a la lechuga, de donde deriva la Iniciativa de Seguridad de la lechuga (FDA, 2006), en respuesta a los recurrentes brotes de *E.coli* O157:H7 asociado con lechugas frescas.

Para el año 2007, el plan enfocado a la seguridad de hojas verdes avanzó incluyendo a las espinacas, al tiempo que dio inicio al mismo trabajo con otros productos como el tomate, creándose así la Iniciativa de Seguridad del Tomate. (FDA, 2009).

En vista del panorama y de los reportes disponibles, La FDA como un mecanismo para disminuir riesgos de enfermedad, centró sus esfuerzos en cinco grupos de productos que categorizó como los responsables básicos de los brotes asociados a frutas y vegetales frescos (CAST, 2009), estos son: melones, lechugas y verduras de hojas verde; tomates, cebollas verdes y hierbas. (FDA, 2007).

Es grande la preocupación con respecto a la inocuidad alimentaria que genera el consumo de productos agrícolas frescos, dado que normalmente se consumen crudos, esto es, no son sometidos a un tratamiento letal previo que elimine los microorganismos presentes. Este hecho ha traído como consecuencia un aumento

en el interés y la atención por tomar medidas que contribuyan a minimizar el riesgo de enfermedades asociadas a este tipo de productos.

El control del riesgo microbiológico implica todo un sistema que abarque la cadena que bien se ha denominado “de la granja a la mesa”; así, las buenas prácticas deben partir desde el cultivo, con las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), incluso antes de la cosecha, pasando por la industria procesadora y transformadora y hasta las etapas de distribución y preparación. Ya en la industria, las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) contemplan varias medidas dirigidas tanto al control sanitario del entorno de procesamiento, incluyendo el personal manipulador, así como procedimientos para la descontaminación de vegetales donde se realizan etapas de lavado y desinfección que logran disminuir la población de microorganismos más no su eliminación total. (Universidad de Maryland; FDA, 2002).

En procura de minimizar el riesgo de enfermedad asociada al consumo de productos agrícolas crudos, en muchas regiones del mundo es combinada la aplicación de buenas prácticas durante la producción, transporte y procesamiento, con la implementación del sistema Análisis de peligros y puntos críticos de control HACCP; no obstante, la posibilidad de contaminación no puede ser totalmente eliminada, por lo que es conveniente implementar mecanismos de descontaminación efectivos.

Existen diversos métodos utilizados para la descontaminación de vegetales, los tradicionales incluyen tratamientos físicos, tratamientos químicos y sus combinaciones.

En los primeros debe tenerse en cuenta que el procedimiento y equipo utilizados sean los apropiados según el tipo de producto e involucran acción mecánica

como el cepillado y aplicación de agua a chorro. Los tratamientos químicos se realizan usualmente durante el enjuague del producto e implican la adición de un agente desinfectante. (Parish *et al.*, 2003).

Desinfectar, según la FDA (1998): *“se refiere al tratamiento aplicado a las frutas y hortalizas que logra destruir o reducir considerablemente la cantidad de microorganismos que constituyen un peligro para la salud, y otros que se desea eliminar, sin alterar la calidad del producto o su inocuidad para el consumidor”*.

En este contexto, cabe destacar la importancia de la etapa de desinfección y de asegurar que esté antecedida por una óptima remoción de suciedad, por cuanto este se convierte en uno de los factores que en gran medida limitan la efectividad del desinfectante.

La eficacia de cada uno de los métodos en la eliminación de microorganismos depende de factores asociados al pH, temperatura, tiempo de contacto, cantidad de materia orgánica presente, así como al tipo, cantidad y estado fisiológico de células bacterianas presentes; naturaleza de los tejidos de frutas y vegetales, entre otros (Beuchat, 1998).

Dentro de los métodos de descontaminación aplicados a la superficie de frutas y vegetales, se destaca la generación y aplicación de ozono tanto en su forma acuosa (aplicado al agua de lavado), como en su forma gaseosa (para el uso en vegetales durante el almacenamiento). Adicionalmente, se han explorado nuevas tecnologías que van desde la desinfección mediante luz UV-C, el uso de ultrasonidos y el tratamiento con agua electrolizada (Gil, 2009); Koseki y colaboradores (2003) han adelantado estudios de aplicación de agua electrolizada en lechuga.

Otro sistema de desinfección que se destaca es la irradiación (radiación ionizante), la cual fue aprobada por la FDA en el año 2008, mediante una modificación de la reglamentación de aditivos alimentarios, que permitió su uso para el control de patógenos y extensión de vida útil en lechugas y espinacas frescas. (FDA, 2008).

Como agentes químicos desinfectantes aplicados a la superficie de frutas y vegetales frescos enteros o picados, se incluyen el cloro, dióxido de cloro, clorito de sodio acidificado, peróxido de hidrógeno, ácido peracético, ácidos orgánicos, entre otros.

El cloro ha sido utilizado con fines de saneamiento en la elaboración de alimentos desde hace varias décadas y es quizás el desinfectante más utilizado en la industria alimentaria. Las dos formas más comunes de cloro libre son el cloro líquido y los hipocloritos, los cuales se han empleado con frecuencia en la desinfección de superficies en producción de plantas de procesamiento, reducción de la población microbiana en el agua utilizada durante la limpieza y empaque, así como para la desinfección de frutas y vegetales enteros o picados. Para este último fin, el cloro ha sido considerado medianamente efectivo y es utilizado normalmente a concentraciones de 50-200 ppm con un tiempo de contacto de 1-2 minutos. (CFSAN/FDA, 2001).

En una solución de cloro están contenidas moléculas de HOCl (ácido hipocloroso) y sus iones H^+ y $-OCl$ en equilibrio. La actividad inhibitoria o letal del cloro depende de la cantidad de cloro libre disponible como HOCl en su forma no disociada; el equilibrio se ve influenciado por la temperatura y muy ampliamente por el pH, de donde a medida que este desciende, el HOCl se ve favorecido. No obstante, en este punto debe considerarse la susceptibilidad a la corrosión que pueden presentar ciertos materiales de superficies y equipos en la industria a pH

bajos. Dado este hecho, controlar el pH resulta un factor determinante en el efecto desinfectante de las soluciones de cloro; el rango óptimo de pH del agua es de 6.0-7.5, por cuanto hay una cantidad suficiente de HOCl para la desinfección, al tiempo que puede minimizarse la corrosión de los equipos. (Parish *et al.*, 2003).

Otros factores influyen negativamente la efectividad del cloro como desinfectante; en contacto con materia orgánica, así como con la exposición a la luz, el aire u otros metales, pierde rápidamente su actividad.

El uso de desinfectantes permitidos para la desinfección de frutas y vegetales en el marco de la legislación, resulta un tanto complejo e incluso incierto y varía según la regulación de cada país.

En Estados Unidos por ejemplo, los sanitizantes aplicados al producto se consideran aditivos y están regulados por el Departamento de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos FDA (James, 2006).

A nivel Europeo no existe una reglamentación única armonizada al respecto, por lo cual cada Estado miembro, basado en la Directiva Europea (89/107/EEC) sobre aditivos alimentarios autorizados, adopta según sus consideraciones los criterios y niveles máximos permitidos. (Gil, MI y colaboradores, 2009).

Por ejemplo, España así como muchos otros países no cuentan con una legislación que regule los sanitizantes de uso en frutas y vegetales frescos; en países como Alemania y Suiza el cloro está prohibido, en contraste con Inglaterra y Francia donde el cloro y sus derivados están autorizados como “Coadyudantes Tecnológicos”, necesarios para el lavado de productos de IV Gama. (Gil, 2007).

Según Reglamento CE N° 1333/2008 (sobre aditivos alimentarios), del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea (2008), los coadyuvantes tecnológicos o coadyuvantes de proceso *“se definen como toda sustancia que no se consume como alimento en sí misma, se utilice intencionadamente en la transformación de materias primas, alimentos o sus ingredientes para cumplir un determinado propósito tecnológico durante el tratamiento o la transformación, y pueda dar lugar a la presencia involuntaria, pero técnicamente inevitable, en el producto final de residuos de la propia sustancia o de sus derivados, a petición de que no presenten ningún riesgo para la salud y no tengan ningún efecto tecnológico en el producto final”*.

En la actualidad, se ha buscado prescindir del amplio uso del cloro y sus derivados, tanto por el riesgo medioambiental que representa, dada la alta cantidad de contaminantes que se vierte a las aguas, así como por el posible riesgo para la salud debido a la formación de compuestos potencialmente cancerígenos (trihalometanos), los cuales son productos de reacción del cloro con la materia orgánica presente en el agua; sin embargo este último hecho no se ha caracterizado plenamente. (Gil y colaboradores, 2009).

Adicionalmente, existe preocupación por las personas que se exponen de manera prolongada al cloro como desinfectante, por cuanto sus vapores pueden causar irritación a la piel y tracto respiratorio.

En la búsqueda de alternativas para sustituir el cloro, los ácidos orgánicos tienen un buen potencial para disminuir la población microbiana de la superficie de frutas y vegetales (Beuchat, 1998); adicionalmente sus beneficios se dirigen a su origen natural, son generalmente reconocidos como inocuos (GRAS) (Akbas and Olmez, 2007; Raftari 2009), y no representan un riesgo mayor para el personal operario

que constantemente está expuesto a su uso tanto al nivel de la industria e incluso a nivel doméstico.

Los ácidos orgánicos se encuentran presentes naturalmente en frutas y hortalizas proporcionándoles cierta protección natural contra la proliferación de patógenos bacterianos dado que muchos de ellos no pueden crecer a valores de pH inferiores a 4.0; también se pueden obtener acumulados después de una fermentación. Dentro los ácidos comúnmente contenidos de manera natural en muchas frutas y vegetales, se encuentran el acético, málico, succínico, tartárico, benzoico y sórbico. (Beuchat 1998, Universidad de Maryland; FAO 2002).

Los ácidos orgánicos actúan retardando el crecimiento de algunos microorganismos y evitando el de otros. Algunos pueden tener actividad fungistática, mientras que otros son más efectivos en la inhibición bacteriana, aunque no han sido claramente definidas las condiciones bajo las cuales son más efectivos. (Parish *et al.*, 2003).

Como un grupo, estos compuestos incluyen principalmente ácidos saturados de cadena monocarboxílica y sus derivados (insaturados, hidroxílicos, fenólicos, y las versiones multicarboxílicas) y a menudo son denominados genéricamente como ácido grasos, ácidos grasos volátiles o ácidos débiles o carboxílicos. (Cherrington *et al.*, Citado por Ricke, 2003).

La acción antimicrobiana de los ácidos orgánicos está relacionada con la reducción del pH y su capacidad de disociación; al llevar a la disminución del pH interno de la célula microbiana por ionización de la molécula de ácido no disociada, se genera una interrupción del transporte de sustrato por alteración de la membrana celular, se inhibe la acción de importantes enzimas bacterianas al tiempo que la célula pierde energía procurando eliminar el exceso de protones

desde su interior. (Canibe, s.f). El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos aumenta, conforme aumenta su concentración, así como la longitud de la cadena de carbono. La eficacia de los ácidos orgánicos como desinfectantes varía ampliamente con el tipo de ácido así como con el tipo de microorganismo. (Universidad de Maryland/FDA, 2002).

Dado que la adición de ácidos orgánicos de manera directa o mediante lavados, ha mostrado que puede llevar a la reducción de microorganismos patógenos; procedimientos simples y cotidianos de aplicación más a nivel del hogar, como el de adicionar jugo de limón a las frutas cortadas, el cual contiene como principal ácido el cítrico, o adicionar vinagre a las ensaladas en el cual predomina el ácido acético, pueden contribuir de alguna manera a disminuir el riesgo de enfermedad asociada a frutas y verduras frescas.(Beuchat,1998)

Actualmente, a nivel comercial existen productos que combinan varios de los ácidos contenidos naturalmente en frutas y vegetales con otros compuestos como extractos de semillas cítricas (Citrosan®), lo que deriva en un efecto antimicrobiano sinérgico, constituyéndolos en alternativas más seguras y de amplia aceptación por parte del consumidor.

Así como el cloro es el desinfectante más utilizado en la industria de IV Gama, o de las frutas y vegetales frescos, también es el desinfectante peor usado. En Colombia no es diferente, no existe una legislación que regule su uso; el cloro es ampliamente utilizado como desinfectante de frutas y vegetales a nivel de la industria procesadora, así como en restaurantes y centros de producción de alimentos, justificado básicamente por su bajo costo y fácil alcance.

En Colombia resulta preocupante la práctica común de no controlar la concentración ni condiciones de uso del cloro, hecho que se evidencia con más

frecuencia en restaurantes y servicios de alimentación industrial, en la desinfección de frutas y vegetales para ensaladas. En muchos casos, el cloro se utiliza indiscriminadamente; al caer en el abuso, además de los posibles efectos para la salud, genera la alteración de las características sensoriales de los productos y con ella el rechazo por parte del consumidor.

El desconocimiento de la química de este compuesto, esto es, de las condiciones óptimas bajo las cuales alcanza su mejor desempeño, lleva en muchos casos a utilizar dosis cada vez más altas que no necesariamente consiguen mayor efectividad.

Ante el panorama expuesto anteriormente sobre el uso y abuso del cloro en Colombia, ligado a la preocupación que deriva del riesgo microbiológico en vegetales frescos, específicamente lechugas y ensaladas que la contienen, por cuanto han sido ampliamente vinculadas a patógenos como *Salmonella spp* y *E.coli*; este proyecto de grado se enfocó en evaluar un producto a base de ácidos orgánicos (Citrosan®), como alternativa de desinfectante para frutas y vegetales frescos.

Concretamente, de una manera experimental el Citrosan® se enfrentó a lechugas frescas inoculadas con cepas de *Salmonella spp* y *E.coli*. El objetivo principal del experimento, fue valorar la capacidad del producto en la disminución de la población de estos patógenos partiendo de una cantidad de microorganismos conocida o inóculo conocido. De la misma manera, se buscaba determinar la concentración y el tiempo de contacto óptimos para el desempeño del producto.

Datos del producto:

Nombre: Citrosan®

Descripción: Desinfectante fungicida y bactericida de origen natural (orgánico).

Composición: Mezcla de ácidos orgánicos (Acido láctico, ácido Cítrico, ácido ascórbico, entre otros, más extractos de semillas cítricas).

FDA/GRAS: 21 CFR 182.20

Lugar de Fabricación: México

Datos del Fabricante:

Nombre: Diken Internacional

Ubicación: Saltillo, Ramos Arizpe

De acuerdo con Beuchat y colaboradores (2003), quienes destacan la importancia de poner en consideración una serie de aspectos a la hora de procurar métodos de evaluación estandarizados para valorar la efectividad de los desinfectantes en la eliminación de microorganismos, la evaluación se estructuró mediante un protocolo en donde se tuvieron en cuenta entre otros factores: la población de cada uno de los patógenos en el inóculo, la composición de los medios de crecimiento de las cepas de los patógenos, las condiciones de almacenamiento de las muestras de lechuga desde el momento de la aplicación del inóculo hasta el tratamiento con desinfectante (Citrosan®); el tiempo y la temperatura en el tratamiento de desinfección, los procedimientos de lavado y la neutralización del desinfectante (Citrosan®) en las lechugas después de su aplicación, así como los procedimientos para el recuento de células viables después del tratamiento.

Con base en la investigación adelantada por Koseki y colaboradores (2003), otros aspectos importantes se tuvieron en cuenta en el método de análisis para la evaluación del desinfectante (Citrosan®) en lechugas frescas, los cuales estuvieron relacionados con el método utilizado para inocular las lechugas así como el punto de inoculación de las mismas.

Para la evaluación del desempeño de los desinfectantes la literatura documenta tres técnicas principales de inoculación de microorganismos patógenos en el producto, estas son: inoculación por inmersión, inoculación in situ (spot en inglés) e inoculación por aspersion (sprinkle en inglés). Los resultados que arrojan estas técnicas varían ampliamente entre ellos.

El método de inmersión consiste en sumergir las muestras en una suspensión de bacterias. El método de inoculación in situ consiste en la colocación de puntos o gotas de una suspensión bacteriana en la superficie del producto con una micropipeta. El tercer método implica rosear con la ayuda de un micropipeta, una suspensión bacteriana en una bolsa de plástico conteniendo el producto, al que se le aplica agitación suave durante un período corto de tiempo. (Koseki, 2003).

La elección de uno u otro de los métodos mencionados para la inoculación de los patógenos, influye en los efectos antimicrobianos de los desinfectantes.

De otro lado, y tal como lo concluyen los estudios de Koseki y colaboradores (2003), juega un papel importante distinguir la superficie de la hoja de lechuga a ser inoculada, es decir la cara interna o la externa, por cuanto la estructura en cada caso puede resultar en un factor que limita o al contrario permite el acceso del desinfectante a los microorganismos inoculados. Los estomas generalmente se encuentran ubicados en la cara interna de la hoja de las lechugas (Alberts, citado por Koseki 2003), por lo tanto más bacterias pueden alojarse en ellos y en esa misma medida no serán accesibles a los desinfectantes, respecto de las inoculadas en la cara externa de la hoja de lechuga. (Koseki, 2003).

En este trabajo de investigación se optó por el método de inoculación in situ o de gota directamente sobre la superficie de las lechugas, al tiempo que en iguales proporciones se inocularon las caras interna y externa de ellas.

3. METODOLOGIA

El método de investigación aplicado al presente estudio corresponde a un método experimental, sustentado en fuentes secundarias de información; la fuente de datos responde a una investigación mixta.

Este estudio se desarrolló a través de un método de análisis con el que se evaluó un desinfectante a base de ácidos orgánicos en la desinfección de lechuga fresca, atendiendo a un protocolo que incluye diferentes técnicas documentadas.

3.1. Protocolo

El desarrollo experimental diferenció tres etapas: Caracterización, pruebas in vitro e inoculación.

Cepas Bacterianas

Como inóculo se utilizó una combinación de suspensiones de dos cepas de *E. coli* (ATCC 8739 y ATCC 25922) y una combinación de suspensiones de dos cepas de *Salmonella spp* (*Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028).

Lechugas

Se utilizaron hojas de lechuga Batavia (*Lactuca sativa*), adquiridas en un punto de abasto local, provenientes de un mismo cultivo y cosechadas el día anterior.

3.1.1. Etapa I. Caracterización

Análisis de caracterización

En esta etapa se realizaron tres repeticiones por triplicado en días diferentes. (Total de muestras 9). Se realizó determinación de *E. coli* e investigación de *Salmonella spp* en lechugas fresca

La determinación de *E.coli* y *Salmonella spp* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Holguín y colaboradores (1998).

Preparación de las lechugas

Las lechugas a analizar se despojaron de sus dos o tres hojas externas, con ayuda de un cuchillo se les retiró el centro de la cabeza y las hojas restantes se lavaron con agua potable a chorro durante 1 minuto. Las hojas intactas lavadas se cortaron en trozos de 5x5 cm con bisturí estéril. (Ver figura 1).



Figura 1. Corte de trozos de lechugas con plantilla estéril

Se pesaron 11 gramos de trozos de hojas de lechuga, se llevaron a 99 ml de Agua Peptona Tamponada (APE) 0.1% para determinación de *E. coli* por técnica de NMP, utilizando Caldo Lauril Sulfato más MUG. La detección de *E.coli* en esta técnica se confirmó mediante prueba de indol por adición de reactivo de Kovac's. Paralelamente se realizó el recuento en placa de *E.coli* utilizando agar cromogénico para coliformes (Agar Chromocult, marca Merck).

Para el aislamiento de *Salmonella spp* se pesaron 25 gramos de trozos de hojas de lechuga, se llevaron a 225 ml de agua peptona tamponada (APT) como medio de enriquecimiento no selectivo con incubación a 37 °C x 24 horas. El enriquecimiento selectivo se realizó en caldo Selenito-Cistina y caldo Rappaport con incubación a 37 °C x 24. La etapa de crecimiento en medios selectivos se realizó sobre placas de agar SS (*Salmonella Shigella*) con incubación a 37 °C x 24 horas.

La confirmación de *Salmonella spp* se realizó mediante tres pruebas bioquímicas: fermentación de azúcares en agar TSI, lisina utilizando el agar LIA y prueba de Citrato, en medios inclinados con incubación a 37 °C x 24 horas.

3.1.2. Etapa II. Prueba in vitro

Preparación del inóculo

Cada una de las cuatro cepas (dos de *E.coli* y dos de *Salmonella spp*) se cultivó individualmente en 10 ml de caldo tripticasa de soya; la incubación se realizó a 37 °C durante 24 horas; posteriormente se realizó transferencia con asa a tres intervalos sucesivos de 24 horas en el mismo caldo.

Una vez transcurrido este tiempo, las células de cada cepa se recogieron por centrifugación (3500 rpm, 15 minutos, 20 °C. Centrífuga Hettich Referencia Rotofix 32 A), y el pellet resultante se resuspendió en 5 ml de buffer fosfato estéril pH 7.2. (Ver Figura 2).

Se combinaron volúmenes iguales de la suspensión de células de cada cepa de *E.coli* y lo mismo se hizo con *Salmonella spp*, con el fin de alcanzar poblaciones aproximadamente iguales de cada una en la combinación del inóculo final. Los inóculos que se obtuvieron de los dos patógenos, se mantuvieron a 22 ± 2°C y se aplicaron dentro de las dos horas posteriores a su preparación.



Figura 2. Centrifugación de cultivos de patógenos

Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-8} en agua peptona estéril (APE) al 0.1% de las suspensiones de cada patógeno individualmente, así como de los patógenos en combinación (*E. coli* separado de *Salmonella spp*). Posteriormente para confirmar las poblaciones de cada uno de los patógenos se realizó por duplicado siembra de 0.1 ml en profundidad utilizando agar tripticasa de soya y se incubó por 24 horas a 37 °C.

Preparación de soluciones del desinfectante a base de mezcla de ácidos orgánicos (Citrosan®)

Se prepararon soluciones del desinfectante a base de ácidos orgánicos (Citrosan®) con agua destilada estéril (30 minutos antes de iniciar la prueba), a tres concentraciones diferentes: 1000, 1200 y 2000 ppm. Como control se utilizó buffer fosfato pH 7.2 y como neutralizante del desinfectante se utilizó Caldo Lethen Modificado (Caldo MLTB marca Difco).

Prueba de evaluación del desempeño del desinfectante a base de ácidos orgánicos (Citrosan®).

Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado. Se evaluaron cuatro tiempos de contacto del desinfectante: 0, 3, 5 y 7 minutos.

A partir de los inóculos obtenidos (10^9 UFC/ml) de los dos patógenos *E. coli* y *Salmonella spp* (por separado), se realizaron diluciones seriadas en agua peptona estéril 0.1% para obtener un inóculo de trabajo con una población de 10^5 UFC/ml. Para confirmar las poblaciones de cada uno de los patógenos se realizó siembra por duplicado de 0.1 ml en profundidad utilizando agar tripticasa de soya y se incubó por 24 horas a 37 °C.

Se tomaron tres tubos con 2 ml de cada concentración de ensayo (1000, 1200 y 2000 ppm) del desinfectante Citrosan® y un cuarto tubo conteniendo 2 ml de buffer fosfato estéril que correspondió al control. A cada uno de estos cuatro tubos se adicionó 0.2 ml del inóculo de trabajo de cada patógeno (combinación de *E. coli* y *Salmonella* por separado).

Al cumplirse los cuatro tiempos de contacto, se transfirió 0.1 ml del contenido de cada uno de tubos a otros cuatro tubos conteniendo 10 ml de Caldo Letheen para neutralizar la acción del desinfectante. Estos tubos se incubaron por 24 horas a 37 °C y al cabo de este tiempo se realizó la lectura por turbiedad. Posteriormente, para la confirmación de crecimiento/no crecimiento a partir de los tubos incubados, se sembró por estría sobre placas de agar tripticasa de soya y se incubó por 24 horas a 37 °C.

3.1.3. Etapa III. Prueba de aplicación en lechugas

En esta etapa se realizaron 3 replicas en días diferentes. Cada serie de lechugas se trabajó por triplicado. (Total de muestras 9).

Se tomaron series de cada una de las repeticiones y se les realizó detección de *Salmonella spp* y recuento de *E.coli*, con el fin de tener una identificación previa de

estos microorganismos en las hojas de lechuga, antes de ser inoculadas con cada uno de los patógenos.

Preparación del inóculo

Cada una de las cuatro cepas (dos de *E.coli* y dos *Salmonella spp*) se cultivó individualmente en 10 ml de caldo tripticasa de soya; la incubación se realizó a 37 °C durante 24 horas; posteriormente se realizó transferencia con asa a tres intervalos sucesivos de 24 horas en el mismo caldo. Una vez transcurrido este tiempo, las células de cada cepa se recogieron por centrifugación (3500 rpm, 15 minutos, 20 °C. Centrífuga Hettich Referencia Rotofix 32 A), y el pellet resultante se resuspendió en 5 ml de buffer fosfato estéril pH 7.2.

Se combinaron volúmenes iguales de la suspensión de células de las dos cepas de *E.coli* y lo mismo se hizo con las dos de *Salmonella spp*, con el fin alcanzar poblaciones aproximadamente iguales de cada una de las dos cepas. Los inóculos en combinación que se obtuvieron de cada uno de los patógenos, se mantuvieron a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se aplicaron dentro de las dos horas posteriores a su preparación.

Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-8} en agua peptona estéril al 0.1%. de las suspensiones de cada patógeno individualmente, así como de los patógenos en combinación (*E. coli* separado de *Salmonella spp*). Posteriormente, para confirmar las poblaciones de cada uno de los patógenos se realizó por duplicado siembra de 0.1 ml en profundidad utilizando agar tripticasa de soya y se incubó por 24 horas a 37 °C.

Procedimiento de inoculación

A partir de los inóculos combinados obtenidos (10^9 UFC/ml) de los dos patógenos *E. coli* y *Salmonella spp* (por separado), se realizaron diluciones seriadas en agua

peptona estéril APE 0.1% para obtener un inóculo de trabajo con una población de 10^5 UFC/ml. Para confirmar las poblaciones de cada uno de los patógenos se realizó siembra por duplicado de 0.1 ml en profundidad utilizando agar tripticasa de soya y se incubó por 24 horas a 37 °C.

Cada uno de los patógenos se inoculó directamente en la superficie de los trozos de hoja lechuga por el método de gota o in situ, utilizando una micropipeta, como se indica a continuación.

Se tomaron series de 10 trozos de hoja de lechuga (5 x 5 cm), la mitad de estos trozos (5 unidades) se inocularon en la cara externa, la otra mitad se inocularon en la cara interna.

A cada trozo se le inoculó una cantidad de 50µml de la suspensión de patógeno, repartidos en 9 gotas con una micropipeta.

Como control positivo se aplicó el mismo procedimiento de inoculación a una serie de 10 trozos de hojas de lechuga que no tuvieron ningún tratamiento con desinfectante.

Para permitir la adhesión de los patógenos a la superficie de la hoja de lechuga, las hojas inoculadas se colocaron en burbujas plásticas semirígidas termoformadas (tipo domo) y se dejaron secar en una cabina de flujo laminar a temperatura ambiente ($20\text{ C} \pm 2^\circ$) durante 2 horas antes del tratamiento con el desinfectante. (Ver Figura 3).

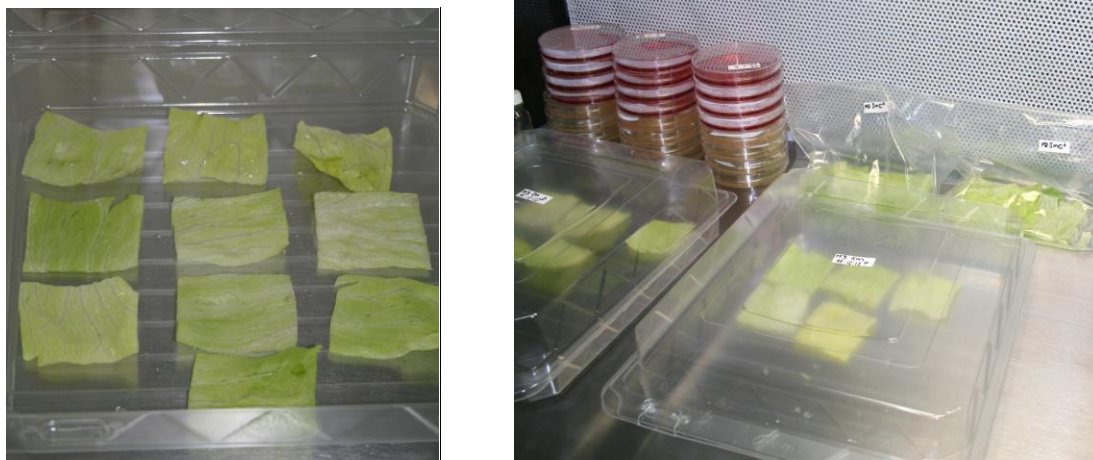


Figura 3. Secado de patógenos sobre lechugas inoculadas

Tratamiento de las lechugas con desinfectante a base de una mezcla de ácidos orgánicos (Citrosan®).

A partir del resultado de evaluación del desempeño del desinfectante realizado en la prueba in vitro (Etapa II), se obtuvo que la concentración del desinfectante y el tiempo de contacto más efectivo en la inactivación de los dos patógenos estudiados fue 2000 ppm y 5 minutos, respectivamente. Estas fueron las dos variables con las que se realizó el tratamiento que se explica a continuación.

10 trozos de hojas lechuga inoculada se sumergieron en un erlenmeyer de vidrio de 2 litros de capacidad, con 1.5 litros de la solución del desinfectante. Posteriormente, el erlenmeyer se llevó a agitación (Agitador magnético Corning PC-420D), a 150 rpm ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 7 minutos a temperatura ambiente (Ver figura 4). Transcurrido este tiempo, los 10 trozos de hojas de lechuga tratadas en la solución desinfectante se retiraron del erlenmeyer, se llevaron a una bolsa de polietileno estéril donde se pesaron e inmediatamente se les adicionó 200 ml de Caldo Lethen para neutralizar la acción del desinfectante. Se procedió a macerar durante 2 minutos a alta velocidad en un stomacher. (MIX2, Marca AES).



Figura 4. Tratamiento con desinfectante de lechugas inoculadas

Una vez transcurrido el tiempo de secado, la serie de lechugas correspondientes al control positivo (inoculadas que no fueron tratadas con desinfectante), se llevaron a una bolsa de polietileno estéril donde se pesaron e inmediatamente se les adicionó 200 ml de agua APE 0.1%; finalmente se llevaron a maceración durante 2 minutos a alta velocidad en un stomacher.

Después del tratamiento con el desinfectante, se procedió de la siguiente manera para determinar la población de cada uno de los patógenos :

Para el recuento de *Salmonella spp*, a partir del homogenizado de lechuga obtenido, se sembró por cuadruplicado 0.25 ml en superficie de placas de agar SS (Salmonella- Shigella); las placas se incubaron a 37 ° C durante 48 horas. Adicionalmente, a partir del mismo homogenizado se realizaron diluciones seriadas en agua peptona estéril al 0.1% hasta 10^{-2} y para las series de lechuga control positivo hasta 10^{-4} . Se sembró por duplicado 0.1 ml en profundidad

utilizando agar SS (Salmonella- Shigella) y se llevó a incubación a 37 °C durante 48 horas.

La confirmación de *Salmonella spp* se realizó mediante tres pruebas bioquímicas: fermentación de azúcares en agar TSI, lisina utilizando el agar LIA y prueba de Citrato, en medios inclinados con incubación a 37 °C x 24 horas.

Para el recuento de *E. coli* se aplicó exactamente el mismo procedimiento adelantado para *Salmonella spp*, con la variación en el medio de cultivo utilizado y el tiempo de incubación; se sembró en agar cromogénico para coliformes (Chromocult marca Merck) y las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La presencia de *E. coli* se confirmó a partir de una transferencia a tubos con caldo cromogénico con MUG para evidenciar producción de gas, fluorescencia e indol mediante adición de reactivo de Kovac's.

3.2. Procesamiento y Análisis de la información

Estimación de la reducción de la población de los patógenos

La reducción de la población de cada uno de los patógenos en la lechuga, se estimó obteniendo la diferencia entre el Log UFC/g del control positivo (lechugas inoculadas y no tratadas con desinfectante) y el Log UFC/g de las lechugas tratadas con el desinfectante Citrosan®.

En la Etapa de caracterización, se estimó un valor intermedio de 5 UFC/g (0.7 Log UFC/g) para aquellos casos donde los recuentos obtenidos de *E.coli* se ubicaron por debajo del límite de detección (< 10 UFC/g). Esto únicamente para efectos del tratamiento estadístico de los datos.

El tratamiento estadístico de los resultados de la etapa de inoculación se realizó aplicando un Modelo lineal generalizado, a través de un análisis de varianza de los distintos factores (Software Statgraphics Centurion XV).

4. RESULTADOS

En la etapa de caracterización, los resultados revelaron ausencia de *Salmonella*/25 g para todas las muestras de lechuga analizadas, en tanto que los niveles de *E.coli* estuvieron en 1.02 ± 0.46 Log UFC/g.

La prueba in vitro realizada por triplicado, mostró la inhibición de los dos patógenos *Salmonella spp* y *E. coli* a una concentración de 2000 ppm del desinfectante Citrosan® y 5 minutos de contacto.

Se pudo inferir que bajo las condiciones ensayo, *E. coli* es más sensible al producto respecto a *Salmonella spp*. Estos resultados se muestran en los cuadros 2 y 3.

Cuadro 2. Resultados prueba in vitro *Salmonella spp*

Tiempo de contacto (minutos)	Tubos positivos <i>Salmonella spp</i>		
	Concentración desinfectante (ppm)		
	1000	1200	2000
0	3	3	3
3	1	3	3
5	0	2	0
7	1	2	1

Cuadro 3. Resultados prueba in vitro *E. coli*

Tiempo de contacto (minutos)	Tubos positivos <i>E. coli</i>		
	Concentración desinfectante (ppm)		
	1000	1200	2000
0	3	3	3
3	1	1	1
5	2	2	0
7	0	1	0

La determinación de *Salmonella spp* antes de la inoculación con los patógenos arrojó ausencia en 25 g para todas las series de lechugas analizadas. En cuanto a *E. coli*, se encontraron poblaciones de 1.04 ± 0.29 Log UFC/g.

Los inóculos de trabajo utilizados estuvieron en 5.45 ± 0.43 Log UFC/ml para las cepas de *E. coli* y 5.40 ± 0.68 Log UFC/ml para las cepas de *Salmonella spp*, partiendo de cultivos de 9.41 ± 0.63 Log UFC/ml y 9.32 ± 0.70 Log UFC/ml, respectivamente.

El cuadro 4 muestra las reducciones de la población de *E. coli* y *Salmonella spp* inoculadas en las lechugas, después del tratamiento con el desinfectante a base de ácidos orgánicos (Citrosan®); fueron de 2.09 ± 0.14 Log UFC/g y 0.98 ± 0.19 Log UFC/g, respectivamente.

Los resultados de reducción de *E. coli* en los recuentos de los controles positivos, respecto de las lechugas tratadas con el desinfectante a base de ácidos orgánicos (Citrosan®), mostraron diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

También se obtuvo diferencia significativa en la reducción de las poblaciones de *Salmonella spp* después del tratamiento con el desinfectante Citrosan®.

Cuadro 4. Efecto de la mezcla de ácidos orgánicos Citrosan® frente a *E. coli* y *Salmonella spp* en lechugas inoculadas.

Patógeno	Control positivo (Log UFC/g)	Tratamiento con Citrosan® (Log UFC/g)	Reducción Logarítmica Log UFC/g
<i>E.coli</i>	$4.44 \pm 0.17^*$	2.36 ± 0.21	2.09 ± 0.14
<i>Salmonella spp</i>	2.33 ± 0.12	1.35 ± 0.25	0.98 ± 0.19

* Cada valor representa el promedio de tres repeticiones \pm la desviación estándar

5. DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados de la prueba *in vitro*, relevaron el mejor desempeño del desinfectante a base de ácidos orgánicos (Citrosan®) en la eliminación de *E.coli* y *Salmonella spp* a una concentración de 2000 ppm y 5 minutos de contacto, respecto a las concentraciones inferiores ensayadas de 1000 y 1200 ppm. Este hecho puede sustentarse por el tamaño de inóculo utilizado (10^5 UFC/g) con los dos patógenos, el cual corresponde a poblaciones altas, de acuerdo con estudios realizados por Koseki y colaboradores (2003), en los cuales diferencia altos inóculos (10^5 - 10^6 UFC/g) de bajos inóculos (10^3 - 10^4 UFC/g). Por su parte Weissinger (2000), distingue poblaciones de 10^3 - 10^4 UFC/g como inóculos altos y de 10^0 - 10^1 UFC/g como inóculos bajos.

En este estudio, la caracterización inicial mostró que las lechugas originalmente contenían poblaciones de *E. coli* que estuvieron entre 10^0 y 10^1 UFC/g, en tanto que la detección de *Salmonella spp* fue negativa en todos los análisis.

Los resultados de recuperación de los patógenos inoculados en los controles positivos revelaron que parte de la población inoculada permaneció en las hojas de lechuga. En este sentido, estudios previos afirman que las bacterias pueden adherirse a la superficie de la hoja de tal forma que es imposible para el desinfectante acceder a ellas. Koseki y colaboradores (2003), realizaron estudios en lechugas que revelan la influencia del método y sitio de inoculación en la eficacia de los desinfectantes, demostrando que se dan amplias diferencias en la recuperación de patógenos a partir de las hojas inoculadas directamente en la superficie interna respecto de la superficie externa. El autor argumenta que los patógenos inoculados en la superficie externa de la hoja son más fácilmente eliminados o removidos por los desinfectantes.

Los estomas generalmente se encuentran en la superficie interna de la hoja (Alberts, citado por Koseki (2003), por lo tanto la inoculación en este punto favorecerá que más bacterias se adhieran a ellos y estén menos expuestas a la acción del desinfectante.

Para este estudio, se aplicó el método de inoculación de los patógenos directamente en las hojas de lechuga, combinando en iguales proporciones los trozos inoculados en la superficie interna como en la superficie externa de la hoja.

Weissinger y colaboradores (2000), realizaron estudios utilizando también el método de inoculación directa; en ellos no se distinguió el sitio inoculado de la superficie de la hoja de lechuga, obteniendo resultados con amplias desviaciones.

Los resultados obtenidos en las pruebas de inoculación, mostraron que la reducción de la población de *Escherichia coli* fue significativamente superior a la que se observó en *Salmonella spp*. Este resultado es congruente con la respuesta obtenida en la prueba in vitro, donde *E. coli* mostró mayor sensibilidad al tratamiento con el desinfectante Citrosan®

6. CONCLUSIONES

1. El tratamiento de lechuga fresca con el desinfectante a base de ácidos orgánicos Citrosan® redujo inóculos altos (10^5 UFC/g) de los patógenos *E. coli* y *Salmonella spp* en 2.09 ± 0.14 Log UFC/g y 0.98 ± 0.19 Log UFC/g, respectivamente. Esta respuesta corresponde a reducciones superiores al 99% para *E. coli* y cercanas al 90% en *Salmonella spp*.
2. Los resultados obtenidos para las dosis de uso evaluadas del Citrosan®, mostraron la mayor efectividad del desinfectante frente a *E. coli* y *Salmonella spp* a una concentración de 2000 ppm.
3. Se determinó que 5 minutos de contacto del desinfectante Citrosan® frente a las cepas de los patógenos *E. coli* y *Salmonella spp*, es el tiempo que produce la mejor acción antimicrobiana a las dosis de uso evaluadas.
4. Los ensayos in vitro y de inoculación demostraron mayor sensibilidad del patógeno *E.coli* respecto a *Salmonella spp* frente al tratamiento de desinfección con Citrosan®.
5. El desinfectante a base de ácidos orgánicos Citrosan® constituye una alternativa efectiva y segura como tratamiento para reducir microorganismos patógenos en vegetales que generalmente se consumen crudos.
6. El procedimiento utilizado en este estudio para determinar la efectividad del Citrosan® en la descontaminación de lechugas, constituye un método para

hacer una evaluación razonable de otros desinfectantes en diferentes vegetales de hoja como la lechuga.

7. La prevención como mecanismo para reducir el riesgo microbiológico asociado al consumo de vegetales frescos aplicado desde el cultivo y hasta el consumidor final, está relacionado con mejores resultados en los tratamientos de desinfección.
8. Concluyo que la responsabilidad de gerenciar programas de inocuidad de alimentos, implica grandes retos que parten desde el conocimiento previo de las necesidades, riesgos e impacto sobre la población; así como innumerables compromisos que demandan de una figura líder, propositiva y dinámica, capaz de lograr una gestión efectiva.
9. El aporte desde la gerencia de inocuidad debe fundamentarse en promover las buenas prácticas a lo largo de la cadena productiva, de esta manera el objetivo de llevar al consumidor productos inocuos, será razonablemente alcanzable, entendiendo que los desinfectantes contribuyen a la reducción de los patógenos presentes más no a la completa eliminación.

7. RECOMENDACIONES

1. Ante los resultados obtenidos respecto a la efectividad del desinfectante Citrosan® en la reducción de las poblaciones de *E. coli* y *Salmonella spp* en lechuga utilizando inóculos altos (10^5 UFC/g), se esperarían niveles superiores de reducción ensayado con inóculos bajos, del orden de 10^3 - 10^4 UFC/ml; por lo tanto resulta conveniente avanzar en estos ensayos.
2. Es pertinente incluir en pruebas futuras a *Listeria monocytogenes* dentro el grupo de patógenos enfrentados a la acción desinfectante del Citrosan®, dada su implicación en enfermedades transmitidas por alimentos asociadas a vegetales crudos.
3. Es de alta relevancia distinguir para la inoculación de microorganismos en este tipo de pruebas, tanto la superficie interna como la externa de la hoja de los vegetales, dada la amplia variabilidad de resultados que pueden presentarse.
4. Se recomienda acompañar con evaluación sensorial las pruebas de evaluación de capacidad desinfectante del Citrosan® aplicado a lechuga a las condiciones de ensayo consideradas en este estudio.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). Anadón Navarro, A; Esteban, MM; Oliver Palou, A; Solen Belenguer, J; López Rodríguez,R. 2010. Informe del Comité Científico de la AESAN sobre Líneas directrices de la documentación precisa para la evaluación de coadyuvantes tecnológicos que se pretenden usar en alimentación humana. Revista del Comité Científico de la AESAN N° 12. p 80. Consultado 20 Abr 2011. Disponible http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/revistas/comite_cientifico_12.pdf
2. Akba, MY; Olmez, H. 2007. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Letters in Applied Microbiology*. 44(6): 573-678. Consultado 20 Abr 2011. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/lam.2007.44.issue-6/issuetoc>
3. Beuchat, L.R 1996. Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Produce Sólo resumen. *Journal Of Food Protection* 59(2):204-216. Consultado 12 Mar 2011. Disponible en <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1996/00000059/00000002/art00018>
4. Beuchat, L.R 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. World Health Organization. WHO/FSF/FOS/98.2. p.1 Consultado 28 Abr 2011. Disponible en http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/surfac_decon/en/.
5. Beuchat, LR; Farber, JN; Garrett, EH; Harris, LJ; Parish, MI; Suslow, TV; Busta, FF. 2003. Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews and Food Science and Food Safety*. 2(s1):174-178. Consultado 26 Abr 2011. Disponible <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00034.x/abstract>
6. Canibe, N; Erigberg, RM; Jensen, BB. s.f. An overview of the effect of organic acids on gut flora and gut health. Institute of Agriculture Sciences. Research Centre Foulum. Denmark. s.e. p. 1. Consultado 29 Abr 2011. Disponible http://poultry.huv.slu.se/chick/organic_acids_canibe_et_al.pdf

7. CAST (Council for Agricultural Science and Technology, U.S) 2009. Food Safety and fresh produce: Un update. CAST Commentary. QTA2009-1. Consultado 18 Mar 2011. Disponible <http://www.jifsan.umd.edu/docs/workshops/producesafety/outbreaks/CAST%20Commentary%20Fresh%20Produce.pdf>
8. CFSAN (Center For Food Safety and Nutrition); FDA (Food and Drug Administration U.S) 2001. Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce. Consultado 20 Mar 2011. Disponible <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091016#execsum>
9. FDA (Food and Drug Administration, U.S); Department of Health and Human Services, U.S; CFSAN (Center of Food Service and Applied Nutrition, U.S) 1998. Directivas para la industria: Guía para reducir al mínimo el riesgo microbiano en los alimentos, para frutas y hortalizas frescas. (en línea). Consultado Abr 12 2011. Disponible <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlanProducts/ucm188933.htm>
10. FDA (Food and Drug Administration, U.S); CFSAN (Center For Food Safety and Nutrition U.S). 2001. Chapter II. Production practices as risk factors in microbial food Safety of fresh and fresh-cut produce. Consultado, 21 Abr 2011. Disponible en http://ucgaps.ucdavis.edu/documents/Preharvest_Factors_and_Risk2041.pdf
11. FDA (Food and Drug Administration, U.S) 2004. Produce Safety From Production to Consumption: 2004 Action Plan to Minimize Foodborne Illness Associated with Fresh Produce Consumption. (en línea). Consultado 21 Abr 2011. Disponible <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/FruitsVegetablesJuices/FDAProduceSafetyActivities/ProduceSafetyActionPlan/ucm129487.htm>
12. FDA (Food and Drug Administration, U.S) 2006. Lettuce Safety Initiative. (en línea). Consultado 21 abril 2011. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/FruitsVegetablesJuices/FDAProduceSafetyActivities/ucm115906.htm>

13. FDA (Food and Drug Administration, U.S) 2007. How FDA works to keep produce safe. (en línea). Consultado 25 Mar 2011. Disponible <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm094555.htm>
14. FDA (Food and Drug Administration, U.S) 2008. FDA Announces final rule amending the food Additive regulations to allow for the irradiation of fresh Iceberg lettuce and fresh spinach. (en línea). Consultado 24 Abr 2011. Disponible <http://www.fda.gov/Food/NewsEvents/ConstituentUpdates/ucm047176.htm>
15. FDA (Food and Drug Administration, U.S) 2009b. Leafy Greens Safety Initiative. 2nd year. (en línea). Consultado 26 Abr 2011. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/FruitsVegetablesJuices/FDAProduceSafetyActivities/ucm115898.htm>
16. Gil, MI. 2007. Murcia. III Congreso Nacional Calidad Alimentaria. Calidad y Seguridad de alimentos de IV gama. Grupo de Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos vegetales. CEBAS-CSIC. España. 56p. Consultado 20 Abr 2011. Disponible <http://calidad.fundacionidea.com/iiicongreso/ponencias/x1330.pdf>
17. Gil, MI; Allende A; López Gálvez, F; Selma, MV. 2009. Hay alternativas al cloro como higienizante para productos de IV Gama?. Revista Horticultura. Extra May. 2009. (en línea). Consultado 3 Abr 2011. Disponible <http://www.horticom.com/pd/article.php?sid=73131>
18. Harris, LJ; Farber, JN; Beuchat, LR; Parish, MI; Suslow, TV; Busta, FF. 2003. Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh- Cut Produce. *Comprehensive Reviews and Food Science and Food Safety*. 2(s1):78-141. Consultado 26 Abr 2011. Disponible <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00031.x/abstract>
19. Holguín Hernández, MS; Rozo, MIH de; Ricaute, BLR de; Llamosa, MV; Muñoz Cajiao, AI; Díaz Figueroa, G. 1998. Manual de Técnicas de Análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano. INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos). Santa Fe de Bogotá, D.C.
20. James, J. ed. 2006. Microbial Hazard identification in fresh fruit and vegetables. (en línea). New Jersey. Wiley. 312 p. Consultado 18 Abr 2011. Disponible

http://books.google.com/books?id=Mk1TdH6K79oC&pg=PA177&lpg=PA177&dq=lagrange+uses+chlorine&source=bl&ots=ygxtZqLsSf&sig=pf-xhHrsIAckPTDNScbtkxzTnvl&hl=es&ei=s0myTZqgFciY0QGZn7CqCQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CBYQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false

21. JIFSAN (Joint Institut of Food Safety and applied Nutrition)/Universidad de Marylan,U.S; FDA (Food and Drug Administration U.S). 2002. Mejorando la seguridad y calidad de frutas y hortalizas frescas: Manual de formación para instructores. Consultado 21 Mar 2011. Disponible <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/bpa/normtec/Frutas/15.pdf>
22. Koseki, S; Yoshida, K; Kamitani Y; Itoh,K. 2003. Influence of inoculation method, spot inoculation site, and inoculation size on the efficacy of acidic electrolyzed water against pathogens on lettuce. *Journal of Food Protection*. 66:(11)2010-2016.
23. Parish, ME; Beuchat, LR; Suslow, TV; Harris, LJ; Garrett, EH; Farber, JN; Busta, FF. 2003. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews and Food Science and Food Safety*. 2(s1):161-173. Consultado 26 Abr 2011. Disponible <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00033.x/abstract>
24. Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. 2008. Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre aditivos alimentarios. Diario Oficial n° L 354 de 31/12/2008 p. 0016 – 0033. (en línea). Consultado 18 Abr 2011. Disponible <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:01:ES:HTML>
25. Raftari, M, Azizi, F; Jalilian, Abdulamir, AS; Son, R; Sekawi, Z; Fatimah, A.B. 2009. Effect of organic acids on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* contaminated meat. *The Open Microbiology Journa*.3:121-127. Consultado 22 Mar 2011. Disponible en <http://www.benthamscience.com/open/tomicroj/articles/V003/121TOMICROJ.pdf>
26. Ricke, SC. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*. 82:(4) 632-639. Consultado 20 Mar 2011. Disponible <http://ps.fass.org/cgi/reprint/82/4/632>
27. Sivapalasingam, S.; Friedman, CR; Cohen, L; Tauxe, RV. 2004. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United

States, 1973 through 1997. Sólo resumen. *Journal of Food Protection* 67:2342-2353. Consultado 10 Abr 2011. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15508656>

28. Wissinger, WR; Chantarapanont, W; Beuchat,LR. 2000. Survival and growth of Salmonella Baidon on shredded lettuce and diced tomatoes, and effectiveness of chlorinated water as a sanitizer. *International Journal of Food microbiology*. 62(1-2):123-31. Consultado 25 Abr 2011. Disponible en <http://www.thaiscience.info/Article%20for%20ThaiScience/Article/1/Ts-1%20survivaland%20growth%20of%20salmonella%20baidon%20in%20shredded%20lettuce%20and%20dicedtomatoes%20and%20effectiveness%20of%20chlorinated%20water%20as%20a%20sanitizer.pdf>

9. ANEXOS

**Anexo 1. ACTA (CHARTER) DEL PROYECTO FINAL DE GRADUACIÓN (PFG)**

Nombre y apellidos: SONIA JAIMES SUAREZ
Lugar de residencia: Medellín, Colombia
Institución: Tecnas S.A
Cargo / puesto: Asesora Técnica División Limpieza, Desinfección e inocuidad

Información principal y autorización del PFG	
Fecha:	Nombre del proyecto: Evaluación de un producto a base de ácidos orgánicos (Citrosan®), frente a <i>E.coli</i> y <i>Salmonella spp</i> , en la desinfección de lechuga fresca.
Áreas de conocimiento: <ul style="list-style-type: none"> - Microbiología de Alimentos - Microbiología de los vegetales - Inocuidad de alimentos 	Áreas de aplicación: <ul style="list-style-type: none"> - Servicios de alimentación industrial - Restaurantes - Plantas de vegetales mínimamente procesados
Fecha de inicio del proyecto: Febrero 7 de 2011	Fecha tentativa de finalización: Mayo 7 de 2011
Tipo de PFG: (tesina / artículo) Tesina	

Objetivos del proyecto:**Objetivo General:**

Determinar la reducción de *E.coli* y *Salmonella spp* sobre lechuga fresca utilizando un producto desinfectante a base de ácidos orgánicos.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la concentración de uso de un producto a base de ácidos orgánicos recomendada por el fabricante en la desinfección de lechuga fresca.
2. Determinar el tiempo de contacto para la desinfección de lechuga fresca con un producto a base de ácidos orgánicos.

Descripción del Proyecto:

Etapa 1. Caracterización de bacterias Coliformes y *Salmonella spp* en lechuga fresca. Lo que se pretende en esta etapa es determinar la prevalencia de estos microorganismos en lechugas frescas antes de un tratamiento de desinfección.

El trabajo de laboratorio se realizará en el Laboratorio de Microbiología de la Fundación INTAL (Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria), el cual es un centro de investigación y formación técnica en el sector Agroalimentario, filial de la compañía para la cual laboro. De esta manera las pruebas de laboratorio se desarrollarán bajo mi dirección y acompañamiento, apoyada en el personal analista (Microbiólogos de Alimentos).

Etapa 2. Pruebas in vitro del poder bactericida del producto a base de ácidos orgánicos utilizando cepas de *E.coli* y *Salmonella spp* para determinación de la concentración y tiempo de contacto.

Etapa 3. Pruebas de uso del producto a base de ácidos orgánicos en la desinfección de lechugas frescas.

La prueba de uso consiste en desinfectar lechugas frescas inoculadas con *E. coli* y *Salmonella spp*, y determinar el efecto de reducción sobre estos microorganismos.

Necesidad del proyecto:

En Colombia el principio activo más utilizado en la desinfección de vegetales es el hipoclorito de sodio, lo que obedece en primera instancia a su bajo costo así como su fácil alcance. En muchos casos se emplea en concentraciones mayores a las permitidas, con el consiguiente riesgo químico para el consumidor, además de las alteraciones organolépticas en los vegetales. Ante este panorama, se hace necesario considerar principios activos como los de origen natural que mitiguen los efectos mencionados.

Justificación de impacto del proyecto:

Los ácidos orgánicos por su carácter natural, al ser usados en propósitos de desinfección de vegetales, ofrecen además de una buena actividad antibacterial, efectos más amigables con quienes los manipulan y consumen aplicados en alimentos, al tiempo que resultan menos agresivos con el medio ambiente y con las superficies con las que entran en contacto.

Restricciones:

N.A

Entregables:

PFG tipo tesina impresa y en medio magnético según requerimientos establecidos.

Identificación de grupos de interés:

Cliente(s) directo(s): Servicios de alimentación industrial, restaurantes, plantas de vegetales mínimamente procesados.

Cliente(s) indirecto(s): público consumidor de vegetales frescos u otros alimentos que los contengan.

<p>Aprobado por (Tutor): Dra. Mayra Márquez González</p>	<p>Firma:</p>
<p>Estudiante: Sonia Jaimes Suárez</p>	<p>Firma:</p>

Anexo 2. Estructura de desglose de trabajo (EDT)

