



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE NUTRICIÓN

“Efecto del aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre la calidad microbiológica de ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo.”

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA
EN NUTRICIÓN**

AUTOR:

IORELA LILIANY SOTO CARRERA

ASESOR:

DR. JORGE LUIS DÍAZ ORTEGA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN

TRUJILLO-PERÚ

2016

Dr. Jaime Polo Gamboa

Presidente

Mg. Karyn Olascuaga Castillo

Secretario

Dr. Jorge Luis Díaz Ortega

Vocal

DEDICATORIA

A Dios por haber guiado mis pasos, haberme protegido y haberme dado la fortaleza para poder realizar mis metas propuestas hasta el día de hoy.

A mis padres Julio y Miriam, porque han sido mi apoyo incondicional en toda mi vida, me han dado todo lo que soy como persona, valores, principios, carácter, empeño, perseverancia y coraje para superar todos los obstáculos que se me presentaron el camino y así poder alcanzar mis metas, es una manera de retribuirles su amor, dedicación hacia mí, llenándolos de gozo al saber que logre lo que más anhelaba.

Fiorela Lilianny Soto Carrera

AGRADECIMIENTO

A Dios, mi guía en todo momento.

A mi Padre; Santos Julio Soto Uriol, por ser mi guía, mi amigo, el mejor hombre del mundo, el cual estuvo en todo momento a mi lado, dándome fuerza para seguir a pesar todas las adversidades que se presentaban, con su ejemplo hizo de mí una mejor mujer y una mejor profesional.

A mi Madre; Adela Miriam Carrera Plasencia, por darme la vida, tenerme paciencia, estar pendiente de mí en todo momento, brindarme su ayuda y estar pendiente en el transcurso de mi carrera, gracias por ser una excelente mujer, esposa y madre con tu ejemplo soy lo que soy hoy en día.

A mi Hermana; Sandra, por compartir tantas vivencias, y por demostrarme a diario que es una buena hermana, a pesar de su poca paciencia.

A mis tíos, Mercedes y Carlos, mis segundos padres, gracias por su amor incondicional, por estar pendientes de mí y por sus consejos, mi más sincero amor para ustedes.

A Emanuel, gracias por apoyarme y entender lo ocupada que a veces podía estar, por tu comprensión, aliento, coraje para ayudarme a ser una persona más fuerte, estar a mi lado a pesar de todos los obstáculos y gracias por tu amor incondicional.

A mis amigas, mis grandes compañeras, mis hermanas por elección en todos estos años, Dalila, Lorena, Litta y Francly, mi más sincero agradecimiento.

A cada uno de los profesores de la escuela profesional de Nutrición de la universidad César Vallejo, quienes me brindaron todos sus conocimientos para mi preparación como profesional, para ellos mi más sincero aprecio y admiración.

A mis profesores Jaime Polo Gamboa y Jorge Díaz Ortega , grandes maestros, fueron parte de mi formación académica, me apoyaron en la realización de mi tesis, y resolvieron las dudas presentadas en la elaboración de esta, Gracias.

A todo el grupo de profesionales del Servicio de Nutrición del centro de salud de Alto Moche, Moche y Hospital de alta Complejidad Virgen de la puerta, gracias por el apoyo incondicional y por participar en mi formación en todo el año de mi internado, gracias.

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Fiorela Lilianny Soto Carrera. Con DNI N° 48028489, a efectos de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Nutrición, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica.

Así mismo, todos los datos e información que se presentan en la investigación de tesis son auténticos.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las Normas Académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, 05 de Diciembre del 2016

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: “Efecto del aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre la calidad microbiológica de ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo”, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Licenciada en Nutrición.

Fiorela Soto Carrera.

INDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO	iv
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	v
PRESENTACIÓN	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN:	1
1.1. Realidad problemática:	1
1.2. Trabajos Previos:.....	2
1.3. Teorías relacionadas al tema:	5
1.4. Formulación al Problema:	13
1.5. Justificación del Estudio:	13
1.6. Hipótesis:.....	14
1.7. Objetivo:.....	14
II. MÉTODO	16
2.1. Diseño de investigación.....	16
2.2. Variables y Operacionalización de Variables.....	16
2.3. Población, muestra y muestreo	18
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.	19
2.5. Métodos de análisis de datos.....	23
III. RESULTADOS.....	24
IV. DISCUSIÓN.....	27
V. CONCLUSIONES.....	31
VI. RECOMENDACIONES	32
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS.....	38

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre la calidad microbiológica de ensaladas frescas expandidas en el Mercado Central de Trujillo. A través de un estudio experimental, determinando el recuento de *Escherichia coli* y *Aerobios mesófilos*, así mismo también determinar la presencia de *Salmonella sp.*, en ensaladas frescas expandidas en el Mercado Central de Trujillo, con aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* a concentración del 100%, se evaluó el recuento de *Escherichia coli* y *Aerobios mesófilos* de 4 muestras de ensaladas frescas procedentes de 03 puestos seleccionados del mercado Central de Trujillo, en tiempos de 1, 2 y 3 horas y un control. Para la recolección de datos se utilizó una ficha de recolección de datos. Los análisis de los resultados se realizaron tanto en el programa SSPS versión 20 y Excel, y como pruebas estadísticas ANOVA y Chi-cuadrado.

Se determinó que el aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka*, disminuye el recuento de *Escherichia coli* y *Aerobios mesófilos* en el tiempo de 1 hora, sin embargo, la carga microbiana de estos microorganismos aumento a las 2 y 3 horas, aunque se mostró apto para el consumo humano. Así mismo el zumo de *Citrus latifolia tanaka* también disminuyo la carga microbiana de *Escherichia coli* y *Aerobios mesófilos* en el tiempo de 1 hora, sin embargo, estas se incrementaron a las 2 y 3 horas, pero hallándose aptos para el consumo humano. Finalmente se determinó que el aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* no produjo inhibición completa de *Salmonella sp.* Se concluye que el aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* no mejora la calidad microbiológica de las ensaladas frescas que se expenden en el mercado Central de Trujillo, por mantenerse la presencia de *Salmonella sp.*

Palabras claves: Aceite esencial, zumo, *Citrus latifolia tanaka*, calidad microbiológica.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of essential oil and juice of *Citrus latifolia tanaka* on the microbiological quality of fresh salads sold at Trujillo Central Market. Through an experimental study, determining the counts of *Escherichia coli* and *Aerobios mesófilos*, as well as determining the presence of *Salmonella sp.*, in fresh salads sold at the Trujillo Central market, with essential oil and juice of *Citrus latifolia tanaka* at 100% concentration, the counts of *Escherichia coli* and *Aerobios mesófilos* of 4 samples of fresh salads from 03 posts selected from the Central market of Trujillo, in times of 1, 2 and 3 hours and a control. Data collection was used to collect data. The analyzes of the results were performed in both the SSPS version 20 and Excel program, and as statistical tests ANOVA and Chi-square.

It was determined that the essential oil of *Citrus latifolia tanaka*, decreases the count of *Escherichia coli* and *Aerobios mesófilos* in the time of 1 hour, however, the microbial load of these microorganisms increased at 2 and 3 hours, although it was suitable for human consumption. Likewise, *Citrus latifolia tanaka* juice also decreased the microbial load of *Escherichia coli* and *Aerobios mesófilos* in the time of 1 hour, however, these increased at 2 and 3 hours, but being fit for human consumption. Finally, it was determined that the essential oil and juice of *Citrus latifolia tanaka* did not produce complete inhibition of *Salmonella sp.* It is concluded that the essential oil and juice of *Citrus latifolia tanaka* does not improve the microbiological quality of the fresh salads that are sold in the Trujillo Central market, due to the presence of *Salmonella sp.*

Key words: Essential oil, juice, *Citrus latifolia tanaka*, microbiological quality.

I. INTRODUCCIÓN:

1.1. Realidad problemática:

En los últimos años se ha investigado mucho sobre las hortalizas y frutas las cuales contienen en su mayoría vitaminas y minerales necesarios para una buena alimentación. Pero a pesar de las muchas propiedades nutritivas se demostró que existe una contaminación dado por diferentes microorganismos como enteroparásitos, bacterias, virus y hongos, y así estos causan enfermedades de transmisión alimentaria que actualmente es un problema de salud pública, el cual es uno de los más importantes a nivel mundial¹. Existen enfermedades que son ocasionadas por la ingesta de agua o alimentos que están contaminados tanto por agentes microbiológicos como químicos, a esto se le atribuye el nombre de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Así mismo esta contaminación puede ser a causas de la deficiencia en el proceso de elaboración, manipulación, conservación, transporte, distribución o comercialización de alimentos y agua, las cuales pueden clasificarse en infecciones o intoxicaciones alimentarias².

Las ETA constituyen actualmente uno de los problemas más importantes de salud pública a nivel mundial¹. Así mismo a nivel mundial, el 33% de las enfermedades transmisibles, son causadas por el consumo de alimentos contaminados, por lo cual el promedio es de 1,500 millones de casos anuales, el 70% se vincula a causas alimentarias³. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en torno a dos millones de personas (en su mayoría niños) fallecen al año originado por enfermedades diarreicas que, en casi el 100%, son contraídas por la ingesta de agua o alimentos contaminados que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas. Ello, causa más de 200 enfermedades de transmisión alimentaria, desde la diarrea hasta el cáncer; razón por la cual, es de vital importancia el tema de la inocuidad alimentaria, que promueve acciones encaminadas a garantizar la seguridad de los alimentos⁴.

En el Perú, se registran anualmente cerca de 1, 700,000 casos de enfermedades infecciosas intestinales, y constituye la tercera causa de morbilidad³, además solo el 38% de los hogares en el Perú tiene acceso a agua libre de coliformes fecales y se ha demostrado la presencia de patógenos bacterianos y parasitarios en alimentos tanto en la capital como provincias², las mismas que guardan relación con una inadecuada manipulación de los alimentos en el hogar, dentro de los servicios de alimentación, micro y pequeñas empresas, entre otros³. Así mismo, las ETA en el Perú afectan principalmente a los sectores más necesitados de la población, originándose aproximadamente el 90% de las mismas, por el consumo de hortalizas en restaurantes, pollerías, escuelas, venta callejera e incluso en el propio hogar, como consecuencia de la mala práctica durante la obtención, recepción, almacenamiento, preparación y suministro final de los alimentos⁵, por lo cual las ETA son indudablemente, un importante problema de salud pública².

Una de las fuentes principales de contaminación de los alimentos es el hombre y también los microorganismos. Así mismo el manipulador se ha considerado una fuente principal de contaminación de los alimentos, porque tiene un contacto directo y permanente con ellos, así como con los utensilios, superficies y equipos utilizados para su transformación. Por ello el riesgo aumenta si la persona padece infecciones de la piel, respiratorias o del tracto gastrointestinal; si a ello se suman malos hábitos de higiene personal y del manejo de productos, se da por hecho que la contaminación de los alimentos, es un problema en lo primordial de personas⁶.

1.2. Trabajos Previos:

Estudios recientes demuestran el efecto antimicrobiano del aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka*, tal es el caso de la investigación de Martínez⁷, que evaluó el efecto antimicrobiano del vinagre blanco y del limón criollo para el control de *Staphylococcus aureus* en ensaladas frescas preparadas en los restaurantes del Programa de Alimentación Escolar (PAE) de San José de Cúcuta. Se identificó de una cepa de *S. aureus* aislada de ensaladas frescas

preparadas en los restaurantes del PAE, se realizó con el método horizontal en el caso del recuento de *Staphylococcus coagulasa* positiva, luego se procedió a la valoración del vinagre blanco y el limón criollo frente al microorganismo en estudio a diferentes concentraciones (25ppm, 50ppm, 75ppm, 100ppm, 200ppm y 500ppm) mediante dos técnicas ecométrica y concentración mínima inhibitoria. Los resultados que se obtuvieron en la prueba de concentración mínima inhibitoria arrojaron que el vinagre blanco como el limón criollo, redujeron la concentración de *S. aureus* sin dilución, y el que presentó mayor inhibición sobre este microorganismo fue el limón criollo, mostrando un halo de 30 mm, así reduciendo la carga microbiana principalmente de *Staphylococcus aureus*, así mismo también logró mantener las características organolépticas.

Asimismo, Picón et al⁸, en este estudio se propone como objetivo evaluar las propiedades antimicrobianas de tres subproductos cítricos; mandarina, naranja y limón, frente a dos patógenos como *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, bajo diferentes condiciones de incubación: temperatura y concentración de subproducto. El resultado que se obtuvo concluyó que todos los productos presentan efecto bacteriostático y/o bactericida, pero la mandarina fue más efectiva frente a los microorganismos mencionados. Se halló que estos productos tienen capacidad antimicrobiana positiva, pudiendo actuar como barrera a la proliferación microbiana, adicionados en bebidas pasteurizadas, prolongando la vida útil en refrigeración.

En otras investigaciones como en la de Najwa et al⁹, el objetivo fue aislar e identificar dos aceites esenciales por método de destilación hidráulica a partir de dos muestras de limón de las frutas importadas recogidos de supermercado local y evaluar su actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas a través del método de difusión en disco. El aceite esencial se obtiene a partir de muestras de frutas de limón de Turquía e India por el método de destilación hidráulica utilizando un aparato tipo Clevenger. Ambos aceites esenciales identificados fueron aislados por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) y se determinó su actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias patógenas a través del método de

gel de agar. Se identificaron 22 ingredientes bioactivos con diferente porcentaje basado en el tiempo de retención de GC de limón Turco e Indio recogidos de un supermercado local. Los ingredientes bioactivos predominantes en alto porcentaje en el aceite esencial del limón de Turquía, fueron DL-limoneno (78,92%), α -pineno (5.08%), L- α -terpineol (4.61%), β -mirceno (1.75%), β -pineno (1.47%) y β -linalool (0.95%) y en el aceite esencial de India eran DL-limoneno (53.57%), L- α -terpineol (15.15%), β -pineno (7.44%), α -terpinoleno (4.33%), terpineno-4-ol (3.55%), cimeno (2.88%) y E-citral (2.38%) respectivamente. Ambos aceites esenciales aislados por destilación se utilizaron para el estudio de la actividad antimicrobiana frente a cuatro cepas de bacterias patógenas tales como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Proteus vulgaris* (*Pseudomonas vulgaris*). Casi todas las cepas bacterianas no dieron ninguna actividad frente a los aceites esenciales utilizados en diferentes concentraciones. Cada aceite esencial se sometió a dilución en serie mediante el uso de sulfóxido de dimetilo (DMSO) como disolvente para dar concentraciones 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, y 0,25 soluciones mg/ml. La amoxicilina fue utilizada como un estándar para este estudio a la concentración a 1 mg/ml. Cada concentración de aceite esencial se puso a prueba para determinar su actividad antimicrobiana contra un gramo (TH) bacterias (*S. aureus*) y tres gramos (-) Bacterias (*E. coli*, *P. vulgaris* y *P. aeruginosa*) en placas de agar nutriente. Por lo tanto, los resultados obtenidos mostraron que ambos aceites esenciales podrían ser necesarios en estudio biológico y su mecanismo de acción.

En la investigación realizada por Herrera¹⁰, se buscó comprobar si la cáscara de los frutos *Citrus latifolia* y *Citrus sinensis*, poseen propiedades antimicrobianas sobre miembros de cuatro géneros bacterianos que poseen gran importancia clínica, debido a su afinidad por causar infecciones en el ser humano. Estas bacterias son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae*. El aceite esencial de la cáscara de naranja y limón, de la especie cultivada en la región de Martínez de la Torre Ver, fue obtenido con el método destilación por arrastre de vapor, done

las diluciones manejadas fueron 1:10, 1:100 y 100% aceite esencial. Su análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) permitió identificar como componente volátil mayoritario al monoterpeno oxigenado limoneno y con los resultados obtenidos de la espectroscopia infrarroja con la Transformada de Fourier se identificaron los grupos funcionales correspondientes a los componentes encontrados en el estudio HPLC. Los resultados muestran que el aceite esencial de limón obtenido a partir de la cáscara fresca de limón persa presenta actividad antibacteriana para cuatro cepas las cuales son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae*, y el aceite esencial de naranja dulce demostró que tiene actividad antibacteriana para tres cepas *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae*.

Por su parte Pires et al¹¹, quien realizó una investigación con el fin de evaluar el efecto inhibitor de los aceites esenciales de la cáscara y de la hoja de la fruta cítrica *limonia Osbeck* (lima Rangpur), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) *Swingle* (limón-Gallego) y *Citrus latifolia Tanaka* (Limón-Tahití), los experimentos se llevaron a cabo utilizando la técnica de difusión de la placa de cultivo agar con la bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y la levadura *Candida utilis*. Las concentraciones usadas fueron 10, 20, 40, 80 y 160 l/ml de cada aceite diluido en etanol. Para *Penicillium expansum* donde se realizaron cultivos en placas estándar, y sin la presencia de aceites. En ensayos *in vitro*, los aceites esenciales promueven la inhibición de todas las bandas microorganismos probados, y los mayores halos se produjeron en la levadura *C. utilis*. En las bacterias, el aceite indujo inhibición mejorada de *S. aureus* de *E. coli* y *P. aeruginosa*. El efecto inhibitor de aceites cítricos fue eficaz en el hongo *P. expansum* a diferencia del aceite de limón y el aceite de clavo de olor, el cuál mostró un efecto estimulante para el crecimiento.

1.3. Teorías relacionadas al tema:

En su mayoría, las frutas contienen una gran cantidad de jugo que tienen niveles altos de ácido cítrico, vitamina C¹², la cual se halla en la pulpa y el

zumos¹³. También contiene minerales, además de pectina y aceites esenciales que contienen principalmente monoterpenos en la cáscara, es un gran atributo para las propiedades terapéuticas¹². El Limón Persa pertenece a la variedad de las limas ácidas. Se origina de la especie *Citrus latifolia* y corresponde a la familia de las *Nutriceae*. Así mismo el fruto del limón consta de 10 a 12 segmentos con pulpa de grano fino que es de color amarillento verdoso pálido, muy ácida y aromática, es ligeramente ovalado, de 5 a 7 cm de largo y de 4 a 6 cm de diámetro. La fruta de este tamaño tiene un peso mínimo de 55 g y máximo de 75 g, que se logra cuando la planta está entre los 90 a 120 días después de la floración, que dependerá del clima y el manejo agronómico¹³. Así mismo es de piel fina muy lustrosa¹⁴.

La maduración estándar se da acuerdo con estándares establecidos por Departamento de Agricultura de Estados Unidos (U.S.D.A.) sobre un contenido mínimo de jugo del 42%. La cáscara del fruto tiene un espesor de 2 a 3 mm, el fruto usualmente tiene una papilla o pezón al final del estilo, variando considerablemente en tamaño y forma. En el caso de frutos maduros contienen del 40 al 60 % de jugo, la cual tiene una acidez del 5 al 6%, y contiene entre 20 a 40 mg de ácido ascórbico por 100 ml de jugo¹³.

El fruto está conformado por 3 partes, primero se encuentra la cáscara que está conformada por el epicarpo, que también se le llama flavedo, en esta parte se encuentran pigmentos y glándulas de aceites esenciales; como segunda parte se encuentra el mesocarpo, que tiene un aspecto esponjoso, también es llamado albedo por ser de color blanco, y que está unido al flavedo; y por último se encuentra el endocarpo, esta parte es membranosa, forma la pulpa comestible. En esta se encuentran porciones que son denominados gajos. Cada gajo corresponde a un carpelo y está rodeado por una membrana carpelar. En su interior encontramos las vesículas formadas por células de paredes finas, llenas de jugo, y las semillas¹⁴.

El limón tiene una acción terapéutica preventiva y curativa. Esta fruta contiene ciertos nutrientes, en el siguiente cuadro se plasma de forma

minuciosa el contenido de componentes nutritivos del jugo de limón que es similar a la lima Tahití¹³. (ANEXO 01).

En estudios realizados sobre la composición química del limón por medio de la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se analizó la composición del aceite esencial, el cual se identificó como componentes mayoritarios el limoneno¹⁵. Cabe resaltar, que en la Amazonía como en los valles costeros de nuestro país hay una gran producción de cítricos como la lima dulce, limón Tahití, limón rugoso y mandarina cleopatra los efectos beneficiosos del consumo de frutos cítricos sobre la salud humana están basados en sus propiedades antioxidantes y anti-radical de los componentes de los frutos cítricos como el ácido ascórbico, , otros metabolitos con actividad biológica presentes en el género *Citrus* son los compuestos fenólicos, como los flavonoides, carotenoides, antocianinas, los derivados del ácido cinámico, entre otros¹⁶.

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos¹⁷, hidrófobo la cual contiene compuestos volátiles aromáticos, las cuales tiene cierta propiedad antimicrobiana, estos suelen ser derivados de tejidos vegetales que se han conseguido a partir de diferentes partes de las plantas entre ellas están las flores, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos, semillas y raíces. Son mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Así mismo, son compuestos olorosos, que tiene mucha solubilidad en alcohol y son muy poco solubles en agua. Se halló que para poder extraer estos compuestos hay distintos solventes que se pueden utilizar (acetato, etanol, y cloruro de etileno), estos tienen un olor propio a la planta de origen y la técnica que usualmente se utiliza para extraer el aceite esencial es destilación por arrastre con vapor. Por otro lado, los aceites esenciales contienen en su composición ciertos compuestos que son principalmente cadenas cortas de hidrocarburos complementados con oxígeno, nitrógeno y/o átomos de azufre, unidos en diversos puntos de la cadena¹⁸.

El aceite esencial de limón contiene vitaminas, así mismo tiene propiedad de aumentar la producción de glóbulos blancos. Por lo cual, se puede emplear

para a fortalecer el sistema inmunológico, también posee propiedades astringentes¹⁹.

En el limón y otros cítricos, el aceite está presente en las glándulas situadas en flavedo, región del epicarpio de los frutos cítricos que están presentes los carotenoides que diferencian los colores de la corteza de cada especie²⁰.

Los aceites esenciales, son conocidos también por su actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos¹⁸. En la actualidad son pocos los estudios sobre la actividad antimicrobiana de aceites esenciales en alimentos. Sin embargo, en investigaciones elaboradas se ha conseguido ver que los aceites esenciales “*in vitro*” son muy eficaces y que habitualmente son mucho mayor en alimentos. Se encontró que la aplicación de aceites esenciales de cierto cítricos como mandarina, cidra, limón y lima, aumentaron la vida útil de ensalada de frutas y redujeron la carga microbiana, sin alterar las características sensoriales del producto¹⁷.

En cuanto a su modo de acción, se ha podido encontrar que los aceites esenciales tienen componentes que afectan funciones metabólicas en la célula microbiana, como la respiración o la producción de toxinas o ácidos; también se logró encontrar en estudios que los aceites esenciales pueden inducir un deterioro importante en la pared celular, un daño en la membrana citoplasmática, daño a las proteínas esenciales de la membrana, filtración de los contenidos celulares, coagulación del citoplasma, agotamiento de las fuerzas motrices de los protones, daño en diversos sistemas enzimáticos y cambios en la funcionalidad del material genético de la célula¹⁸.

El término hortaliza es usado para referirse a un grupo bastante numeroso de plantas herbáceas cultivadas, los productos pueden consumirse directamente sin necesidad de cocción o procesamiento industrial²¹. Las hortalizas se clasifican según la parte que es comestible y estas son: hortalizas de raíz comestible (zanahoria, betarraga, rábano); hortalizas de hoja comestible (apio, perejil, acelga, espinaca, repollo, lechuga, hojas de cebolla); hortalizas de tallos y bulbos comestibles (cebolla, ajo); hortalizas de flor – coles comestibles (coliflor, brócoli, alcachofa); hortalizas de fruto

comestibles (tomate, pepino, zapallo, vainita, haba, arveja, locoto, ajíes, pimentón, berenjena)²².

La composición química global de las hortalizas, presentan múltiples características favorables como un elevado contenido en agua (aproximadamente un 80% de su peso) y un bajo contenido calórico, los cuales se dividen en grupos según la cantidad de glúcidos entre ellos se encuentra el grupo A: donde > 5% de hidratos de carbono pertenecen a este grupo la acelga, el apio, la espinaca, la berenjena, la coliflor, la lechuga, el pimiento, el rábano, también está el grupo B: que contienen entre 5 a 10% aquí se encuentra la alcachofa, guisante, cebolla, nabo, puerro, zanahoria, remolacha y por ultimo está el grupo C que su contenido es < 10% de hidratos de carbono como la mandioca). Dentro de las vitaminas y minerales se encuentra la vitamina A, esta está en casi la mayoría de las hortalizas en forma de provitamina, principalmente en zanahorias, espinacas y perejil. Así mismo son ricas en vitamina C, entre ellas se encuentran el pimiento, perejil, coles de Bruselas y brócoli. También está la vitamina E y vitamina K, en el caso de estas vitaminas se halla menos cantidad, estas se encuentran en guisantes y espinacas, como representante de las vitaminas del grupo B, se tiene el ácido fólico que se encuentra en las hojas de las hortalizas verdes. El potasio abunda en la remolacha y la coliflor; el magnesio en espinacas y acelgas. En cuanto a los lípidos y proteínas: Presentan un contenido bajo de estos macro nutrientes. El valor calórico que contienen las hortalizas es bajo, la mayoría no superan las 50 calorías por 100 g. Estas propiedades mencionadas anteriormente hacen que las hortalizas sean consumidas diariamente, así mismo se recomienda consumir una ración en cada comida y de que haya variedad. Por eso las hortalizas ocupan el segundo piso, junto con las frutas, en la pirámide de los alimentos²³.

Es por ello que el consumo de frutas y hortalizas frescas es parte importante en una dieta saludable, desde el punto de vista microbiológico son alimentos comparativamente de menor riesgo que las carnes y los productos lácteos²⁴. Las hortalizas frescas están sometidas a todo tipo de contaminaciones, cuyas fuentes pueden situarse antes o después de la recolección, durante el

cultivo en el campo o en invernadero, en el curso de la recolección, durante las operaciones de acondicionamiento, manipulación, transporte y distribución. Con respecto a las contaminaciones microbianas, al mismo tiempo que los microorganismos de alteración, responsables de la podredumbre, de la pérdida de aspecto, de gusto, de olor o de textura, se pueden transportar bacterias, virus o parásitos patógenos para el hombre²³.

La producción de alimentos frescos, sin aplicar adecuados procesos de saneamiento presenta una alta probabilidad de contaminación por microorganismos. Los productos vegetales tienen una flora microbiana propia, que resulta porcentualmente baja frente a la flora adquirida procedente de la contaminación del ambiente (agua, suelo, desechos animales y humanos). Entre los microorganismos que pueden estar presentes están: Bacterias (*coliformes*, *Salmonella*), Parásitos (*Giardia spp.*), Virus (hepatitis A) y algunos hongos capaces de producir toxinas. La mayoría de estos microorganismos tienen la capacidad de captar los nutrientes y metabolizarlos para formar un gran número de productos finales y con frecuencia reaccionan a los cambios del medio ambiente y se adaptan a nuevos ambientes, siendo potencialmente peligrosos para la salud²⁵. Consumir verduras contaminadas con microorganismos es una fuente de enfermedades de transmisión alimentaria¹.

Los microorganismos son seres vivos muy pequeños. Las bacterias, los virus, las levaduras, los mohos y los parásitos son microorganismos, la mayoría no cambian el aspecto de los alimentos, por lo que, en general, solo con mirar, oler o probar un alimento no se puede saber si está contaminado. En los campos de cultivo, esta contaminación se da directamente de la materia fecal, e indirectamente se da por malas prácticas de higiene de los trabajadores; la presencia de heces humanas y animales, en los campos de cultivo; el uso de residuos fecales no tratados como fertilizante; unas fuentes de agua contaminadas, y el uso de equipos de cosecha, recipientes e instalaciones de almacenamiento sucios¹. Por el contrario, en investigaciones se dan reportes de contaminación de aguas de uso agrícola en algunas zonas productivas periurbanas de Lima y Cajamarca, se encontró

coliformes fecales con valores superiores al límite de los estándares nacionales e internacionales para aguas de riego (>106 NMP/ 100mL), donde también se encontró *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *G. lamblia*, *Ciclospora sp.*, *Criptosporidium sp.* y otros potencialmente patógenos²⁶.

La denominación de coliformes se le otorga a todo aquel grupo de bacterias que tienen ciertas características bioquímicas en común y son de mucha importancia como indicadores de contaminación del agua y de los alimentos, sin embargo, el nombre de coliformes totales comprenden la totalidad del grupo²⁵. Son bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Del grupo *coliforme* se encuentran: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, etc²⁸, estos se hallan en el intestino del hombre y los animales, así mismo también se pueden encontrar en el suelo, plantas, cáscara de huevo, etc²⁷. La presencia y abundancia de coliformes en alimentos generalmente es considerada con un triple significado en microbiología sanitaria, como indicadores de contaminación fecal o de malas prácticas de trabajo en el manejo de los alimentos²⁵.

Los *coliformes fecales* integran el grupo de los *coliformes totales*, pero son diferentes a los otros porque son indol positivo, así mismo el rango de temperatura óptima de crecimiento es muy amplio (hasta 45°C) y son de mejor indicador para alimentos y agua, estos indican presencia de contaminación fecal de origen humano o animal, ya que estos provienen de las heces, también están presentes en la flora intestinal y de ellos entre un 90% y un 100% son *E. coli* mientras que en aguas residuales y muestras contaminadas este porcentaje disminuye a un 59%²⁸. En este grupo la principal bacteria que representa la meta de identificación es *Escherichia coli*, es un bacilo corto, Gram negativo, con una sola cadena espiral de ADN, anaerobio facultativo, móvil con flagelos peritricos, tiene información genética en los plásmidos, que son responsables de la producción de toxinas y de la resistencia a los antimicrobianos. La mayoría de las bacterias pertenecientes a la especie *E. coli*, forman parte de la microflora normal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, encontrándose habitualmente en sus heces. Ciertas cepas de *E. coli* pueden producir

enteritis o gastroenteritis y se agrupan en seis categorías de acuerdo a su mecanismo patogénico: Entre estas cepas están: *E. coli enteropatógena (EPEC)*, *E. coli enterotoxigénica (ETEC)*, *E. coli enteroinvasiva (EIEC)*, *E. coli enterohemorrágica (EHEC)*, *E. coli enteroagregante (EAEC)* y *E. coli difusamente adherente (DAEC)*²⁵.

Los microorganismos *mesófilos* son un grupo que se incluyen todos los microorganismos, capaces de desarrollar en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una óptima entre 30°C y 40°C²⁹. Casi todos los microorganismos pertenecen a esta clase, casi todos los agentes patógenos humanos son mesófilos, pues casi de forma constante la temperatura corporal es de 37° C³⁰. En cuando al recuento de *A. mesófilos*, se considera la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. Así mismo manifiesta la calidad sanitaria de los productos analizados, indicando además de las condiciones higiénicas, la forma como fueron manipulados durante su elaboración²⁹. Un recuento elevado de *mesófilos* puede significar, excesiva contaminación de la materia prima, deficiente manipulación durante el proceso de elaboración, la posibilidad de que existan patógenos, pues estos son mesófilos, la inmediata alteración del producto²⁹.

Otro de los microorganismos que se encuentra en los alimentos es la *Salmonella* que pertenece a un grupo de bacterias que están presentes en el intestino de personas y animales sanos, de forma que las heces son el principal foco de contaminación a los alimentos y al agua. Cuando llega a los alimentos frescos, tiene la habilidad de multiplicarse muy rápidamente, y cuando una persona ingiere dicho alimento contaminando, el gran número de bacterias provoca “salmonelosis”, infección gastrointestinal provocada por dicha bacteria³¹. Se estima que afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones. Hasta el presente se han identificado más de 2.500 cepas diferentes (llamadas “serotipos” o “variantes séricas”) de *Salmonella spp.* La *Salmonella* es una bacteria omnipresente y resistente que puede sobrevivir varias semanas en un entorno seco, y varios meses en agua³².

La comisión del *Codex alimentarius* deja entrever, que las verduras tienen como origen su contaminación en el riego por aguas servidas; también, se indica evitar el contacto de estas aguas con las verduras para así tener una mejor conservación del alimento y evitar la proliferación de microorganismos. Varias investigaciones microbiológicas y epidemiológicas en el mundo, concuerdan en que el consumo de verduras frescas es un factor importante en la transmisión y diseminación de microorganismos patógenos²⁶.

En el Perú, hoy en día es muy insuficiente el control sanitario de aguas y alimentos porque hay conciencia del problema, y no hay una normatividad acorde a él, por una escasa articulación entre la investigación científica y las necesidades y demandas de la producción agrícola y pecuaria; y se suma las limitaciones económicas y políticas²⁶.

1.4. Formulación al Problema:

¿Cuál es el efecto del aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre la calidad microbiológica de ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo?

1.5. Justificación del Estudio:

Los hábitos alimentarios son adquiridos a lo largo de la vida, la cual influyen en la salud de todas las personas. Llevar una dieta equilibrada y variada nos ayuda a contribuir en la salud de nosotros mismos. A lo largo de mi carrera he observado que las personas y sus familias le restan importancia a un grupo de alimentos, la cual es vital para su salud como lo son las verduras, hoy en día se ha hablado mucho de la contaminación tanto en el riego de las mismas como en su manipulación generando así controversias y miedo de consumirlas ya que podrían originar enfermedades de origen microbiológico, esto ha llevado a la búsqueda de nuevas investigaciones como estudiar el efecto que puedan tener diferentes productos naturales para la estabilidad microbiológica de los alimentos; es por ello que en este trabajo de investigación se ha considerado de gran importancia estudiar el aceite esencial y el zumo extrayéndolo de *Citrus latifolia tanaka* y utilizarlos

como agente antimicrobiano natural, para contrarrestar el crecimiento de bacterias como *E. coli*, *mesòfilos* y *Salmonella*. Así mismo el presente trabajo a realizar proporcionara a los profesionales de la salud y a las personas en general información necesaria para tomarlo en cuenta en las recomendaciones adecuadas de una alimentación balanceada.

1.6. Hipótesis:

H₁: El aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* mejora la calidad microbiológica de ensaladas frescas expendidas en el mercado Central de Trujillo.

H₀: El aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* no mejora la calidad microbiológica de ensaladas frescas expendidas en el mercado Central de Trujillo.

1.7. Objetivo:

Objetivo General:

- Evaluar el efecto del aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre la calidad microbiológica de ensaladas frescas expendidas en el Mercado Central de Trujillo.

Objetivos específicos:

- Determinar el efecto del aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* sobre el recuento de *Escherichia coli* y *Aerobios mesófilos* en ensaladas frescas expendidas en el mercado Central de Trujillo, según tiempo.
- Determinar el efecto del zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre el recuento de *Escherichia coli* y *Aerobios mesófilos* en ensaladas frescas expendidas en el mercado Central de Trujillo, según tiempo.

- Determinar el efecto del aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* sobre *Salmonella sp.*, en ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo, según tiempo.
- Determinar el efecto del zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre *Salmonella sp.*, en ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo, según tiempo.

II. MÉTODO

2.1. Diseño de investigación

Diseño experimental post prueba, con grupo control y grupos experimentales.

G → O₁

G $\xrightarrow[t=1h]{X}$ O₂

G $\xrightarrow[t=2h]{X}$ O₃

G $\xrightarrow[t=3h]{X}$ O₄

Dónde:

G = Cultivo de microorganismos procedentes de ensaladas expandidas en el mercado Central de Trujillo.

X = Aceite esencial o zumo de *Citrus latifolia tanaka*.

t = Tiempo

O₁, O₂, O₃, O₄ = Observaciones del recuento de *Escherichia coli* y *Aerobios mesófilos* y presencia de *Salmonella sp.*

2.2. Variables y Operacionalización de Variables.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición
Aceite esencial de <i>Citrus latifolia tanaka</i>	El aceite esencial es el aceite volátil y oloroso de la planta, producido por glándulas secretoras o células	Se consideró 1 concentración del aceite esencial de <i>Citrus latifolia tanaka</i> .	Concentración de: 100%	Cuantitativa discreta

	especializadas. Los aceites esenciales son el resultado del metabolismo secundario de las plantas ³³ .			
Zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i>	Por zumo (jugo) se entiende el líquido sin fermentar, que se obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas ³⁴ .	Se consideró 1 concentración del zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> .	Concentración de: 100%	Cuantitativa discreta
Calidad microbiológica	Es un elemento de evaluación de la satisfacción de los requisitos microbiológicos, es necesario aplicar pasos ordenados a través de la cadena de producción, empezando por los insumos ³⁵ .	Se realizó teniendo en cuenta los parámetros establecidos por el control de límites microbianos según la norma técnica NTS 071 – 2008 – MINSA para criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas	<i>E. coli</i> < 10 UFC/g Apto para el consumo 10 a 100 UFC/g en riesgo > 100 UFC/g No apto para el consumo <i>Mesófilos</i> < 10 ⁴ UFC/g	Cualitativa ordinal

		de consumo humano ^{35,36} .	Apto para el consumo	
		<i>E. coli</i> con Agar Mac Conkey. Se consideró la norma técnica NTS 071 – 2008 – MINSA ³⁶ .	10 ⁴ a 10 ⁶ UFC/g en riesgo >10 ⁶ UFC/g No apto para el consumo	
		<i>Mesófilos</i> en Agar PCA. Se consideró la norma técnica NTS 071 – 2008 – MINSA ³⁶ .	Ausencia de <i>Salmonella sp.</i> en 25g: Apto para el consumo	
		<i>Salmonella</i> en Agar Bismuto Sulfito. Se consideró la norma técnica NTS 071 – 2008 – MINSA ³⁶ .	Presencia de <i>Salmonella sp.</i> en 25g: No apto para el consumo	

2.3. Población, muestra y muestreo

Población:

La población en estudio es: ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo.

Muestra:

Se trabajó con una muestra por conveniencia correspondiente a 3 puestos – obteniéndose de cada uno 4 muestras para el análisis de calidad microbiológica correspondiente a aceite esencial y para zumo de *Citrus latifolia tanaka*.

Muestreo:

Muestreo no probabilístico, aleatorio por conveniencia.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.

Para cumplir los objetivos de la investigación se aplicó la siguiente técnica, con su correspondiente instrumento:

Técnicas:

- Observación. - Se realizó la observación directa.

Instrumento:

- Se utilizó una ficha de recolección de datos la cual se consideró la solución a utilizar, las bacterias, el número de muestra, tiempo, y concentración.

Procedimiento de recolección de datos**Preparación del aceite esencial: (Técnica de arrastre de vapor de agua)**

La destilación por arrastre con vapor que se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y adicionar tensión de vapor a la de los componentes volátiles del aceite esencial; los vapores que salen de la cámara extractora se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite finalmente se separan en un dispositivo decantador o vaso florentino³⁷.

La extracción se realizó en un montaje a escala de laboratorio constituido por: el generador de vapor, la cámara de extracción, el condensador y separador de aceite³⁸.

1. La cáscara de limón se secó en la estufa a 45° C, durante 4 – 5 días.
2. Se fragmentó por estrujamiento, hasta obtener partes muy pequeñas.

Se colocó la muestra en un bolo donde se inyectó directamente vapor saturado de agua, el cual sale a través de un desfogue directo a un condensador obteniéndose como condensada agua y extracto oleoso en una pera de decantación, decantándose el agua quedando el extracto de aceite para ser utilizado.

Preparación de la muestra

Se compró 2 bolsas de ensaladas frescas del mercado Central de Trujillo:

- Se colocó en la mesa 4 placas Petri las cuales se rotularon con C, 1h, 2h, 3h.
- Después se procedió a pesar en cada placa Petri 50g de muestra.
- Seguidamente se agregó 500 microlitros de aceite esencial o zumo de *Citrus latifolia tanaka* a las placas de 1h, 2h y 3h. este procedimiento se elaboró ante un mechero con estado de adecuada higiene.
- Pasado el tiempo se separó 25g para procedimiento de *E. coli* y *A. mesòfilos* y 25g para procedimiento de *salmonella sp.*

Preparación de diluciones de la muestra

Se procedio a colocar 225 ml de Cloruro de sodio al 0.9% (SSF) en un matraz debidamente esterilizado de 500 mil y se agregó

25 g. de ensalada fresca (muestra). Se agitó para ambos sentidos para que la dilución quedara al décimo (10^{-1}).

Seguidamente se preparó una batería de diluciones:

- En una gradilla se puso 5 tubos de ensayo estériles debidamente rotulados con 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} .
- Luego a cada tubo de le colocó 9 ml de SSF.
- Después del matraz se tomó 1ml de solución de 10^{-1} y se agregó al tubo 10^{-2} , se agitó y se tomó 1 ml del tubo 10^{-2} y agregó al tubo 10^{-3} , se agitó y se siguió con este mismo procedimiento hasta llegar al tubo 10^{-6} .

Determinación de la presencia de *Aerobios mesófilos*: (Técnica de Recuento de placa)

La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra⁴⁰.

Para el recuento de microorganismos *Aerobios mesófilos*, se empleó el método de siembra por incorporación; donde se colocó en una mesa 2 placas Petri estériles y con la ayuda de una micropipeta se les incorporó 100 microlitros de la dilución 10^{-5} a una placa y 100 microlitros 10^{-6} a la otra placa, y se rotuló a las placas con 10^{-5} o 10^{-6} , depende de la dilución que se agregó. Luego, se adicionó a cada placa 18 - 20 ml aproximadamente de medio de cultivo PlateCount Agar (PCA) que tenga una temperatura entre 42°C a 45°C . Se homogenizó mediante movimientos circulares en ambos sentidos por unos 20 a 30 segundos y se dejó solidificar en las placas Petri. Después, se invirtieron las placas y llevaron a la incubadora a 30°C por 48 horas.

Cuándo pasó el debido tiempo de incubación se procedió al recuento de colonias en 24h y 48h. El recuento de expresó en UFC/g de ensalada fresca.

Determinación de la presencia de *Escherichia coli*

Los métodos utilizados en la determinación de *E. coli*, *coliformes totales* y *coliformes fecales* como microorganismos indicadores de la calidad sanitaria de agua o como indicador de las condiciones sanitarias en el procesamiento de alimentos, se basan en la fermentación de la lactosa³⁹.

Se determinó según el método de siembra por superficie, se colocó dos placas Petri sobre la mesa a la cual se adicionó a cada placa 18 - 20 ml aproximadamente de medio de cultivo Agar Mac Conkey que tenga una temperatura entre 42°C a 45°C y se dejó enfriar el Agar por un promedio de 5 min. Seguidamente se colocó sobre la mesa de trabajo las 2 placas Petri estériles y con Agar Mac Conkey, con la ayuda de una micropipeta se les incorporó 100 microlitros de la dilución 10^{-5} a una placa y 100 microlitros 10^{-6} a la otra placa, y se rotuló a las placas con 10^{-5} o 10^{-6} , según sea la dilución agregada, con la ayuda de Asa de Drigalski de homogenizó la muestra mediante movimientos en ambos sentidos por unos 20 a 30 segundos. Después, se invirtió las placas y se llevaron a la incubadora a 37°C por 24 horas antes de hacer la lectura.

Se contabilizó las colonias rojas. Para la identificación presuntiva se sembró en agar TSI, se preparó en tubos de ensayo de 13x100mm en donde contenía el medio de cultivo en forma inclinada.

Determinación de la presencia de *Salmonella sp.*: (Técnica de Recuento de placa)

Se tomó 25 g de ensalada fresca y se colocó en un matraz con 50 ml de caldo peptonado, el cual se llevó a incubar a 37°C por 48 horas. Luego, se sembró en superficie en Agar Bismuto

Sulfito según Wilson-Blair y se llevó a incubar a 37°C por 24 horas. Después, se hizo la identificación presuntiva sembrando en agar TSI.

2.5. Métodos de análisis de datos

El análisis de los datos se realizó mediante la prueba estadística ANOVA para *E. coli* y *Aerobios mesòfilos*; y chi-cuadrado para *Salmonella sp.*

III. RESULTADOS

Tabla 1

Efecto del aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* sobre el recuento de *Escherichia coli* y Aerobios mesófilos en ensaladas frescas expandidas en el Mercado Central de Trujillo, según tiempo.

Bacterias	Tiempo análisis microbiológico	Promedio de recuento de bacterias (UFC/g)	Calidad	F	Sig.
E. coli	Control	3,9	apto	3,04	0,093
	1 Horas	0,5	apto		
	2 Horas	4,3	apto		
	3 Horas	8,2	apto		
A. mesófilos	Control	14,4	apto	1,27	0,348
	1 Horas	6,3	apto		
	2 Horas	9,4	apto		
	3 Horas	15,3	apto		

Tabla 2

Efecto del zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre el recuento de *Escherichia coli* y Aerobios mesófilos en ensaladas frescas expandidas en el Mercado Central de Trujillo, según tiempo.

Bacterias	Tiempo análisis microbiológico	Promedio de recuento de bacterias (UFC/g)	Calidad	F	Sig.
E. coli	Control	11,3	riesgo	1,09	0,407
	1 Horas	1,5	apto		
	2 Horas	4,3	apto		
	3 Horas	2,9	apto		
A. mesófilos	Control	9,8	apto	0,71	0,572
	1 Horas	3,5	apto		
	2 Horas	3,5	apto		
	3 Horas	6,1	apto		

Tabla 3

Efecto del aceite esencial del *Citrus latifolia tanaka* sobre *Salmonella sp.*, en ensaladas frescas expandidas en el Mercado Central de Trujillo, según tiempo.

Tiempo	Salmonela						Chi cuadrado		Calidad
	Presencia		Ausencia		Total		X ²	p	
	n*	%	n*	%	N	%			
Control	1	33,3	2	66,7	3	100,0	0,0	1,00	No apto
1 Hora	1	33,3	2	66,7	3	100,0			
2 Horas	1	33,3	2	66,7	3	100,0			
3 Horas	1	33,3	2	66,7	3	100,0			

Donde n: número de muestra de ensalada por puesto de expendio del mercado Central de Trujillo.

Tabla 4

Efecto del zumo del *Citrus latifolia tanaka* sobre *Salmonella sp.*, en ensaladas frescas expandidas en el Mercado Central de Trujillo, según tiempo.

Tiempo	Salmonela						Chi cuadrado		Calidad
	Presencia		Ausencia		Total		X ²	p	
	n*	%	n*	%	N	%			
Control	1	33,3	2	66,7	3	100,0	0,0	1,00	No apto
1 Hora	1	33,3	2	66,7	3	100,0			
2 Horas	1	33,3	2	66,7	3	100,0			
3 Horas	1	33,3	2	66,7	3	100,0			

Donde n: número de muestra de ensalada por puesto de expendio del mercado Central de Trujillo.

Tabla 5

Efecto del aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre la calidad microbiológica en ensaladas frescas expandidas en el Mercado Central de Trujillo.

Tiempo del análisis microbiológico	Aceite esencial de Citrus latifolia tanaka	Observación	Zumo de Citrus latifolia tanaka	Observación
Control	No apto	Recuento de salmonella superior al límite	No apto	Recuento de E. coli y salmonella superior al límite
1 Horas	No apto	Recuento de salmonella superior al límite	No apto	Recuento de salmonella superior al límite
2 Horas	No apto	Recuento de salmonella superior al límite	No apto	Recuento de salmonella superior al límite
3 Horas	No apto	Recuento de salmonella superior al límite	No apto	Recuento de salmonella superior al límite

IV. DISCUSIÓN

En algunas investigaciones se ha encontrado que el aceite esencial y zumo del *Citrus latifolia tanaka* tiene un efecto antimicrobiano frente a *Escherichia coli*, *Aerobios mesófilos* y *Salmonella sp.*, es por ello que en la presente investigación se aplicó tanto el zumo como el aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* para evaluar su efecto sobre la calidad microbiológica de ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo.

Como se puede observar en la tabla 1, se aprecia el efecto del aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* sobre el recuento de *Escherichia coli*, en diferentes tiempos. Así en la prueba control se determinó un promedio de 3,9 UFC/g de ensalada fresca expandida en el mercado Central de Trujillo. Luego de aplicar el aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* a la ensalada fresca y posterior evaluación del recuento de *Escherichia coli* en 1 hora, 2 horas y 3 horas; se encontró 0,5; 4,3 y 8,2 UFC/g respectivamente. Así mismo la calidad en base a la norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano 071 – 2008 – MINSA, tanto para la ensalada fresca control y la evaluación en 1 hora, 2 horas y 3 horas es apta por haber presencia <10 UFC/g de *Escherichia coli* en la ensalada fresca, sin diferencia estadísticamente significativa.

Así mismo en la tabla 1 se puede observar que la carga microbiana disminuye al pasar el tiempo del control a 1 hora y luego sube progresivamente en 2 horas y 3 horas, esto concuerda con el estudio realizado por Herrera¹⁰, quien también utilizó el aceite esencial de limón sin diluir produciendo inhibición del desarrollo del microorganismo en el mismo tiempo, siendo este sensible. Este resultado nos afirma que el aceite esencial de limón actúa ante *Escherichia coli* de manera favorable como un antimicrobiano, pero solo a la concentración del 100%.

Existen estudios donde muestran que los aceites esenciales extraídos exhiben la mayor actividad antibacteriana contra *E. coli*, de los cuales se han

identificado ciertos componentes en el aceite esencial del limón que los clasifican en monoterpenos hidrocarbonados y monoterpenos oxigenados, siendo estos los más representativos.

El geranial, geraniol y neral son los principales monoterpenos oxigenados, en tanto que el limoneno, β -pineno y γ -terpineno como los principales monoterpenos hidrocarbonados^{27,41}; siendo el limoneno el compuesto predominante, pero al mismo tiempo es un compuesto antibacteriano débil⁴². Por otro lado, hay otros compuestos que tiene propiedad antibacteriana alta como es el caso del neral, citral, α -terpinoleno, α -pineno entre otros, pero sus concentraciones son bajas^{42,43}. En algunos estudios se han encontrado que estos compuestos ejercen efectos tóxicos frente a los microorganismos a través de la disrupción de la integridad de la membrana bacteriana⁴³.

Así mismo también en la tabla 1 se aprecia el efecto del aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* sobre el recuento de *Aerobios mesófilos*, en diferentes tiempos. Así en la prueba control se determinó un promedio de 14,4 UFC/g de ensalada fresca expendida en el Mercado Central de Trujillo; luego de aplicar el aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* y evaluar el recuento de *Aerobios mesófilos* en 1 hora; 2 horas y 3 horas; se determinó valores de 6,3; 9,4 y 15,3 UFC/g respectivamente. Así mismo la calidad en base a la norma técnica NTS 071 – 2008 – MINSA, para el control y la evaluación en 1 hora, 2 horas y 3 horas se determinó que es apta por haber presencia $<10^4$ UFC/g de *Aerobios mesófilos* en la ensalada fresca sin diferencia significativa.

Como se puede observar el aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* logró disminuir la presencia de colonias de *Aerobios mesófilos* al transcurrir 1 hora, pero progresivamente el recuento de las colonias se incrementó al pasar las 2 y 3 horas. Esto es debido posiblemente a que los monoterpenos hidrocarbonados que constituyen la mayor parte del aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* son susceptibles a la oxidación⁴⁴ por la presencia de dobles enlaces en su estructura química, disminuyendo su actividad antimicrobiana pasado 1 hora, tanto en *Aerobios mesófilos* como en *Escherichia coli*.

En la tabla 2, se aprecia el efecto del zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre el recuento de *Escherichia coli*, en diferentes tiempos. Así en la prueba control se determinó un promedio de 11,3 UFC/g en ensalada fresca expendida en el Mercado Central de Trujillo; en la evaluación del recuento de *Escherichia coli* luego de la aplicación del zumo de *Citrus latifolia tanaka* a 1 hora; 2 horas y 3 horas; fue correspondiente a 1,5; 4,3 y 2,9 UFC/g respectivamente. Así mismo la calidad en base a la norma técnica NTS 071 – 2008 – MINSa, para el control se determinó un riesgo para el consumo humano y para la evaluación de 1 hora, 2 horas y 3 horas es apta sin diferencia significativa.

Así mismo también se aprecia el efecto del zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre el recuento de *Aerobios mesófilos*, en diferentes tiempos. Así en la prueba control se determinó un promedio de 9,8 UFC/g en ensaladas frescas expendidas en el Mercado Central de Trujillo; seguidamente se aplicó el zumo de *Citrus latifolia tanaka* y se evaluó el recuento en 1 hora; 2 horas y 3 horas; obteniéndose valores de 3,5; 3,5 y 6,1 UFC/g respectivamente. Así mismo la calidad en base a la norma técnica NTS 071 – 2008 – MINSa, para el control y la evaluación en 1 hora, 2 horas y 3 horas es apta sin diferencia significativa.

Se puede observar que el zumo de *Citrus latifolia tanaka* aparentemente tuvo mayor efecto antimicrobiano que el aceite esencial, pero estadísticamente no pudo ser comprobado debido a que las muestras de ensaladas frescas expendidas en el mercado Central de Trujillo tenían cargas microbianas iniciales diferentes de *Escherichia coli* y *Aerobios mesófilos* para su tratamiento inhibitorio. Además, en el zumo de *Citrus latifolia tanaka*, el pH es un factor de control destacable en alimentos ácidos ya que inhibe el transporte celular y la actividad enzimática de los microorganismos⁸.

En la tabla 3 y 4, se aprecia un efecto no significativo del aceite esencial y del zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre *Salmonella sp.*, por haber presencia de esta bacteria en 33,3% de las muestras de ensaladas frescas expedidas en el mercado Central de Trujillo tanto para el control, 1 hora, 2 horas y 3 horas. Sin embargo, se pudo observar que tanto el aceite esencial como el zumo de *Citrus latifolia tanaka* logró disminuir la presencia de colonias de

Salmonella sp., al transcurrir 1 hora, pero progresivamente el recuento de las colonias se incrementó al pasar las 2 y 3 horas, pero a pesar de haber sido disminuida su carga microbiana por los mecanismos anteriormente explicados, no inhibió completamente dicha bacteria. Así mismo, la calidad en base a la norma técnica NTS 071 – 2008 – MINSA, para el control y la evaluación en 1 hora, 2 horas y 3 horas no es apta y sin diferencia significativa. (Ver anexo 06 fotografía N° 01)

En la tabla 5, la carga microbiana en la ensalada control procedente del mercado Central de Trujillo no es apto para el consumo humano debido a presencia de salmonella sp., y recuento de E. coli superior al límite $10 - 10^2$ UFC/g. Así mismo después de aplicar el aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* a la 1; 2 y 3 horas la calidad microbiológica no fue apta por la presencia de *Salmonella sp.*, en ensaladas frescas expendidas en el mercado Central de Trujillo. De la misma manera sucedió después de la aplicación del zumo de *Citrus latifolia tanaka* a las ensaladas manteniéndose la calidad no apta.

V. CONCLUSIONES

- ❖ La aplicación del aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* no mejora la calidad microbiológica a la denominación de apto en ensaladas frescas que se expenden en el mercado Central de Trujillo, según la norma técnica NTS 071 – 2008 – MINSA, por mantenerse la presencia de *Salmonella sp.*
- ❖ El aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* sobre *Escherichia coli* y *Aerobios mesófilos* en ensaladas frescas expendidas en el mercado Central de Trujillo, según tiempo, disminuyó las colonias de *E. coli* como en *A. mesófilos* al transcurrir 1 hora, pero progresivamente el recuento de las colonias se incrementó al pasar las 2 y 3 horas.
- ❖ El zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre *Escherichia coli* y *Aerobios mesófilos* en ensaladas frescas expendidas en el mercado Central de Trujillo, según tiempo, disminuye las colonias de *E. coli* como en *A. mesófilos* al transcurrir 1 hora, pero al transcurrir 2 y 3 horas el recuento de las colonias de estos microorganismos se incrementaron.
- ❖ El aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka* no inhibe el crecimiento de *Salmonella sp.*, en ensaladas frescas expendidas en el mercado Central de Trujillo.
- ❖ El zumo de *Citrus latifolia tanaka* no produce inhibición completa del crecimiento de *Salmonella sp.*, en ensaladas frescas expendidas en el mercado Central de Trujillo.

VI. RECOMENDACIONES

- ❖ Es de gran importancia seguir incorporando dentro de la alimentación habitual el consumo del zumo de limón como prevención ante el deterioro de las ensaladas frescas, en un tiempo máximo de 1 hora, pasado el mismo tiende al desarrollo de microorganismos.
- ❖ Realizar trabajos de investigación sobre el efecto antimicrobiano del aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* en cultivos puros de bacterias como *E. coli*, *A. mesófilos* y *Salmonella sp.*, para así poder establecer una comparación adecuada entre zumo y aceite esencial de *Citrus latifolia tanaka*.
- ❖ Realizar estrategias que involucren la educación de la población que trabaja en la comercialización y manipulación de ensaladas frescas, así mismo también a las amas de casa que están involucradas en la preparación de las mismas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vásquez J. Enteroparásitos y factores de riesgo relacionados en frutas y hortalizas de los expendios públicos y privados de la ciudad de Cartagena. [Tesis para optar el título de bacterióloga]. Cartagena: Universidad de San Buenaventura; 2015.
2. Zamudio M, et al. Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2011; 28(1): 128-35.
3. RM N° 258-2011/MINSA. Política Nacional de Salud Ambiental 2011 – 2020. Dirección General de Salud Ambiental, Ministerio de Salud. Lima – Perú. 2011.
4. MINSA Perú. [Página de internet]. Lima: Ministerio de Salud. [actualizado 09 Abr 2015; citado Mar 2016]. Disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/?op=51¬a=16394>.
5. Pérez RE, Chávez CM. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en tomate, zanahoria, espinaca, lechuga y rabanito, expendidos en mercados de Trujillo, Perú. *Ciencia y Tecnología*. 2012. 8 (22): 11-21.
6. Paucar E. Higiene y manipulación de alimentos de servicio colectivo para empresas. [Tesis para optar el título de ingeniero en industrias alimentarias]. Huacho - Perú: Universidad Nacional Faustino Sánchez Carrión; 2013.
7. Martínez M, et al. Efecto antimicrobiano del vinagre blanco y del limón criollo sobre *Staphylococcus aureus* en ensaladas de restaurantes del programa de alimentación escolar (PAE) de San José de Cúcuta. *Alimentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 2014. 12 (1): 48-54.
8. Picón E, et al. Capacidad antimicrobiana de subproductos cítricos de limón, naranja y mandarina frente a *Escherichia coli* 0157:H7 y *Salmonella typhimurium*. [Tesis para optar el título de master en ciencia e ingeniería de los alimentos]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2013.
9. Najwa N, Mohammad A. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. *science Direct*. 2014. 3 (4): 247-253.

10. Herrera M. Evaluación de la actividad antibacteriana de las cascarras de limón y naranja, sobre diversos microorganismos. [Tesis para optar el aprobar el examen demostrativo de la experiencia educativa de experiencia recepcional en el programa de ingeniería química]. Veracruz: Universidad Veracruzana; 2014.
11. Pires T, Piccoli R. Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero Citrus sobre o crescimento de micro-organismos. Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo, 2012; 71(2):378 - 385.
12. Soares D. Lima ácida (*Citrus latifolia*, *Tanaka*), cv. Tahiti, de cultivos convencional e orgânico biodinâmico: avaliação da capacidade antioxidante dos sucos in natura e clarificados por membranas de microfiltração. [Tesis para optar en ciencia farmacéutica]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2010.
13. Gonzales F. Compilación bibliográfica del limón persa (*Citrus latifolia*). [Tesis para optar el título de químico agrícola]. México: Universidad veracruzana, facultad de ciencias químicas. 2011.
14. Sinavimo Argentina. [página en internet]. Buenos Aires: Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. [actualizado 03 Abr 2014; citado Mar 2016]. Disponible en: <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/citrus-latifolia>.
15. Carmen J. Estudio de factibilidad de la extracción del aceite esencial del epicarpio del limón persa (*Citrus latifolia*, *tanaka*), a escala laboratorio y escala planta piloto, realizado en el centro de investigaciones de ingeniería, usac. [Tesis para optar el título en ingeniería en industrias agropecuarias y forestales]. Guatemala: Universidad De San Carlos De Guatemala.2014.
16. Domínguez E, et al. Evaluación de la actividad antioxidante, vitamina c de zumos cítricos de lima dulce (*Citrus limetta*), limón tahití (*Citrus latifolia*), limón rugoso (*Citrus jambhiri lush*) y mandarina cleopatra (*Citrus reshni*) almacenados en refrigeración. Investigación y Amazonía. 2013; 3 (1): 30-35.
17. Rodríguez E, Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai. 2011; 7(1): 153 – 170.
18. Hernández R, et al. Utilización de películas comestibles y ciclodextrinas para la liberación controlada de aceites esenciales como agentes antimicrobianas en vegetales. Temas selectos de ingeniería de alimentos.2013; 7(1): 1 – 11.

19. Deon Argentina. [Página en Internet]. Buenos Aires: Instituto de Ciencias Superiores, [actualizado 25 Jul 2012; citado 06 Abr 2016]. Disponible en: <http://www.deon.com.ar/22aromaterapia.html>
20. Cassini J. Utilização de enzimas para a obtenção de óleos essenciais e cumarinas da casca de *Citrus latifolia* Tanaka. [Tesis para optar el título maestría en biotecnología]. Caxias do Sul: Universidade De Caxias Do Sul; 2010.
21. Betseida C. Estudio de la contaminación por enteroparásitos de importancia en salud pública en hortalizas expandidas en los mercados del cercado de Tacna. [Tesis para optar el título de médico veterinario y zootecnista]. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2012.
22. FAO Bolivia. [página en internet]. Bolivia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; [actualizado 2011; citado 06 Abr 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-as972s.pdf>
23. Vaca S. Estudio de la aplicación de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) para optimizar la calidad microbiológica y sensorial de cuatro tipos de hortalizas: col de repollo (*Brassica oleracea var. capitata cv. bronco*), col morada (*Brassica oleracea var. capitata f. rubra*), lechuga iceberg tipo salinas (*Lactuca sativa var. capitata*) y espinaca (*Spinacia oleracea L.*). [Tesis para optar el título de ingeniera en alimentos]. Ambato – Ecuador: Universidad Técnica De Ambato; 2013.
24. Puig P, Leyva C, Suárez A, Carrera V, Molejón P, Muñoz Y, et al. Calidad microbiológica de las hortalizas y factores asociados a la contaminación en áreas de cultivo en La Habana. Rev haban cienc méd. 2014; 13(1): 111-119.
25. Vélez B, Ortega G. Determinación de coliformes totales y *E. coli* en muestras de lechuga expandidas en cuatro mercados de la ciudad de Cuenca. [Tesis para optar el título de bioquímica farmacéutica]. Cuenca-Ecuador: Universidad De Cuenca; 2013.
26. Rivera M., et al. Patógenos microbianos en hortalizas: una visión del problema y su investigación en Perú. [Tesis para optar el título de master en Microbiología]. Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca; 2012.
27. Calle M. Control de la germinación in vitro de *Araujia sericifera* con aceites esenciales de *Laurus nobilis*, *Myrtus communis*, *Citrus sinensis* y *Citrus limón*.

- [Tesis para optar el título de máster en producción vegetal y ecosistemas agroforestales]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2010.
28. Paredes A. Implementación del protocolo para la determinación de *Coliformes totales* y *E. coli* en agar chromocult para la asociación municipal de acueductos comunitarios AMAC. [Tesis para optar el título de tecnóloga química]. Colombia: Universidad tecnológica de Pereira; 2014.
29. Red nacional de laboratorios oficiales de análisis de alimentos. Análisis microbiológico de alimentos. Volumen 3. 2014.
30. Zazueta G. Estudio de la calidad sanitaria de la cafetería del Itson campus centro CD. [Tesis para optar el título de licenciado en tecnología de alimentos]. Obregón: Instituto tecnológico de Sonora; 2007.
31. Elika. España [página de internet]. Alava: Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria. [Actualizado 28 Feb 2013; citado el 28 de Mar de 2016]. Disponible en: http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento82/1.Salmonella.pdf
32. OMS España. [página de internet]. Barcelona: Organización mundial de la salud. 2013 [actualizado Ago 2013; citado Mar 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
33. Guerra B. Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales de plantas usadas en medicina tradicional. [Tesis para optar el título de master en ciencias en química biomédica]. México: Universidad autónoma de nuevo león Facultad de medicina; 2011.
34. FAO Canadá. [página en internet]. Canadá: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; [actualizado 2005; citado 27 Mar 2016]. Disponible en: http://www.fao.org/input/download/standards/10154/CXS_247s.pdf.
35. Bardales C, et al. Calidad microbiológica de la corteza de *Cariniana decandra* ducke (cinta caspi) usada como insumo de bebidas hidroalcohólicas de uso etnoterapéutico en Loreto. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Iquitos - Perú: Universidad Nacional De La Amazonía Peruana; 2015.
36. NTS N° 071 – MINSA – V.0.01. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Lima, 27 de agosto del 2008.

37. Caballero Y. et al. Obtención de aceites esenciales a partir de cáscara de mango (*Mangifera indica L.*) mediante técnica de destilación por arrastre de vapor. [Tesis para optar el título de ingeniero químico]. Cartagena: Universidad De San Buenaventura; 2014.
38. Paredes P. et al. Desarrollo de un sistema de extracción de aceites esenciales. [Tesis para optar el título de ingeniero mecánico]. Riobamba - Ecuador: Escuela Superior Politécnica De Chimborazo; 2010.
39. ISPCH Chile. [página en internet]. Santiago de Chile: Instituto de Salud Pública; PRT-712.02-004 [actualizado 20 Ene 2012; citado 20 Mar 2016]. Disponible en: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/03/PRT-712.02-004%20V9%20NMP%20Colif%20y%20E.coli_.pdf
40. Camacho A, Giles., et al. Técnicas para el Análisis Microbiológico De Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México. 2009
41. Atti-Santos A, Rossato M, Serafini L, Cassel E, Moyna P. Extraction of Essential Oils from Lime (*Citrus latifolia* Tanaka) by Hydrodistillation and Supercritical Carbon Dioxide. *Braz. arco. biol. Technol.* 2005; 48 (1): 155-160.
42. Bourgou S, Rahali FZ, Ourghemmi I, Saïdani Tounsi M. Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation. *ScientificWorldJournal.* 2012; 2012:528593.
43. Baik J, Kim S, Lee J, Oh T, Kim J, Lee N. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils Extracted from Korean Endemic Citrus Species. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008; 18(1): 74–79.
44. Cerutti M, Neumayer F. Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. *Invenio.* 2004; 7(12): 149-155.

ANEXOS

ANEXO 01

Composición química por 100 gramos de limón.

Principios inmediatos	%	Principios Inmediatos	%	Principios inmediatos	%
Agua	81	Proteínas	6.7	Grasas	0.4
Hidratos de carbono	7.7	Celulosa	3.7	Cenizas	0.5
Sales minerales				Potasio	0.2340
Sodio	0.0080	Calcio	0.1020	Fosforo	0.0185
Magnesio	0.0166	Hierro	0.0130	Azufre	0.0185
Cloro	0.0027	Cobre	0.00019	Zinc	0.0110
Manganeso	0.00013	Yodo	0.00001		0.00017
Vitaminas					
Vitamina A	0.00006	Vitamina C (corteza)	0.152	Vitamina C (pulpa y jugo)	0.0475
Vitamina P (citrina)	6 unidades	Vitamina B1	0.00011	Vitamina B2	0.00011
Nicotinamida	0.0002				

Fuente: Fernando González Cruz, 2011.

ANEXO 02

Bacterias patógenas aisladas de vegetales crudos.

Productos	Países	Bacterias aisladas	Frecuencia de aislamiento
Col	Canadá, USA	<i>Aeromonas</i>	2/92
	México	<i>L. monocytogenes</i>	1/4
	España	<i>E. coli O₁₅₇H₇</i>	7/41
Lechuga	Italia, Holanda	<i>Salmonella</i>	82/120, 2/28
	España		5/80
Ensalada			
4ª gama	U.K.	<i>L. monocytogenes</i>	19/70
Espinacas	España, USA	<i>Salmonella</i>	3/28

Fuente: Vanessa Valeria Vaca Singaña, 2013.

ANEXO 03

Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos de bebidas de consumo humano.

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
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10	10^2
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	-----
<i>Listeria monocytogenes</i> (*)	10	2	5	0	Ausencia /25 g	-----

(*) Solo para frutas y hortalizas de tierra (a excepción de las precocidas)

Fuente: MINSA, 2008.

ANEXO 04

Ficha de recolección de datos

Calidad microbiológica del *Citrus Latifolia tanaka*

Lugar de muestreo: Mercado Central de la Ciudad de Trujillo.

1. Puesto N°:

2. Muestra N°:

Solución / Bacterias	Concen tracion es (%)	Muest ra N°	Tiempo h.	Dilució nes	<i>E. coli</i> (UFC/g)	<i>Mesófilos</i> (UFC/g)		<i>Salmonella sp.</i> (Presencia/Ause ncia en 25 g)
						24h	48h	
Zumo <i>Citrus</i> <i>Latifolia</i> <i>tanaka</i>	100		C	10 ⁻⁵				
				10 ⁻⁶				
			1h	10 ⁻⁵				
				10 ⁻⁶				
			2h	10 ⁻⁵				
				10 ⁻⁶				
3h	10 ⁻⁵							
	10 ⁻⁶							
Aceite <i>Citrus</i> <i>Latifolia</i> <i>tanaka</i>	100		C	10 ⁻⁵				
				10 ⁻⁶				
			1h	10 ⁻⁵				
				10 ⁻⁶				
			2h	10 ⁻⁵				
				10 ⁻⁶				
3h	10 ⁻⁵							

ANEXO 05

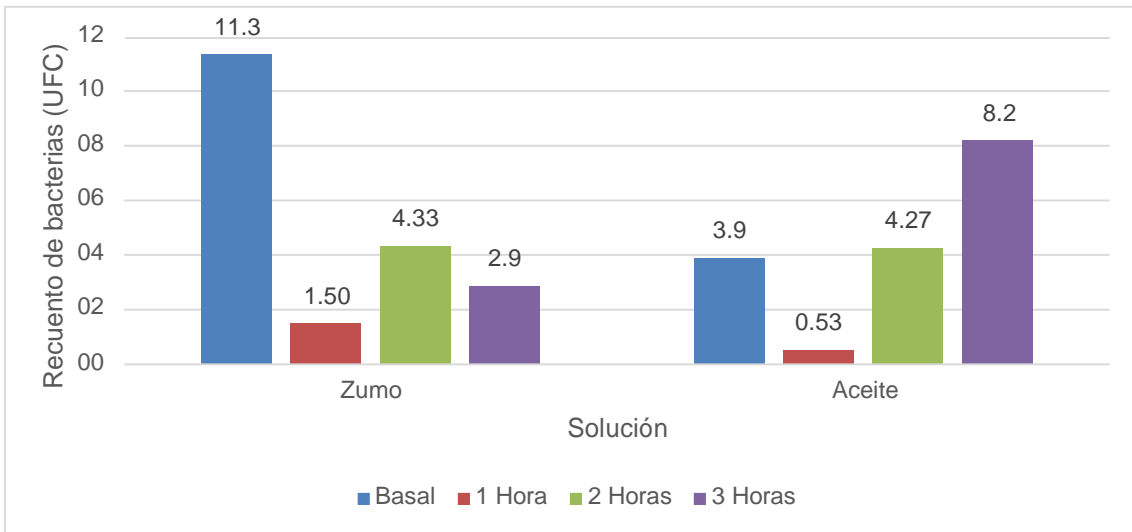


Figura 1. Efecto del aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre el recuento de *E. Coli*, según tiempo en ensaladas frescas expandidas en el Mercado Central de Trujillo.

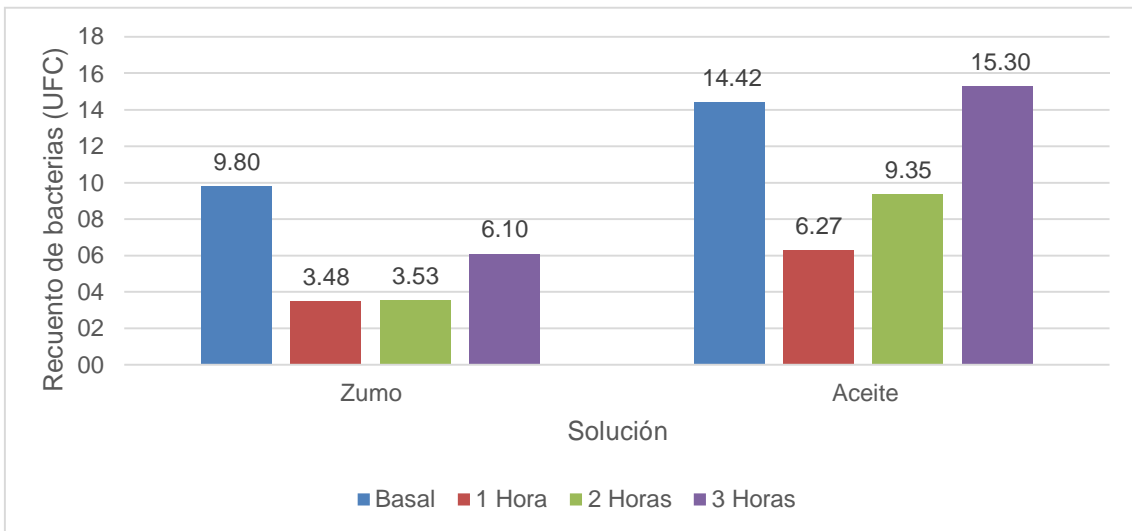


Figura 2. Efecto del aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia tanaka* sobre el recuento de *Aerobios mesófilos*, según tiempo en ensaladas frescas expandidas en el Mercado Central de Trujillo.

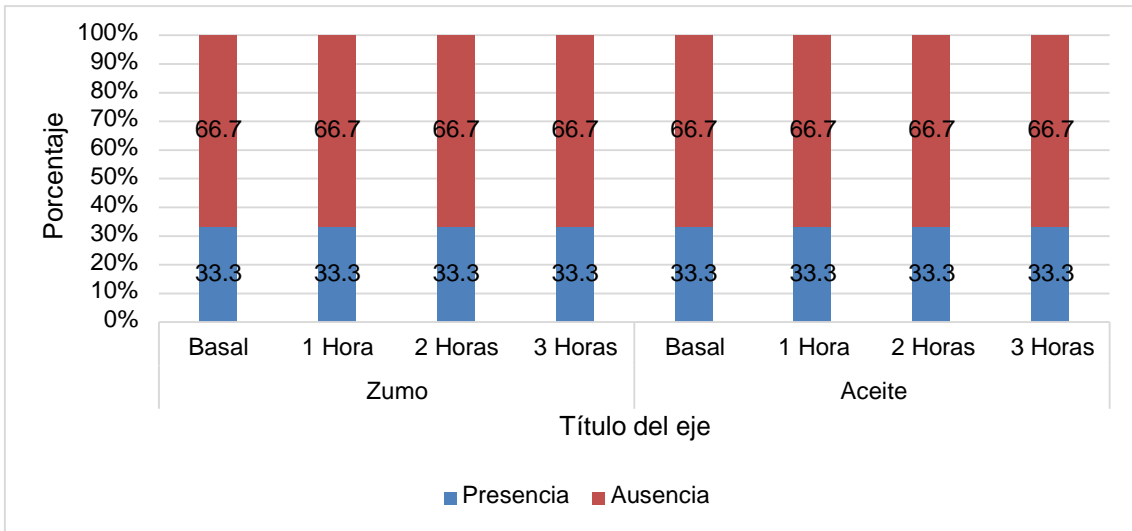
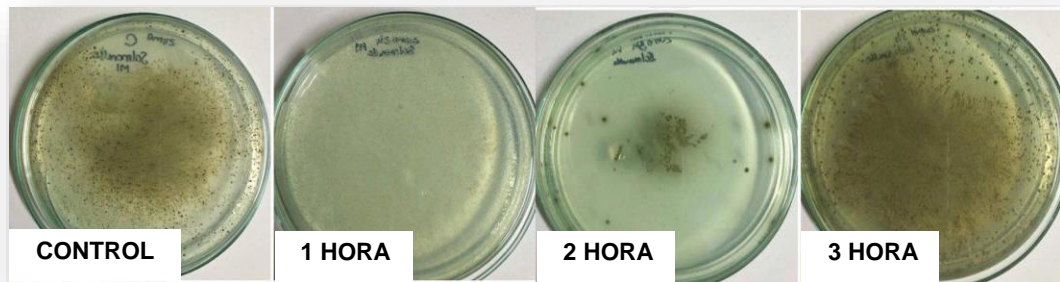


Figura 3. Efecto del aceite esencial y zumo de *Citrus latifolia* tanaka sobre el recuento de *Salmonella sp.*, según tiempo en ensaladas frescas expandidas en el Mercado Central de Trujillo.

Anexo 06



Fotografía N° 01. Placas con *Salmonella sp.*, provenientes de ensalada fresca expandida en el mercado Central de Trujillo, según tiempo.

Anexo 07

Fotografías de ejecución.



Fotografía N° 02. Extracción del aceite esencial: Técnica de arrastre de vapor de agua.



Fotografía N° 03. Preparación de la muestra



Fotografía N° 04. Preparación de diluciones de la muestra



Fotografía Nº 05. Determinación de la presencia y recuento de *Aerobios mesófilos*



Fotografía Nº 06. Determinación de la presencia y recuento de *Escherichia coli*.



Fotografía Nº 07. Determinación de la presencia de *Salmonella sp.*

Anexo 08

MATRIZ DE CONSISTENCIA PARA ELABORACIÓN DE INFORME DE TESIS

NOMBRE DEL ESTUDIANTE: Soto Carrera, Fiorela Lilianny

FACULTAD/ESCUELA: Ciencias Médicas / Nutrición

TÍTULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	Efecto del aceite esencial y zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre la calidad microbiológica de ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo.
PROBLEMA	¿Cuál es el efecto del aceite esencial y zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre la calidad microbiológica de ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo?
HIPÓTESIS	H1: El aceite esencial y zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> tiene efecto sobre la calidad microbiológica de ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo. H0: El aceite esencial y zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> no tiene efecto sobre la calidad microbiológica de ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo
OBJETIVO GENERAL	Evaluar el efecto del aceite esencial y zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre la calidad microbiológica de ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo.
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	<ul style="list-style-type: none">- Determinar el efecto del aceite esencial de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre el recuento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Aerobios mesófilos</i> en ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo, según tiempo.- Determinar el efecto del zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre el recuento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Aerobios mesófilos</i> en ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo, según tiempo.- Determinar el efecto del aceite esencial de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre <i>Salmonella sp.</i>, en ensaladas frescas

	<p>expendidas en el mercado Central de Trujillo, según tiempo.</p> <p>- Determinar el efecto del zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre <i>Salmonella sp.</i>, en ensaladas frescas expendidas en el mercado Central de Trujillo, según tiempo.</p>
DISEÑO DEL ESTUDIO	Experimental post prueba, con grupo control y grupos experimentales.
POBLACIÓN Y MUESTRA	<p>Población: La población en estudio es: ensaladas frescas expendidas en el Mercado Centran de Trujillo.</p> <p>Muestra: Se trabajó con una muestra por conveniencia correspondiente a 3 puestos, obteniéndose de cada uno 4 muestras para el análisis de calidad microbiológica correspondiente a aceite esencial y para zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i>.</p>
VARIABLES	<p>Aceite esencial de <i>Citrus latifolia tanaka</i>.</p> <p>Zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i>.</p> <p>Calidad microbiológica</p>

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición
Aceite esencial de <i>Citrus latifolia tanaka</i>	El aceite esencial es el aceite volátil y oloroso de la planta, producido por glándulas secretoras o células especializadas dentro del tejido vegetal o bien en la superficie de esta. Los aceites esenciales son el resultado del metabolismo secundario de las plantas ³³ .	Se consideró 1 concentración del aceite esencial de <i>Citrus latifolia tanaka</i> .	Concentración de: 100%	Cuantitativa discreta
Zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i>	Por zumo (jugo) se entiende el líquido sin fermentar, que se obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas ³⁴ .	Se consideró 1 concentración del zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> .	Concentración de: 100%	Cuantitativa discreta

<p>Calidad microbiológica</p>	<p>Es un elemento de evaluación de la satisfacción de los requisitos microbiológicos, es necesario aplicar pasos ordenados a través de la cadena de producción, empezando por los insumos³⁵.</p>	<p>Se realizó teniendo en cuenta los parámetros establecidos por el control de límites microbianos según la norma técnica NTS 0071 – 2008 – MINSA para criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano^{35,36}.</p> <p><i>E. coli</i> con Agar Mac Conkey. Se consideró la norma técnica NTS 0071 – 2008 – MINSA³⁶.</p> <p><i>Mesófilos</i> en Agar PCA. Se consideró la norma técnica NTS 0071 – 2008 – MINSA³⁶.</p> <p><i>Salmonella</i> en Agar Bismuto Sulfito. Se consideró la norma</p>	<p><i>E. coli</i> < 10 UFC/g Apto para el consumo</p> <p>10 a 100 UFC/g en riesgo</p> <p>> 100 UFC/g No apto para el consumo</p> <p><i>A. mesófilos</i> < 10⁴ UFC/g Apto para el consumo</p> <p>10⁴ a 10⁶ UFC/g en riesgo</p> <p>>10⁶ UFC/g No apto para el consumo</p> <p>Ausencia de <i>Salmonella sp.</i> en 25g: Apto para el consumo</p> <p>Presencia de <i>Salmonella sp.</i> en 25g:</p>	<p>Cualitativa ordinal</p>
-------------------------------	---	---	---	----------------------------

		técnica NTS 0071 – 2008 – MINSA ³⁶ .	No apto para el consumo	
--	--	---	-------------------------	--

<p style="text-align: center;">MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS</p>	<p>El análisis de los datos se realizó mediante la prueba estadística ANOVA para <i>E. coli</i> y <i>Aerobios mesófilos</i>; y chi-cuadrado para <i>Salmonella sp.</i></p>
<p style="text-align: center;">RESULTADOS</p>	<p>Se determinó que para el efecto del aceite esencial de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre <i>Escherichia coli</i> y <i>Aerobios mesófilos</i>, se halló que la carga microbiana disminuye al pasar el tiempo del control a 1 hora y aumenta a las 2 y 3 horas, con un resultado apto para el consumo humano por la presencia <10 UFC/g para <i>Escherichia coli</i> y <104 UFC/g para <i>Aerobios mesófilos</i> de ensalada fresca expendida mercado Central de Trujillo, pero sin diferencia significativa. Así mismo para el efecto del zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre <i>Escherichia coli</i> y <i>Aerobios mesófilos</i>, la carga microbiana también disminuye al pasar el tiempo del control a 1 hora subiendo en 2 y 3 horas, hallándose apto para el consumo solo en las ensaladas con tratamiento, sin diferencia significativa. Finalmente se determinó que para el efecto del aceite esencial y zumo de <i>Citrus latifolia</i></p>

	<p><i>tanaka</i> sobre <i>Salmonella sp.</i>, no hubo efecto antibacteriano sobre esta bacteria, con un resultado no apto para el consumo humano por la presencia de esta, sin diferencia significativa.</p>
<p style="text-align: center;">CONCLUSIONES</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ La aplicación del aceite esencial y zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> no mejora la calidad microbiológica a la denominación de apto en ensaladas frescas que se expenden en el mercado Central de Trujillo, según la norma técnica NTS 071 – 2008 – MINSA, por mantenerse la presencia de <i>Salmonella sp.</i> ✓ El aceite esencial de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre <i>Escherichia coli</i> y <i>Aerobios mesófilos</i> en ensaladas frescas expendidas en el mercado Central de Trujillo, según tiempo, disminuyó las colonias de <i>E. coli</i> como en <i>A. mesófilos</i> al transcurrir 1 hora, pero progresivamente el recuento de las colonias se incrementó al pasar las 2 y 3 horas. ✓ El zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre <i>Escherichia coli</i> y <i>Aerobios mesófilos</i> en ensaladas frescas expendidas en el mercado Central de Trujillo, según tiempo, disminuye las colonias de <i>E. coli</i> como en <i>A. mesófilos</i> al transcurrir 1 hora, pero al transcurrir 2 y 3 horas el recuento de las colonias de estos

	<p>microorganismos se incrementaron.</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ El aceite esencial de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre <i>Salmonella sp.</i>, no inhibe el crecimiento completamente en ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo. ✓ El zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre <i>Salmonella sp.</i>, no produce inhibición completa de <i>Salmonella sp.</i>, en ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo. ✓ Se demostró que el efecto del aceite esencial y zumo de <i>Citrus latifolia tanaka</i> sobre la calidad microbiológica en ensaladas frescas expandidas en el mercado Central de Trujillo, no es apta para el consumo humano según la norma técnica NTS 071 – 2008 – MINSA por presencia de <i>Salmonella sp.</i>, y <i>Escherichia coli</i> superior al límite.
--	---