

Trabajo de Tesis de Grado para optar al título de **MICROBIÓLOGA**, bajo la dirección de la Dra. Susana Bettera y la co-dirección de la Mg. Daniela Lombardo. Realizado en la Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos.

Tesista

Marina Bonacci

Directora

Dra. Susana Bettera

Co-Directora

Mg. Daniela Lombardo

Miembros del Jurado

Dra. Susana Bettera

Dra. Ma. de las Mercedes Oliva

MSc. Viviana Beoletto

A mis padres con todo mi amor.

Agradecimientos

- ☞ A Dios por ser mi guía y fortaleza en este camino.
- ☞ A mis padres, Liliana y José Luis, gracias por todo el amor y atención que me dan, por impulsarme a cumplir este sueño y por los buenos valores inculcados.
- ☞ A mis hermanos, Carina y Luis, gracias por brindarme su protección, por estar siempre que los necesito, son personas increíbles, los admiro mucho y ojalá la vida nos mantenga siempre unidos.
- ☞ A mis sobrinos, Valentín, Brisa, Joaquín y Lucía, ser su tía me cambió la vida, la llenó de alegría y felicidad, me brindan el amor más sincero.
- ☞ A mis cuñados, Alba y Claudio, gracias por apoyarme en esta etapa y darme la hermosa posibilidad de estar siempre cerca de mis sobrinos.
- ☞ A mi madrina, Sonia, gracias por ser incondicional en mi vida, por esperarme siempre con esa enorme sonrisa y por cada abrazo fuerte al vernos.
- ☞ A mis primos, Vane, Lucas, Anita y Marcos, gracias por tantos momentos compartidos desde chicos y por seguir manteniendo ese gran afecto.
- ☞ A la Universidad Nacional de Río Cuarto que me permitió estudiar.
- ☞ A las profesoras, Susana y Daniela, que de la mejor forma han compartido su conocimiento y por estar siempre dispuestas a enseñarme.
- ☞ A mis amigas, Flor, Ari, Noe, Ani y Valen, estoy agradecida con la vida de que la universidad nos haya unido y formar este lazo de amistad tan fuerte, son personas muy buenas que me alegran la vida, gracias por apoyarme siempre.
- ☞ A Noe, gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme y por tantos momentos de risas y charlas de las más sinceras.
- ☞ A Male, gracias por ser mi apoyo y compañera de estudio, bellos momentos compartidos que hicieron amenos los nervios e inseguridades de la última etapa universitaria.

Resumen

En los últimos años, los cambios en los hábitos alimenticios han conducido a la preparación masiva de alimentos listos para consumo. El Código Alimentario Argentino los define de la siguiente manera: “comida elaborada, cocida o precocida que no requiere agregado de ingredientes para su consumo”. Este tipo de productos son muy susceptibles a la contaminación microbiana por lo tanto requieren de un control microbiológico estricto y constante a lo largo de su cadena alimentaria.

El envasado es un factor importante para proteger al alimento del medio ambiente que lo rodea, los films de plástico presentan una amplia aceptación para el uso en la conservación de alimentos, tanto en supermercados como en la cocina doméstica.

El objetivo de este trabajo fue determinar la calidad higiénico-sanitaria y el deterioro de productos alimenticios comercializados por el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto (U.N.R.C).

Se analizaron 33 muestras de alimentos listos para el consumo, de las cuales 11 se utilizaron para evaluar la aptitud para consumo humano y 22 para evaluar la vida útil de las mismas aplicando films de PVC en el periodo de septiembre de 2016 a marzo del 2018. El análisis microbiológico de las muestras se llevó a cabo siguiendo la metodología analítica de las normas ISO, APHA e ICMSF.

De las 5 muestras de alimentos elaborados por el menú del comedor universitario se determinó que todas fueron aptas para consumo humano, cumpliendo los requisitos microbiológicos establecidos.

Del total de 6 muestras elaboradas por seis empresas de la ciudad de Río Cuarto y tomadas del comedor universitario, 2 fueron consideradas no aptas para consumo humano no cumpliendo con la norma vigente por superar los límites de recuento de *Staphylococcus aureus* y *Enterobacterias*.

En las muestras provenientes del sector self-service del comedor universitario y las comidas elaborados por una empresa proveedora que fueron envasados con films de PVC se registraron importantes aumentos en los recuentos de las bacterias indicadoras de la vida útil del producto, lo cual indica que este envase no es muy apropiado para la conservación a largo plazo de productos altamente perecederos analizados en este estudio.

La correcta aplicación de las buenas prácticas de manufactura, la capacitación y concientización de los operarios disminuyó el riesgo de los consumidores a contraer enfermedades transmitidas por alimentos.

Existen diversas investigaciones que demuestran que el agregado de sustancias antimicrobianas a los film de PVC extiende la vida útil de distintos productos alimenticios almacenados con estos envases.

Índice general

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Alimentos. Generalidades	1
1.2 Seguridad Alimentaria.....	3
1.3 Buenas Prácticas de Manufactura	6
1.4 Enfermedades Transmitidos por Alimentos.....	9
1.5 Microorganismos que producen ETA	12
1.6 Microorganismos marcadores.....	16
1.7 Envase de Alimentos	19
1.7.1 Materiales utilizados en el envasado alimentario	20
1.8 Films de plástico	22
1.9 Normativa. Comidas Preparadas	23
2. HIPÓTESIS	28
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIALES Y METÓDOS	29
4.1 Toma de muestras.....	29
4.2 Análisis microbiológico	31
4.2.1 Preparación del homogenato o suspensión inicial y las diluciones sucesivas de las muestras. Metodología analítica ICMSF: 2000.....	31
4.2.2 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales. Metodología analítica ISO 4833-2:2003	31
4.2.3 Recuento de enterobacterias totales. Metodología analítica ISO 21528-2: 2004	32
4.2.4 Recuento de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> . Metodología analítica ICMSF: 2000. Adaptación Método 2: Europeo.....	32
4.2.5 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> . Metodología analítica ISO 6888-3: 2003. Corrección 2004	33
4.2.6 Determinación de <i>Salmonella spp.</i> Metodología analítica ISO 6579: 2002	34
4.2.7 Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> . Metodología analítica: Adaptación APHA: 1992	35
4.2.8 Recuento de <i>Bacillus cereus</i> . Metodología analítica ISO 7932: 2004	35
4.2.9 Recuento de hongos y levaduras. Metodología analítica: Adaptación ISO 6611: 2004-IDF 094.....	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37

5.1 Análisis microbiológico de productos terminados listos para el consumo elaborados por el comedor de la U.N.R.C.	37
5.1.1 Alimentos listos para el consumo elaborados por el comedor de la U.N.R.C. Menú tradicional	37
5.1.2 Verduras listas para consumo elaboradas por el comedor de la U.N.R.C. (producto de self-service)	38
5.2 Análisis microbiológico de comidas elaboradas por empresas que expenden sus productos en el comedor de la U.N.R.C.....	42
5.3 Análisis microbiológico de comidas elaboradas por empresas con y sin envase	44
5.4 Evaluación total de muestras analizadas de menú tradicional y alimentos elaborados por empresas expendidas en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto	49
5.5 Evaluación total de muestras analizadas listas para consumo expendidas en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto envasadas con film de PVC	52
6. CONCLUSIONES	55
6.1 Recomendaciones.....	55
7. ANEXO	56
7.1 Medios de cultivo.....	56
7.2 Reactivos.....	63
8. BIBLIOGRAFÍA	64

Índice de tablas y figuras

Figura 1: Funciones de un envase de alimentos.....	20
Figura 2: Clasificación de envases de alimentos	20
Tabla 1: Especificaciones microbiológicas para comidas preparadas según ítems I, II, III ...	24
Tabla 2: Especificaciones microbiológicas para comidas preparadas según ítem IV	24
Figura 3: Plano actual del comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto.	27
Tabla 3: Alimentos elaborados por el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Menú tradicional.....	30
Tabla 4: Verduras elaboradas por el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Sector self-service.....	30
Tabla 5: Alimentos elaborados por distintas empresas de la ciudad de Río Cuarto	31
Tabla 6: Alimentos elaborados por empresa de Río Cuarto con y sin envase.....	31
Figura 4: Colonias características de enterobacterias en medio Agar Violeta Rojo Neutro Bilis Glucosa (VRBG): violetas (fermentación de la glucosa) con halo fúcsia (precipitación de sales biliares)	32
Figura 5: Colonia característica de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar Baird- Parker: negra(reducción del telurito de potasio), brillante, con borde blanco (actividad lecitinasa), rodeada de una zona clara (actividad lipasa)	33
Figura 6: Prueba bioquímica confirmatoria de <i>Staphylococcus aureus</i> : coagulasa (producción de coágulo)	34
Figura 7: Levaduras blancas y pigmentadas en agar Extracto de levadura- Glucosa- Cloranfenicol (YGC)	36
Tabla 7: Alimentos elaborados por el comedor de la U.N.R.C. Menú tradicional	37
Tabla 8: Análisis microbiológico de verduras crudas elaboradas por el comedor de la U.N.R.C. Sector Self-Service.....	38
Figura 8: Desarrollo microbiano a través del tiempo en verduras crudas con film de PVC y almacenadas en refrigeración	39
Tabla 9: Análisis microbiológicos de verduras cocidas elaboradas por el comedor de la U.N.R.C. Servicio Self-Service.	39
Figura 9: Desarrollo microbiano a través del tiempo en verduras cocidas envasadas con film de PVC y almacenadas en refrigeración	40
Tabla 10: Análisis microbiológico de productos elaborados por empresas de Río Cuarto y región	43
Figura 10: Aptitud de consumo humano del total de muestras elaboradas por seis empresas analizadas.....	44

Tabla 11: Alimentos elaborados por una empresa de la ciudad de Río Cuarto sin envase ..	45
Tabla 12: Alimentos elaborados por una empresa de la ciudad de Río Cuarto con envase .	45
Figura 11: Recuento de RAT entre alimentos con y sin envase.....	46
Figura 12: Recuento de Enterobacterias entre alimentos con y sin envase	46
Figura 13: Recuento de HyL entre alimentos con y sin envase	47
Figura 14: Recuento de <i>S.aureus</i> entre alimentos con y sin envase.....	47
Figura 15: Recuento de <i>E.coli</i> entre alimentos con y sin envase	48
Figura 16: Recuento de CT entre alimentos con y sin envase	48
Figura 17: Aptitud de consumo humano del total de muestras elaboradas por seis empresas y por el comedor universitario.....	50

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Alimentos. Generalidades

Según el Código Alimentario Argentino (CAA), alimento es toda sustancia o mezcla de sustancias que ingeridas por el hombre aporten a su organismo los materiales y la energía necesarios para el desarrollo de sus procesos biológicos. La designación "alimento" incluye además las sustancias o mezclas de sustancias que se ingieren por hábito, costumbres, o como coadyuvantes, tengan o no valor nutritivo (CAA, 2010).

El cuerpo humano requiere la ingestión de un mínimo de nutrientes, en cantidad y calidad, para poder mantener las funciones en las diferentes etapas de la vida, lo que va acompañado habitualmente de saciedad. Además, para que el alimento sea consumido son necesarias las propiedades de color, sabor, aroma y textura. El conocimiento de los compuestos que determinan dichas propiedades y la forma en que los diferentes procesos tecnológicos pueden influir en ellos, son indispensables para poder determinar la calidad sensorial u organoléptica del alimento y, en definitiva, su mayor o menor idoneidad para formar parte de una dieta (Astiasarán y Martínez, 2000).

En general, los productos alimenticios constituyen medios adecuados para el crecimiento de los microorganismos, que pueden causar su alteración e incluso producir infecciones e intoxicaciones. Además, son susceptibles a sufrir contaminación por sustancias químicas o radioactivas representando un peligro cuando éstas alcanzan determinados niveles. Todos estos aspectos determinan la importancia de la calidad higiénico-sanitaria y toxicológica de los alimentos (Astiasarán y Martínez, 2000).

Los alimentos se clasifican en cuatro categorías, determinadas a partir del tipo de procesamiento utilizado antes de su adquisición y consumo por parte de los individuos:

1. Alimentos crudos o mínimamente procesados: los alimentos crudos son los obtenidos directamente de plantas o animales y comprados para el consumo sin haber sufrido modificaciones después de salir de la naturaleza. La adquisición de los alimentos crudos se limita a frutas, hortalizas, verduras, raíces, tubérculos y huevos. Los alimentos mínimamente procesados son los alimentos crudos que, antes de su adquisición, se sometieron a limpieza, eliminación de las partes no comestibles o no deseadas, secado, embalaje, pasteurización, refrigeración, congelación, fermentación y otros procesos que no agregan sustancias al alimento original. Este procesamiento mínimo aumenta la duración de los alimentos crudos,

preservándolos y haciéndolos adecuados para su almacenamiento. También pueden acortar las etapas de preparación, facilitar su digestión o hacerlos más apetecibles. Algunos alimentos comúnmente sometidos a estos procesos son cereales, legumbres, leche y carne. También, son considerados procesos mínimos la molienda y refinación, utilizadas en la producción de harina y pasta.

2. Ingredientes culinarios: en este grupo se encuentran aceites vegetales (soja, maíz, girasol), grasas (manteca, grasa de coco), sal, azúcar, los cuales son productos alimenticios fabricados por la industria con la extracción de sustancias presentes en alimentos crudos o, en el caso de la sal, presentes en la naturaleza. Estos productos se utilizan para sazonar y cocinar los alimentos crudos o mínimamente procesados y raramente se comen solos.

3. Alimentos procesados: son productos industrializados elaborados principalmente con adición de sal o azúcar (y eventualmente aceite o vinagre) a un alimento crudo o mínimamente procesado. Dichos alimentos han sufrido modificaciones relativamente simples con el fin de prolongar la vida útil de los alimentos crudos o mínimamente procesados y, frecuentemente, hacerlos más apetecibles. Algunos ejemplos son: conservas de verduras, cereales, legumbres y pescado, frutas en almíbar, carnes saladas (carne seca, charqui, tocino, jamón), quesos y panes hechos con harina de trigo, agua, sal y levadura.

4. Alimentos ultra-procesados: son formulaciones industriales listas para el consumo y hechas total o principalmente de sustancias extraídas de alimentos (aceites, grasas, azúcar, almidón, proteínas), derivadas de componentes de los alimentos (grasas hidrogenadas, almidón modificado) o sintetizadas en laboratorio con base en materias orgánicas (colorantes, aromatizantes, potenciadores del sabor y diversos tipos de aditivos utilizados para proporcionar a los productos propiedades sensoriales atractivas). Generalmente, poseen poca (o ninguna) cantidad de alimentos crudos o mínimamente procesados en su composición. Entre estos alimentos se incluyen galletas dulces y saladas, papas, cereales, barras de cereales, dulces en general, helados, comidas rápidas, fideos instantáneos, varios tipos de platos preparados o semi-listos, refrescos, jugos artificiales, bebidas energéticas y bebidas lácteas. El pan y otros panificados son ultra-procesados cuando, además de harina de trigo, levadura, agua y sal, los ingredientes incluyen sustancias tales como grasa vegetal hidrogenada, azúcar, almidón, suero de leche, emulsionantes y otros aditivos (Monteiro y Da Costa Louzada, 2015).

Estos alimentos constituyen un problema para la salud humana por distintas razones: tienen muy baja calidad nutricional y, por lo general, son extremadamente sabrosos, a veces hasta adictivos; imitan los alimentos y se los ve erróneamente como saludables; fomentan el

consumo de snacks; se anuncian y comercializan de manera agresiva; y son cultural, social, económica y ambientalmente destructivos. A nivel mundial, las ventas de productos ultraprocesados aumentaron un 43,7% entre los años 2000 y 2013 (de 328.055 kilotoneladas en 2000 a 471.476 kilotoneladas en 2013). Por ejemplo, en el año 2000 las ventas en volumen de estos productos en América del Norte (Estados Unidos y Canadá) ascendieron a 102.868 kilotoneladas, lo que representa el mayor mercado individual del mundo, con un 31,4% de ventas. En el mismo año, Asia y el Pacífico asiático se constituyeron en el segundo mercado más grande (19,5% de ventas), seguido por Europa occidental (19,3%) y América Latina (16,3%) (OPS, 2015).

En nuestro país, el consumo de alimentos y bebidas se ha modificado en las dos últimas décadas, destacándose una disminución en el consumo de frutas y vegetales, harina de trigo, legumbres, carne vacuna y leche; y el aumento en el consumo de masas de tartas y empanadas, carne porcina, productos cárnicos semielaborados, yogurt, gaseosas, jugos y comidas listas para consumir. La modificación en la estructura de la dieta atraviesa a toda la sociedad en diferente medida y parecería indicar un cambio en la forma de comprar, preparar y consumir los alimentos, relacionado con una mayor practicidad y menos tiempo dedicado a la preparación. Esto está relacionado con la incorporación de la mujer al mercado laboral, que en la actualidad alcanza a casi la mitad de las mujeres argentinas, y que implica menos tiempo disponible para la elaboración de alimentos, a lo que se suma la falta de conocimientos y habilidades culinarias que incrementa la necesidad de comidas de fácil elaboración o listas para consumir. Otro factor asociado, en el caso de personas adultas, es la necesidad de consumir alimentos fuera del hogar por razones laborales sobre todo en los grandes centros urbanos, mientras que en los niños y adolescentes ocurre lo mismo por razones de sociabilidad o escolaridad (Zapata y col., 2016).

Los alimentos listos para consumo implican operaciones de troceado, cortado en lonjas, dosificación y envasado que incrementan los riesgos de una contaminación accidental por patógenos (Ordoñez Pareda y col, 2017).

1.2 Seguridad alimentaria

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias a fin de llevar una vida activa y sana. Existe seguridad alimentaria si se dan cuatro condiciones:

- Una oferta y disponibilidad de alimentos adecuados.
- Estabilidad de la oferta, sin fluctuaciones ni escasez, en función de la estación del año.
- Acceso a los alimentos o la capacidad para adquirirlos.
- Buena calidad e inocuidad de los mismos (Armendáriz Sanz, 2008).

En la Unión Europea, en general, las tres primeras condiciones están logradas. Se trata de tener acceso a una oferta continua, variada y suficiente de los alimentos. En cuanto a la buena calidad e inocuidad de los mismos se llevan a cabo mecanismos que garanticen que el producto alimenticio llegue al consumidor en las mejores condiciones de calidad e inocuidad para las personas y el medio ambiente. La experiencia acumulada por diversas crisis y problemas de salud alimentaria ha sido importante para establecer una serie de normas, en continua evolución, dirigidas a la seguridad del consumidor (Armendáriz Sanz, 2008).

La seguridad alimentaria está estrechamente relacionada con los conceptos de calidad e inocuidad de los alimentos. La calidad se refiere a todos aquellos atributos que influyen en el valor de un producto para un consumidor, abarca a los atributos negativos, tales como el grado de descomposición, olores desagradables, decoloración, etc., y también características positivas como aroma, textura, origen, color, etc. Por otro lado, la inocuidad se define como el conjunto de condiciones y medidas necesarias durante la producción, elaboración, almacenamiento, distribución, preparación y consumo de los alimentos para asegurar que, una vez ingeridos, no representen un riesgo para la salud. Este último concepto incluye la contaminación por agentes biológicos, químicos o físicos que pueden afectar la salud. Dentro de los agentes físicos se encuentran las partículas y cuerpos extraños que llegan al alimento, generalmente, durante su manipulación o transporte: partículas de vidrio, madera, plástico, restos orgánicos, etc. Los agentes químicos son tóxicos de origen químico que pueden estar presentes en alimentos de forma natural (toxinas de vegetales, animales y hongos) o de forma accidental (herbicidas, pesticidas, restos de medicamentos, productos de limpieza, aceites y lubricantes utilizados para el funcionamiento y mantenimiento de máquinas). Por último, los agentes biológicos son los más frecuentes y variados, entre ellos, se encuentra la contaminación por microorganismos, insectos y roedores (FAO, 2010; García Romana, 2012).

La Organización Internacional de Normalización (ISO) define las normas como acuerdos documentados que contienen especificaciones técnicas y otros criterios precisos para su uso consecuente como reglas, directrices o definiciones, con el objetivo de asegurar que los materiales, productos, procesos y servicios sean apropiados a su fin (Dankers, 2004).

Dentro de las normas establecidas a nivel internacional que involucran inocuidad de alimentos se encuentra el Codex Alimentarius, establecido conjuntamente por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). La aplicación de las mismas hace que los alimentos sean más sanos para los consumidores y asegura prácticas más justas en el comercio mundial, cada vez mayor, en beneficio de los agricultores y otros productores de alimentos. Estas normas internacionales sirven de base para las normas nacionales. La FAO y la OMS contribuyen al proceso normativo aportando asesoramiento científico, que permite al Codex establecer y poner al día sus normas con base en el conocimiento científico más reciente en materia de inocuidad de los alimentos. El asesoramiento científico comprende la evaluación de peligros de origen químico, microbiológico, riesgos y nuevas tecnologías, y evaluaciones de la relación riesgo-beneficio de diversas prácticas en la cadena de alimentos.

Los resultados del Codex Alimentarius comprenden el establecimiento de:

- más de 200 normas para alimentos, productos específicos o grupos de productos, que abarcan los principales productos alimentarios que participan en el comercio internacional, normas para el etiquetado y los métodos de análisis;
- más de 100 códigos de prácticas y directrices para reducir la contaminación y asegurar la higiene de los alimentos durante la producción, la manipulación y el transporte, así como directrices para la inspección y certificación de los alimentos, y para la evaluación de los alimentos modificados genéticamente;
- más de 3.700 límites máximos de residuos (LMR) para los diversos plaguicidas y medicamentos veterinarios que se utilizan en la agricultura;
- más de 2.000 disposiciones sobre aditivos alimentarios;
- 150 dosis máximas y de referencia recomendadas para contaminantes y sustancias tóxicas presentes naturalmente en los alimentos, comprendidas las micotoxinas (FAO, 2014).

La producción de un alimento seguro requiere:

- Control de materia prima.
- Control de diseño y proceso del producto.
- Buenas prácticas higiénicas durante producción, procesamiento, manipulación, distribución, almacenamiento, venta, preparación y utilización.
- Un enfoque preventivo, dado que es limitada la eficacia del análisis microbiológico del producto terminado (Forsythe, 2003).

Los procesos de producción pueden ser muy complicados, por lo tanto, la elaboración de alimentos seguros en una industria exige la colaboración de todo el personal, desde los operarios de limpieza de la planta, hasta la gerencia. De aquí la existencia de diversos planes de gestión de la seguridad como las Buenas Prácticas Higiénicas (BPH), Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) y Gestión de la Calidad Total (TQM) (Forsythe, 2003).

1.3 Buenas Prácticas de Manufactura

Las Buenas Prácticas de Manufactura son un conjunto de principios y recomendaciones técnicas que se aplican en el procesamiento de alimentos para garantizar su inocuidad y su aptitud, y para evitar su adulteración. También se les conoce como las “Buenas Prácticas de Elaboración” (BPE) o las “Buenas Prácticas de Fabricación” (BPF) (IICA, 2009).

Los consumidores son cada vez más exigentes en relación a la calidad de los productos que adquieren. La inocuidad de los alimentos es esencial, por lo que existen normas en el ámbito nacional (CAA) y del Mercosur que consideran formas de asegurarla. El CAA incluye en su Capítulo II la obligación de aplicar las BPM. Asimismo, la Resolución N° 80/96, Reglamento Técnico Mercosur sobre las Condiciones Higiénico Sanitarias y de Buenas Prácticas de Elaboración para Establecimientos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos, indica la aplicación de las BPM para establecimientos elaboradores de alimentos que comercializan sus productos en dicho mercado. Dada esta situación, aquellos que estén interesados en participar del mercado global deben contar con las mismas (Feldman y col., 2016).

Las BPM son una herramienta básica para la obtención de productos seguros para el consumo humano, que se centralizan en la higiene y forma de manipulación:

- Son útiles para el diseño y funcionamiento de los establecimientos y para el desarrollo de procesos y productos relacionados con la alimentación.
- Contribuyen a una producción de alimentos inocuos.
- Son indispensables para la aplicación del Sistema HACCP, de un programa TQM o de un Sistema de Calidad como ISO 9000.
- Se asocian con el control a través de inspecciones del establecimiento (Feldman y col., 2016).

Dentro de las incumbencias técnicas de las BPM se encuentran:

1) Producción primaria: el control de los peligros alimentarios debe hacerse a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta el consumidor final, para lograr el objetivo de que los alimentos sean inocuos y aptos para el consumo humano. Si se sospecha que las materias primas son inadecuadas para el consumo, deben aislarse y rotularse claramente, para luego eliminarlas. Las medidas para evitar contaminaciones químicas, físicas y/o microbiológicas son específicas para cada establecimiento elaborador. Las materias primas deben ser almacenadas en condiciones apropiadas que aseguren la protección contra contaminantes, alejadas de los productos terminados para impedir la contaminación cruzada. Además, deben tenerse en cuenta las condiciones óptimas de almacenamiento como temperatura, humedad, ventilación e iluminación. El transporte debe prepararse teniendo en cuenta los mismos principios higiénico-sanitarios que se consideran para los establecimientos (IICA, 2009; PCAA, 2014).

2) Establecimiento: en esta sección se tienen en cuenta la estructura y la higiene. En cuanto a la estructura, sólida y sanitariamente adecuada, el establecimiento no debe estar ubicado en zonas inundables, con olores desagradables, humo, polvo, gases, luz o radiación que puedan afectar la calidad del producto que se elabora. Las aberturas deben impedir la entrada de animales domésticos, insectos, roedores y contaminantes del medio ambiente como humo, polvo, vapor, etc. Debe tener un diseño que permita realizar eficazmente las operaciones de limpieza y desinfección. El agua utilizada debe ser potable, provista a presión adecuada y a la temperatura necesaria, con un desagüe adecuado. Todos los utensilios, equipos y edificios deben mantenerse en buen estado higiénico, de conservación y de funcionamiento. Para organizar estas tareas, es recomendable aplicar los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES) que describen qué, cómo, cuándo y dónde limpiar y desinfectar, así como los registros y advertencias que deben llevarse a cabo. Las sustancias tóxicas (plaguicidas, solventes u otras sustancias que pueden representar un riesgo para la salud y una posible fuente de contaminación) deben estar rotuladas con un etiquetado bien visible y ser almacenadas en áreas exclusivas. Estas sustancias deben ser manipuladas sólo por personas autorizadas (PCAA, 2014).

3) Higiene del personal: el CAA establece en el Capítulo II, Artículo 21, como obligatorio que todo el personal que trabaje en un establecimiento elaborador de alimentos debe estar provisto de libreta sanitaria nacional única, expedida por la autoridad sanitaria competente y con validez en todo el territorio nacional. Los manipuladores de alimentos deben recibir la capacitación primaria con conocimientos de enfermedades transmitidas por alimentos, medidas higiénico-sanitarias básicas para la manipulación correcta de alimentos, criterios y concientización del riesgo involucrado en el manejo de materias primas, aditivos, ingredientes,

envases, utensilios y equipos durante el proceso de elaboración, entre otros. Además, deben someterse a exámenes médicos periódicamente. Cualquier persona que perciba síntomas de enfermedad o sufra una herida no puede manipular alimentos o superficies en contacto con alimentos hasta su alta médica. Es indispensable el lavado de manos de manera frecuente y minuciosa y mantener la higiene personal, se debe llevar ropa protectora, calzado adecuado y cofia. No se puede fumar, escupir, comer, estornudar o toser sobre los alimentos, tocar el cabello o el rostro, limpiarse el sudor con las manos, salir con el uniforme de trabajo a zonas expuestas a contaminación, usar joyas, broches, etc. Se deben guardar ropa y otros objetos personales cuando el personal se encuentre en áreas donde los alimentos estén expuestos o donde se laven equipos y utensilios (Feldman y col., 2016).

4) Mantenimiento e higiene: las instalaciones y los equipos deben mantenerse en buenas condiciones para facilitar las actividades de saneamiento, el funcionamiento de los equipos y evitar la contaminación de los alimentos. La limpieza puede realizarse aplicando métodos físicos y químicos, en forma separada o combinada. Entre los métodos físicos se encuentran el fregado, raspado, uso de vapor, corrientes turbulentas o aspiradoras y, dentro de los métodos químicos el uso de detergentes, álcalis o ácidos. Consiste en la eliminación de residuos gruesos de las superficies, la aplicación de una solución de limpieza y enjuague con agua, para realizar al final la desinfección. En cuanto a los programas de limpieza y desinfección, éstos deben indicar superficies, equipos y utensilios que se van a limpiar y asignar personal responsable, métodos o procedimientos que se van a aplicar, frecuencia de la limpieza y desinfección y medidas de vigilancia. Por último, es importante un programa de control de plagas, que tiene como objetivo prevenir la introducción y la proliferación de plagas y, si es necesario, tomar las medidas de erradicación correspondientes (IICA, 2009).

5) Controles operacionales: sirven para detectar la presencia de contaminantes físicos, químicos y/o microbiológicos y para verificar que los controles se lleven a cabo correctamente. Una persona responsable realiza controles de residuos de pesticidas, metales y de tiempos y temperaturas (PCAA, 2014).

6) Transporte y distribución: los alimentos deben estar protegidos durante el transporte. El vehículo nunca debe introducir contaminación en el alimento, sino que debe protegerlo de polvo, humo, combustible y de la carga de otros alimentos. Los medios de transporte, contenedores y depósitos de alimentos deben mantenerse limpios y en buen estado. Si se utiliza el mismo medio de transporte o el mismo recipiente para diferentes alimentos o para productos no alimentarios, este debe limpiarse a fondo y, de ser necesario, debe ser desinfectado entre una carga y otra. Se recomienda llevar un registro de los cargamentos previos para el control de la contaminación cruzada (IICA, 2009).

7) Información del producto y sensibilización de los consumidores: se deben cumplir las normas de etiquetado vigentes: identificación del lote, útil para la rastreabilidad y, de ser necesario, facilitar el retiro de los productos (permite identificar los lotes afectados); instrucciones claras que permitan manipular, exponer, almacenar o utilizar el producto alimenticio sin afectar su inocuidad (IICA, 2009).

8) Capacitación: todas las personas que estén en contacto directo o indirecto con alimentos deben ser capacitadas. La capacitación es fundamental para cualquier sistema de gestión de inocuidad de alimentos (IICA, 2009).

9) Documentación: es un aspecto básico, ya que define procedimientos y controles y permite un fácil y rápido rastreo de los alimentos ante la investigación de productos defectuosos. Deberá permitir diferenciar números de lotes, siguiendo el historial de los alimentos desde la utilización de insumos hasta el producto terminado, incluyendo el transporte y la distribución (PCAA, 2014).

1.4 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) se definen como el síndrome originado por la ingestión de alimentos y/o agua, que contengan agentes biológicos o no biológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población. Son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo de transmisión de organismos dañinos y/o sustancias tóxicas (Guerrero, 2016; Panalimentos OPS/OMS, 2002).

Un brote de ETA se da cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento y los análisis epidemiológicos señalan al alimento como el origen de la enfermedad, que luego es confirmado por análisis de laboratorio (Panalimentos OPS/OMS, 2002).

Las ETA pueden manifestarse a través de:

- **Infecciones**: producidas por la ingestión de alimentos y/o agua contaminados con agentes infecciosos. Ejemplos: hepatitis, salmonelosis, listeriosis, yersiniosis, brucelosis, triquinosis, entre otros.

- **Intoxicaciones**: producidas por la ingestión de toxinas (productos metabólicos de los microorganismos), formadas en tejidos de plantas o animales, o sustancias químicas incorporadas en cualquiera de los eslabones de la cadena alimentaria. Ejemplos: intoxicación por toxina de estafilococo, botulismo, por plaguicidas, por mariscos, entre otros.

• Toxoinfecciones: ocurren cuando los agentes infecciosos ingeridos con alimentos contaminados producen toxinas dentro del huésped. Ejemplos: *Vibrio cholerae*, botulismo infantil, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, entre otros (Panalimentos OPS/OMS, 2002).

Estas enfermedades se caracterizan según dos parámetros: la dosis infectiva mínima (DIM), el menor número de células que iniciará la infección y causará los síntomas de la enfermedad en individuos sanos; y la dosis infectiva 50% (DI₅₀), que es el número de células que provoca los síntomas de la enfermedad aproximadamente en el 50% de la población expuesta (Mossel y col., 2006).

Para que ocurra una ETA, el patógeno o sus toxinas deben estar presentes en el alimento. Sin embargo, la sola presencia del patógeno no significa que la enfermedad ocurrirá. En la mayoría de los casos de ETA:

- El patógeno debe estar presente en cantidad suficiente como para causar una infección o para producir toxinas.
- El alimento debe presentar características intrínsecas que favorezcan el desarrollo del agente.
- El alimento debe permanecer en la zona de peligro de temperatura durante tiempo suficiente como para que el organismo patógeno se multiplique y/o produzca toxina. Otras condiciones extrínsecas deben prevalecer para que esta multiplicación y/o producción de toxina sea favorecida.
- Debe ingerirse una cantidad suficiente del alimento conteniendo el agente, para que la barrera de susceptibilidad del individuo sea sobrepasada (OPS, 2016).

Los alimentos afectados con más frecuencia son los de origen animal (90%) y las fuentes de contaminación suelen estar en los establecimientos de expendio y consumo por encima de las plantas de procesamiento. Las manifestaciones clínicas más frecuentes y complicaciones de las ETA son: dolor intestinal, fiebre, diarrea y/o vómitos detectándose complicaciones en los casos donde se traten de poblaciones vulnerables como niños, ancianos y personas inmunodeprimidas (Oliva Martínez, 2008).

Como consecuencia de los cambios en el sistema de vida y en los hábitos alimentarios, las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados han surgido como una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Se han descrito alrededor de 250 agentes causantes de ETA, entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos,

parásitos, priones, toxinas y metales. Estas enfermedades son un problema cada vez más importante a nivel internacional y en cada uno de los países debido, entre otras cosas, al intercambio comercial y al intenso movimiento de las personas. Según estimaciones de la OMS, en América Latina las infecciones transmitidas por alimentos representan alrededor del 70% de los casos de enfermedad diarreica aguda. El patógeno de transmisión alimentaria más estudiado a nivel clínico y alimentario, es *Salmonella*. Entre el año 2001 y el 2007 se ha reportado un total de 221 casos de *Salmonella* aisladas a partir de muestras clínicas y muestras de alimentos (Boric Bonifaz, 2008).

Se ha demostrado que la falta de higiene es la principal causa de las ETA, que se puede concretar por ciertos errores y factores (Gutiérrez Bello, 2000).

Dentro de los errores más frecuentes se encuentran:

1- Preparación de alimentos con demasiada antelación a su consumo. Una espera a una temperatura inadecuada permite la proliferación microbiana.

2- Cocción con un tratamiento térmico poco apropiado, al resultar insuficiente para destruir o, al menos, reducir la carga microbiana.

3- Uso de instalaciones, equipos y utensilios mal diseñados, que posibilitan que se produzcan contaminaciones cruzadas.

4- Fallos de higiene en los manipuladores de alimentos, que pueden ser personas portadoras o colonizadas por un agente patógeno.

Entre los factores más habituales se encuentran:

1) La contaminación del alimento, que pudo haber ocurrido por: manipulación incorrecta, suciedad del medio, aguas residuales, insectos, fallos tecnológicos.

2) La cantidad de microorganismo que se encuentra en el alimento: cada microorganismo tiene un umbral por encima del cual puede producir la enfermedad.

3) La temperatura a la que se almacena o se conserva el alimento hasta su consumo. Es un factor que resulta clave, ya que la multiplicación de cada tipo de microorganismo depende de la temperatura del medio.

4) El tiempo también es determinante de los niveles que puede alcanzar el desarrollo de la población microbiana contenida en un alimento.

5) El pH marca la acidez del medio, que facilita o impide la multiplicación de los microorganismos.

6) La actividad acuosa, que significa la disponibilidad del agua existente en el alimento, determina si un microorganismo puede multiplicarse.

7) La concentración de sales, ya que la presión osmótica del medio puede impedir el desarrollo de aquellos microorganismos que suelen ser patógenos para el ser humano.

8) El tratamiento tecnológico recibido por el alimento, de modo particular el orientado hacia su conservación: salazón, ahumado, pasteurización, adición de agentes conservantes, etc. (Gutiérrez Bello, 2000).

1.5 Microorganismos que producen ETA

En general, los microorganismos causantes de ETA son de origen exógeno, es decir, proceden de contaminantes derivados de la obtención o el procesamiento de los alimentos. Sin embargo, en otros casos los microorganismos pueden originarse en el propio alimento, tratándose así, de una contaminación endógena (Equipo Vértice, 2005).

La mayoría de las ETA no son graves, en general, se resuelven espontáneamente en un plazo de dos a cinco días. Sin embargo, también existen otras enfermedades que presentan una sintomatología más grave e incluso son mortales para determinados grupos de riesgo como niños, ancianos y pacientes con otras enfermedades de base (Equipo Vértice, 2005; Mossel y col., 2006).

Dentro de las bacterias que aparecen con mayor frecuencia como productores de ETA se mencionan a: *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes*, entre otras.

❖ *Salmonella* spp. Produce una infección llamada salmonelosis. La mayoría de las personas afectadas por esta bacteria desarrollan cuadros gastrointestinales tales como: diarrea, fiebre y dolores abdominales entre 12 y 72 h después de consumido el alimento contaminado. Entre los alimentos implicados se encuentran: carne vacuna, de aves y de cerdo, huevos, leche y productos lácteos, pescado, camarones, ancas de rana, especias, levadura, coco, salsas, aderezo preparado con huevo no pasteurizado, mezclas para tortas, postres rellenos con cremas elaboradas con huevo crudo, gelatina seca, manteca de maní, cacao, frutas, vegetales (como tomates, ajíes, melón), chocolate, etc. (Equipo Vértice, 2005; ANMAT, 2015).

En Argentina, la salmonelosis como tal no se encuentra declarada como evento de notificación obligatoria, pero queda englobada en los eventos Diarreas Agudas en Enfermedades de Transmisión Alimentaria, notificada al Sistema Nacional de Vigilancia del Ministerio de Salud. Durante el año 2013 el análisis de los casos positivos para agentes bacterianos muestra que *Salmonella* spp. fue el segundo agente causal de diarrea; la mayor

proporción corresponde a las bacterias sin serotipificar, seguidas por las serovariedades Enteritidis y Typhimurium (ANMAT, 2015).

❖ *Staphylococcus aureus*. Produce intoxicación alimentaria por el consumo de alimentos en los que la bacteria se ha multiplicado y producido la enterotoxina. Esta toxina resiste la irradiación, la actividad de enzimas proteolíticas y es termoestable, presenta elevada resistencia a los tratamientos térmicos habituales y se inactiva a temperatura de esterilización (Mossel y col., 2006; ANMAT, 2013).

La intoxicación estafilocócica es un síndrome caracterizado por náuseas, vómitos, diarrea, malestar y debilidad. Los síntomas comienzan a manifestarse entre 1 a 6 h después de consumido el alimento. Aunque la enfermedad es raramente mortal, los casos graves pueden complicarse presentándose a veces deshidratación y shock. El hombre es el principal reservorio de *S.aureus*, se encuentra en la piel y en las vías respiratorias superiores (nasofaringe). Entre los alimentos implicados más frecuentes se encuentran: carne de mamíferos y aves, leche y sus derivados como queso, crema, yogur y helados, productos de pastelería rellenos de crema, ensaladas, alimentos cortados en rebanadas, sándwiches y otros tipos de alimentos que llevan manipulación por parte del operador (ANMAT, 2013).

❖ *Escherichia coli*. Es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E.coli* son inocuas. Sin embargo, existen cepas de esta especie que producen diarreas en el hombre: *E.coli* enteropatógena (EPEC), *E.coli* enterotoxigénica (ETEC), *E.coli* enteroinvasiva (EIEC), *E.coli* enteroagregativa (EAEC) y *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) (Mossel y col., 2006; OMS, 2017).

En Argentina, el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad endémica con aproximadamente 400 a 500 casos nuevos cada año. La frecuencia de aparición es mayor durante los meses cálidos, aunque se presentan durante todo el año. La infección por *E.coli* productor de toxina shiga (STEC) es la principal causa de SUH (40 % de los casos), siendo *E.coli* 0157:H7 el serotipo predominante. Una vez que STEC ingresa al organismo las manifestaciones clínicas comienzan 3 a 4 días después, con dolores abdominales y diarrea acuosa que, en los días siguientes, puede progresar a diarrea sanguinolenta. El 90% de los casos se resuelven en esta instancia, sin embargo, el 10% evoluciona a SUH. Esta enfermedad afecta principalmente a niños menores de 5 años, siendo la primera causa de insuficiencia renal pediátrica. En su forma clásica el SUH es un cuadro caracterizado por una tríada clínica: insuficiencia renal aguda, trombocitopenia (reducción de plaquetas) y anemia hemolítica microangiopática (ruptura anormal de los glóbulos rojos) (ANMAT, 2012).

Entre los alimentos comúnmente asociados están: carne bovina (mayor incidencia), carne de ovejas y cabras, agua (incluso agua de red deficientemente tratada), leche y sus derivados no pasteurizados, frutas y verduras, jugos de frutas sin pasteurizar, entre otros (ANMAT, 2012).

❖ *Bacillus cereus*. Es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo y esporoformador, las esporas confieren a la bacteria resistencia a condiciones adversas. Si estas condiciones son las apropiadas, la espora germina y el microorganismo puede crecer. Para la germinación, algunas cepas necesitan activación por calor (shock térmico) (ANMAT, 2013).

Se han descrito dos tipos de síndromes causados por *B.cereus*. El primero, denominado síndrome diarreico, los síntomas aparecen 8 a 16 horas después de la ingestión y se asocian una gran variedad de alimentos: sopas de verduras, salsas, carnes, flanes y budines. Los síntomas son diarrea y dolor abdominal. Y el segundo tipo, llamado síndrome emético, produce principalmente vómitos en un plazo de 5 a 7 h después de la ingesta del alimento. Se presenta, sobre todo, tras el consumo de arroz hervido o frito conservado a una temperatura elevada durante varias horas después de la cocción (Mossel y col., 2006).

❖ *Clostridium perfringens*. Es un bacilo Gram positivo grande, esporoformador y produce una toxoinfección. La enfermedad se presenta cuando el individuo ingiere un alimento contaminado con elevado número de células vegetativas ($>10^6$ UFC) las cuales, al llegar al intestino delgado, esporulan y liberan las enterotoxinas. Este microorganismo está ampliamente distribuido en la naturaleza, puede contaminar una gran variedad de alimentos, con mayor frecuencia aquellos preparados con antelación y en grandes cantidades para ser servidos en reuniones masivas, sin que reciban el adecuado tratamiento térmico para destruir las esporas termorresistentes. Dichos alimentos pueden ser: carnes, pollo, productos lácteos, hortalizas, especias, alimentos rellenos, etc. (Gutiérrez Bello, 2000; ANMAT, 2013).

La enfermedad desarrolla una serie de trastornos digestivos con una duración aproximada de 6 a 8 h. El síntoma más frecuente es un fuerte dolor abdominal. En general se considera una enfermedad benigna y, en personas adultas, los trastornos gastroentéricos sólo duran un día porque experimentan una regresión espontánea sin dejar secuelas, debido a que la enterotoxina no origina lesiones en la mucosa intestinal. En cambio, no ocurre lo mismo en las personas debilitadas y en los ancianos (Gutiérrez Bello, 2000).

❖ *Clostridium botulinum*. Es una bacteria anaerobia estricta, Gram positiva y esporógena. La enfermedad que produce se denomina botulismo y existen distintos tipos:

- Por transmisión alimentaria: cuando el microorganismo crece en un alimento sintetiza una neurotoxina muy potente que, luego de ingerida con el alimento, impide la liberación de acetilcolina en las neuronas. Los síntomas consisten en visión doble, caída del párpado superior y dificultad en la deglución. Las náuseas, vómitos, retorcijones abdominales, estreñimiento y diarreas preceden a la aparición de síntomas neurológicos. Estos síntomas se presentan dentro de las 18-36 h después del consumo del alimento (Mossel y col., 2006).

La toxina, producida por la bacteria que crece en condiciones anaeróbicas, se destruye mediante temperaturas mayores a 85 °C durante al menos 5 min. El microorganismo no se desarrolla en condiciones de acidez (pH inferior a 4,5), por lo tanto, la toxina no se generará en alimentos ácidos. Dicha toxina se ha encontrado en diversos alimentos, incluidas conservas vegetales con bajo grado de acidez tales como judías verdes, espinacas, setas y remolachas; pescados, incluido el atún en lata y los pescados fermentados, salados y ahumados; y productos cárnicos como jamón y salchichas (OMS, 2017).

- Del lactante: el botulismo en lactantes suele afectar a niños menores de seis meses. A diferencia del botulismo de transmisión alimentaria, causado por la ingestión de toxinas previamente generadas en los alimentos, éste se produce cuando los lactantes ingieren esporas de *C.botulinum* que germinan a células vegetativas, colonizan el intestino y liberan toxinas. En la mayoría de los adultos y los niños mayores de seis meses esto no ocurre, porque las defensas naturales del intestino que el organismo desarrolla con el tiempo impiden la germinación y el crecimiento de la bacteria.

En los lactantes, los síntomas clínicos incluyen constipación, pérdida de apetito, debilidad, llanto alterado y una apreciable pérdida del control de la cabeza. Aunque son varias las fuentes posibles de infección de lactantes con botulismo, la miel contaminada con esporas se asoció a algunos casos.

- Por heridas: es infrecuente y se produce cuando las esporas entran en una herida y las células vegetativas pueden reproducirse en un medio anaeróbico. Los síntomas son similares al botulismo de transmisión alimentaria, pero pueden tardar hasta dos semanas en aparecer. Esta forma de la enfermedad se relacionó con el abuso de sustancias, especialmente, con la inyección de heroína en personas adictas.

- Por inhalación: es poco frecuente y está asociado a sucesos accidentales o intencionales (como el bioterrorismo) que dan lugar a la liberación de las toxinas en aerosoles. Presenta manifestaciones clínicas similares a las del botulismo de transmisión alimentaria. Tras la inhalación de la toxina, los síntomas aparecen después de uno a tres días y ese tiempo es mayor cuando los niveles de intoxicación son más bajos. Los síntomas

son similares a los que provoca la ingestión de toxina botulínica y culminan en parálisis muscular e insuficiencia respiratoria (OMS, 2017).

❖ *Listeria monocytogenes*. Es un bacilo no esporulado que causa una infección conocida como listeriosis y que se encuadra dentro del grupo de enfermedades emergentes; actualmente los brotes epidémicos en diferentes partes del mundo van en aumento y cada vez con mayor número de afectados. Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente (suelo, vegetación, agua dulce y salada) y también crece y sobrevive en un amplio rango de temperaturas (4-65 °C). Los tratamientos de pasteurización son capaces de destruirla (Gutiérrez Bello, 2000; Equipo Vértice, 2005).

Su reservorio frecuente es el tracto intestinal de una gran variedad de animales: insectos, anfibios, peces, aves, roedores, animales domésticos de compañía y de granja, etc. (Gutiérrez Bello, 2000).

Los síntomas incluyen: fiebre, dolores musculares y, ocasionalmente, molestias gastrointestinales. En el caso de mujeres embarazadas produce abortos en el segundo trimestre de gestación; partos prematuros con muerte intrauterina del feto; infección en el recién nacido, en caso de un parto a término puede afectar a la meninges entre la primera y cuarta semana del nacimiento, con un elevado nivel de mortalidad (Equipo Vértice, 2005; Gutiérrez Bello, 2000).

Es frecuente encontrar este microorganismo en leche cruda y en aquellos derivados lácteos elaborados a partir de leche sin pasteurizar. También se encuentra en productos cárnicos, verduras y hortalizas (Equipo Vértice, 2005).

1.6 Microorganismos marcadores

La evaluación sanitaria de un alimento se realiza mediante análisis microbiológicos. En este sentido, algunos microorganismos pueden tener una gran significación sanitaria, aunque no sean patógenos, debido a que su presencia puede ser una señal marcadora de la calidad higiénica del alimento analizado (Gutiérrez Bello, 2000).

Para estos efectos cabe distinguir dos grupos de microorganismos marcadores:

~Índices: microorganismos cuya presencia en cantidades o niveles por encima de ciertos límites numéricos indica la presencia de patógenos, similares desde el punto de vista ecológico.

~Indicadores: marcadores cuya presencia en cantidades determinadas indica un tratamiento o proceso de inocuidad inadecuado (Mossel y col., 2006).

La finalidad del uso de marcadores es comprobar la eficacia de los tratamientos tecnológicos destinados a conseguir la inocuidad de los productos alimenticios. En la práctica, el análisis de microorganismos marcadores puede hacerse para inspeccionar la duración de la vida útil de un alimento, pero se emplea con mayor frecuencia para evaluar la inocuidad, relacionada con su calidad sanitaria. En este caso, los microorganismos elegidos deben cumplir con algunos requisitos importantes:

- Ser detectables con rapidez y facilidad.
- Ser fácilmente diferenciables de otros microorganismos que estén presentes en los alimentos.
- Ser conocida su relación con los patógenos cuya presencia se indica.
- Estar siempre presente cuando también lo esté el patógeno.
- Presentar necesidades de crecimiento y desarrollo iguales a las del patógeno.
- Presentar una mortalidad que al menos sea paralela a la del patógeno, así como superarle en su persistencia.
- No estar presente en los alimentos exentos del patógeno (Gutiérrez Bello, 2000).

Los microorganismos marcadores más importantes son:

☞ Microorganismos aerobios mesófilos viables totales: se incluyen todos los microorganismos capaces de desarrollar en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20 y 45 °C, con una óptima entre 30 y 40 °C. El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en condiciones establecidas, estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. Refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además, las condiciones higiénicas de la materia prima y la forma como fueron manipulados durante su elaboración. Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena (ANMAT, 2014).

Un recuento elevado 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 producto (ANMAT, 2014).

☞ Hongos y levaduras: los hongos son organismos aerobios estrictos, eucariotas y heterótrofos, con nutrición por absorción. Desarrollan en un rango de pH de 2 a 9, temperaturas entre 10 a 35 °C y pueden crecer en condiciones de actividad de agua (a_w) relativamente bajas ($<0,85$), aunque las levaduras generalmente requieren una mayor actividad acuosa. En alimentos no ácidos que conservan la humedad, las levaduras y los hongos crecen más lentamente que las bacterias y por ello pocas veces determinan problemas en tales alimentos. En los alimentos ácidos y en los de baja actividad de agua, crecen con mayor rapidez que las bacterias, determinando importantes pérdidas por alteración de frutas frescas y zumos, vegetales, quesos, alimentos en salazón, cereales y encurtidos, así como en los alimentos congelados y en los deshidratados, cuyo almacenamiento se realiza en condiciones no adecuadas. La importancia de la presencia de hongos y levaduras en los alimentos está determinada por la capacidad de producir diferentes grados de deterioro y descomposición de los mismos. Además, los hongos producen metabolitos tóxicos conocidos como micotoxinas, compuestos estables que no se destruyen durante el procesamiento de alimentos, por lo que son responsables de intoxicación con consecuencias graves (cáncer, mutagénesis) en los órganos afectados. También están asociados a reacciones alérgicas e infecciones principalmente en la población inmunocomprometida, en ancianos y niños (ANMAT, 2014; Universidad de Murcia, 2014).

☞ Escherichia coli: tiene como hábitat natural el tracto intestinal del hombre y animales de sangre caliente, por lo que es indicador de contaminación fecal. Además, da indicio de la posible presencia de patógenos entéricos (Universidad de Murcia, 2014).

☞ Coliformes totales: comprende todos aquellos microorganismos fermentadores de la lactosa con producción de ácido y gas a 31-37 °C. Pueden ser o no fecales. Niveles altos de estas bacterias indican contaminación y elaboración deficiente de los alimentos (Pascual Anderson & Calderon y Pascual, 2010; Universidad de Murcia, 2014).

☞ Coliformes fecales: incluyen un grupo de microorganismos seleccionados por incubación de los inóculos procedentes de un caldo de enriquecimiento de coliformes a temperaturas superiores a las normales (44-45 °C), dependiendo del método. En general, estos cultivos de enriquecimiento contienen un alto porcentaje de *E.coli*, por lo que son indicativos de una probable contaminación de origen fecal del alimento (Universidad de Murcia, 2014).

☞ Enterobacterias: son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos que fermentan la glucosa, reducen nitratos a nitritos, son citocromo oxidasa negativo y crecen en medios que contienen sales biliares. Dentro de este grupo se engloban *E.coli*, coliformes totales,

coliformes fecales y bacterias no fermentadoras de lactosa. Se prefiere determinar este grupo por las siguientes razones:

- Una prueba sólo para bacterias fermentadoras de lactosa puede llevar a resultados falsamente seguros en los casos donde predominan las lactosas negativas, como por ejemplo *Salmonella*.

- En los alimentos *Salmonella* puede ser más resistente que *E.coli* y otros coliformes frente a influencias desfavorables. La ausencia de estos últimos puede llevar a conclusiones de seguridad falsas (Pascual Anderson & Calderon y Pascual, 2010; Universidad de Murcia, 2014).

☞ Bacterias anaerobias sulfito reductoras: constituyen un grupo bacteriano asociado al género *Clostridium*. Se caracterizan por ser organismos Gram positivos, anaerobios y formadores de esporas. Se utilizan como indicadores de calidad higiénica del alimento (ANMAT, 2014).

1.7 Envase de alimentos

El envase de alimentos tiene funciones muy importantes que abarcan necesidades técnicas y de comercialización (figura 1). Sirve como contenedor para el alimento, permitiendo el transporte eficiente dentro de toda la cadena alimentaria y previniendo cualquier daño físico, lo protege contra la manipulación y mantiene su calidad y seguridad desde la producción hasta que llega al consumidor final. El envase debe proteger los alimentos de condiciones ambientales tales como oxígeno, humedad, luz, polvo, plagas, decoloración, cambios de textura, pérdida de nutrientes, etc. Además, tiene función de barrera contra la contaminación química y microbiana que podría conducir al deterioro de los productos. El envase, además, debe informar sobre el producto, sus ingredientes, preparación, uso, condiciones de almacenamiento y fecha de vencimiento, y también sobre los recursos y las opciones de reutilización y reciclado del mismo (Yildirim, 2011).

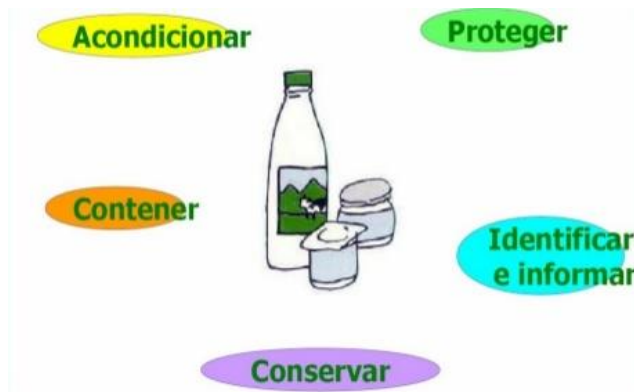


Figura 1. Funciones de un envase de alimentos

Adaptado de <https://es.slideshare.net/EsadeCreapolis/nuria-herranz-creapolis>

De acuerdo a su función los envases se clasifican en (figura 2):

- Primario: es el envase inmediato al producto, es decir, el que tiene contacto directo con éste.
- Secundario: es el contenedor unitario de uno o varios envases primarios.
- Terciario: sirve para distribuir, unificar y proteger el producto a lo largo de la cadena comercial (Ramírez Ortiz, 2015).



Figura 2. Clasificación envases de alimentos

Adaptado de <http://www.cenem.cl/detalle-tip.php?id=32>

1.7.1 Materiales utilizados en el envasado alimentario

Los materiales de envasado utilizados en la industria de alimentos pueden tener diversas formas y funciones. La elección del envase más adecuado depende del tipo de alimento que se va a envasar. También son importantes las propiedades físico-químicas, ópticas y de barrera del envase (Barros Velázquez, 2016).

Los principales materiales utilizados en el envasado alimentario son:

Vidrio. Es inerte y proporciona una barrera absoluta a los gases y a la humedad, por lo que es adecuado para la retención del sabor y la frescura de los productos alimenticios y bebidas como la cerveza y el vino. Puede resistir altas condiciones de procesamiento térmico, proporciona un buen aislamiento y se puede moldear en diferentes formas, ya sean transparentes u opacas. Dentro de sus desventajas se encuentra el gran peso del material y la fragilidad cuando se expone a presión interna, impacto y choque térmico (Singh y col., 2017).

Papel. El papel, el cartón y el cartón corrugado se producen a partir de la pulpa obtenida de la fibra vegetal. Se puede aplicar una capa de parafina o de polietileno (PE) para obtener propiedades de barrera contra el vapor de agua y los gases. Además, se pueden utilizar pigmentos minerales (arcilla de caolín, carbonato de calcio) en combinación o no con pigmentos sintéticos (a base de poliestireno (PS) para mejorar el brillo de los papeles recubiertos (Barros Velázquez, 2016). El papel se presenta en gran medida en el envasado de productos listos para consumo en forma de tiras de cartón informativas que rodean el recipiente o la tapa. También, se utilizan contenedores de cartón en forma de bandejas, platos y cajas (Walsh y Kerry, 2012).

Metales. Los metales comúnmente usados para el envasado de alimentos son estaño, acero, aluminio y cromo. También se utiliza la hojalata fabricada a partir del acero recubierto en ambos lados con una capa fina de estaño y lacada con epoxi fenólico, componentes de oleorresinas o resinas de vinilo para proporcionarle a los alimentos envasados una barrera inerte. Se usan para el envasado de frutas, verduras, carnes, pescados, legumbres, bebidas, etc. El aluminio es utilizado para fabricar láminas, películas laminadas de papel ó plástico, laminados, películas metalizadas y latas (Singh y col., 2017).

Plásticos. Se dividen en dos categorías: termoestables y termoplásticos. Los termoestables son polímeros que se solidifican de manera irreversible cuando se calientan y no se pueden remodelar; son empleados principalmente en aplicaciones automovilísticas y de construcción. Los termoplásticos son polímeros que se suavizan al exponerlos al calor y regresan a su estado original a temperatura ambiente. Estos son ideales para el envasado de alimentos ya que pueden moldearse en botellas, bandejas, películas de plástico y, además, son reciclables (Walsh y Kerry, 2012). Los plásticos ofrecen protección a los alimentos contra el deterioro y se integran fácilmente dentro del proceso de elaboración de los mismos, no son susceptibles a la fragmentación y se pueden obtener diferentes estructuras y diseños con costos accesibles. Otra de sus ventajas es la baja densidad, son inertes, tienen propiedad de barrera, buena resistencia mecánica, alta transparencia, capacidad de sellado térmico y facilidad para ser impresos. En cuanto a las desventajas, provocan agotamiento de

vertederos, contaminación ambiental y un alto consumo de energía en el proceso de fabricación. Además, la difusión de sustancias propias del polímero podría poner en peligro la salud de los consumidores (Martínez Tenorio y López Malo, 2011).

1.8 Films de plástico

Los films de plástico son membranas continuas que separan una zona de otra. Estas membranas pueden variar en su espesor y abarcan desde contenedores rígidos, hasta láminas, películas y recubrimientos finos (Yam, 2009).

Una característica importante de la mayoría de las películas es su termosellabilidad, que se refiere a la propiedad termoplástica que permite que sean moldeadas en envases, en virtud de su capacidad para realizar un sello hermético (Yam, 2009).

Otras características importantes que poseen los films de plástico:

- Se adaptan fácilmente a las formas del producto.
- Un alimento envuelto con film tiene más brillo y transparencia.
- El envasado con film aumenta la duración del producto en anaquel y ofrece protección ambiental.
- Favorecen el envasado y la venta de varios productos como una sola unidad.
- No son reciclables, ni biodegradables.
- Pueden inmovilizar uno o más productos en su lugar, brindando protección contra el movimiento que ocasionan golpes o daños al producto.
- Los films son económicos en comparación con otros productos de envasado.
- No deben ser calentados por encima de su temperatura máxima porque se produce termo-degeneración, lo que altera sus características.
- A temperaturas muy bajas las películas empiezan a quebrantarse y a temperaturas excesivamente altas se reblandecen.
- Muestran baja permeabilidad a los rayos ultravioleta por lo que puede reducirse considerablemente su brillo e impresión (Proaño, 2002).

Las películas de plástico tienen una amplia aceptación para el uso en la conservación de alimentos, tanto en supermercados como en la cocina doméstica. Estos materiales tienen buenas propiedades de estiramiento y adhesión por lo que son adecuados para el envoltorio manual de productos frescos (Leadbitter, 2003).

Se utilizan para rodear completamente un alimento, asegurando al producto de la entrada de gases, vapores, humedad y efectos biológicos del ambiente exterior, a la vez que

proporcionan un aspecto agradable y decorativo. El vapor de agua y los gases atmosféricos pueden alterar el sabor, el color y el contenido nutricional del producto envasado (McKeen, 2017).

Es muy común que el envasado de presas de aves de corral refrigeradas se realice con films de PVC flexible. La dureza y resistencia de la película de PVC, además de su buena estabilidad térmica en un ambiente húmedo, lo convierten en un material de elección en esta aplicación. Su capacidad de imprimirse fácilmente con disolvente y las tintas a base de agua, sin necesidad de ningún tratamiento superficial especial, han favorecido de manera prominente el envasado de carnes rojas y aves de corral para la identificación de marca y comercialización (Yam, 2009). Además, tales películas tienen una alta transmisión de oxígeno y vapor de agua, manteniendo la carne roja durante períodos más largos en las góndolas de los supermercados (Leadbitter, 2003).

Se utilizan también en cocinas institucionales, cafeterías, restaurantes y catering para envolver bandejas con alimentos, cristalería y utensilios. Las películas tienen una excelente adherencia, claridad, estiramiento y dispensabilidad (Yam, 2009).

1.9 Normativa. Comidas preparadas

Según el artículo 156 tris del (CAA), se entiende por comida preparada lista para consumo, la elaboración culinaria resultado de la preparación con o sin cocción de uno o varios productos alimenticios de origen animal o vegetal, con o sin adición de otras sustancias autorizadas para el consumo. Podrá presentarse envasada o ser fraccionada a la vista o no del consumidor en el momento de ser dispensada, y estar dispuesta para el consumo directamente, o bien tras su calentamiento (CAA, 2017).

De acuerdo a la forma de preparación, las comidas preparadas listas para el consumo se clasifican en:

- I. Comidas preparadas sin tratamiento térmico.
- II. Comidas preparadas con tratamiento térmico que incluyan posteriormente ingredientes no sometidos a tratamiento térmico.
- III. Comidas preparadas con tratamiento térmico que reciban un proceso de manipulación post tratamiento térmico tal como cortado, mezclado, feteado, envasado, entre otros.
- IV. Comidas preparadas que al final de su elaboración hayan sido sometidas en su conjunto a un proceso térmico.

En las siguientes tablas se presentan las especificaciones microbiológicas para las comidas preparadas según ítems I, II, III y IV.

Tabla 1: Especificaciones microbiológicas para comidas preparadas según ítems I, II y III

Parámetro	Criterio de aceptación	Metodología ⁽¹⁾
Recuento de <i>enterobacterias</i> ⁽²⁾ UFC/g	n=5, c=2, m=10 ³ , M=10 ⁴	ISO 21528-2:2004 ICMSF
Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g)	n=5, c=0, m<3	ISO 16649-3:2005 ICMSF (método1) BAM-FDA:2002 (método1)
Recuento de <i>Estafilococos coagulasa</i> positiva (NMP/g)	n=5, c=1, m=10, M=10 ²	ISO 6888-3:1999 ICMSF
<i>Salmonella</i> spp.	n=5, c=0, Ausencia en 25 g	ISO 6579:2002, Co 2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS: 2011
<i>Listeria monocytogenes</i>	n=5, c=0, Ausencia en 25 g	ISO: 11290-1:1996 Amd:2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS:2009
Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> ⁽³⁾ (UFC/g)	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	ISO 7937:2004
Recuento de presuntos <i>Bacillus cereus</i> ⁽⁴⁾ (UFC/g)	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	ISO 7932:2004
<i>E.coli</i> O157:H7/NM ⁽⁵⁾	n=5, c=0, Ausencia en 65 g	USDA-FSIS:2010 ISO 16654:2001 BAM-FDA:2011
<i>E. coli</i> no O157 ⁽⁵⁾⁽⁶⁾	n=5, c=0, Ausencia en 65 g	ISO 13136:2012 BAM-FDA:2014

(1) O su versión más actualizada

(2) En caso de llevar como ingredientes vegetales crudos no realizar este parámetro.

(3) Incluir solo en alimentos con carnes.

(4) Incluir sólo en alimentos con cereales, papas.

(5) En alimentos a base de carne picada y/o vegetales crudos.

(6) *E. coli* productor de toxina Shiga de los serogrupos: O145, O121, O26, O111 y O103. Se tendrán en cuenta sólo los aislamientos positivos para los genes *stx* y *eae*, de los serogrupos mencionados

n: número de muestras que se toman y se analizan

c: máximo número de muestras con un resultado adverso

m: límite microbiológico mínimo

M: límite microbiológico máximo

Tabla 2: Especificaciones microbiológicas para comidas preparadas según ítem IV

Parámetro	Criterio de aceptación	Metodología ⁽¹⁾
Recuento de <i>aerobios mesófilos</i> (UFC/g)	n=5, c=2, m=10 ⁴ , M=10 ⁵	ISO 4833:2003 BAM-FDA:2001
Recuento de <i>enterobacterias</i> (UFC/g)	n=5, c=2, m=10 ² , M=5 x10 ²	ISO 21528-2:2004 ICMSF
Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g)	n=5, c=0, m<3	ISO 16649-3:2005 ICMSF (método 1) BAM-FDA:2002(método 1)
Recuento de <i>Estafilococos coagulasa</i> positiva NMP/g)	n=5, c=1, m=10, M=10 ²	ISO 6888-1:1999

<i>Salmonella</i> spp.	n=5, c=0, Ausencia en 25 g	ISO 6579:2002, Co:2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS:2011
<i>Listeria monocytogenes</i>	n=5, c=0, Ausencia en 25 g	ISO: 11290-1:1996, Amd:2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS:2009
Recuento de presuntos <i>Bacillus cereus</i> ⁽²⁾ (UFC/g)	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	ISO 7932:2004
Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> ⁽³⁾ (UFC/g)	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	ISO 7937:2004
<i>E.coli</i> O157:H7/NM ⁽⁴⁾	n=5, c=0, Ausencia en 65 g	USDA-FSIS:2010 ISO 16654:2001 BAM-FDA:2011
<i>E. coli</i> no O157 ⁽⁵⁾⁽⁶⁾	n=5, c=0, Ausencia en 65 g	ISO 13136:2012 BAM-FDA:2014

(1) O su versión más actualizada

(2) Incluir sólo en alimentos con cereales, papas

(3) Incluir sólo en alimentos con carnes

(4) Incluir sólo en alimentos preparados a base de carne picada, tales como albóndigas, empanadas, pasteles, arrollados o similares

(5) En alimentos a base de carne picada y/o vegetales crudos

(6) *E. coli* productor de toxina Shiga de los serogrupos: O145, O121, O26, O111 y O103. Se tendrán en cuenta sólo los aislamientos positivos para los genes *stx* y *eae*, de los serogrupos mencionados

n: número de muestras que se toman y se analizan

c: máximo número de muestras con un resultado adverso

m: límite microbiológico mínimo

M: límite microbiológico máximo

Cuando el número total de unidades del lote fuera igual o inferior a 100 unidades, se procederá a la toma de una muestra indicativa (n=1), aplicándose el plan de 2 clases. El resultado positivo de la muestra indicativa es interpretado para todo el lote o partida (CAA, 2017).

En situaciones de riesgo epidemiológico que justifiquen un alerta sanitario, podrán ser realizadas otras determinaciones microbiológicas, en función del problema (CAA, 2017).

La evaluación microbiológica de comidas preparadas llevada a cabo en este estudio, se realizó en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto (figura 3). El mismo está ubicado en el campus universitario sobre la Ruta Nacional 36, km 601. Contiene una cobertura edilicia de 1.537 m² de los cuales 234 m² corresponden al sitio de elaboración de alimentos. Además, posee un salón de recepción de 1.303 m² que pueden ocupar 400 comensales.

Para organizar la demanda existente de comensales, la administración del comedor coordinó el expendio de 900 menús diarios en 4 turnos de 30 min cada uno que comienzan a las 12 h y finalizan a las 14 h. Además, se elaboran aproximadamente 100 menús alternativos.

El menú diario consiste en sopa, plato principal que varía durante la semana, pan y fruta, mientras que el menú alternativo incluye un plato principal que es distinto al del menú diario, ya que posee materias primas de mayor costo, pan y fruta.

Desarrollan sus actividades 32 personas que realizan tareas de limpieza, elaboración de menús, administración y atención al público, supervisados por una Licenciada en Nutrición y un responsable administrativo. Solo 10 operadores son los encargados de elaborar el menú.

El comedor no llega a satisfacer la demanda actual con los productos elaborados por ellos mismos ya que por día circulan aproximadamente 2.000 personas en su interior, esto se debe a la falta de personal, sustento económico e infraestructura. Esta problemática llevó a la necesidad de incorporar empresas elaboradoras de alimentos de la ciudad de Río Cuarto y zona para que provean al sector de minutas con diversos productos alimenticios: panificación (facturas, rasquetas, etc.), sándwichs, ensaladas, pizzetas, pastas, tartas, empanadas, ensaladas de frutas, postres y otras comidas preparadas listas para consumo.

Debido a que el establecimiento no cuenta con habilitación ni supervisión municipal por encontrarse en jurisdicción nacional, los controles microbiológicos realizados a los productos finales elaborados por el comedor, alimentos listos para consumir elaborados por terceros, ambiente y operarios están a cargo, desde hace aproximadamente 16 años, del Departamento de Microbiología e Inmunología, área de Microbiología de Alimentos. Con los datos que surgen a partir de los análisis realizados se elaboran informes que aportan resultados útiles, no sólo para el área demandante sino también para el grupo prestador de servicios, ya que estas empresas no solo comercializan sus productos en el comedor universitario, sino en toda la ciudad de Río Cuarto y municipios aledaños, siendo en numerosas oportunidades los únicos controles a los que se someten.

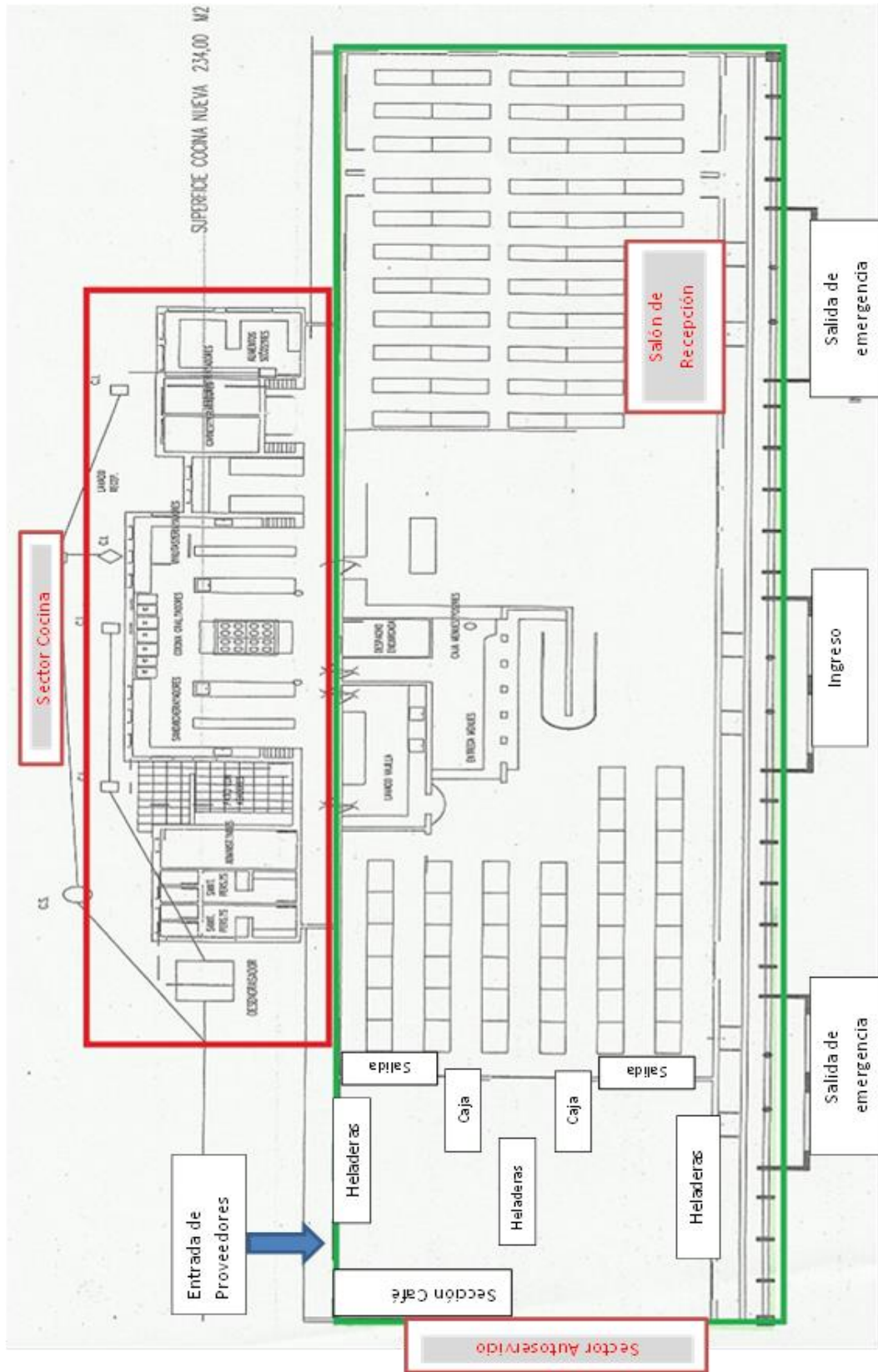


Figura 3: Plano actual del comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto

2. HIPÓTESIS

El deterioro de los alimentos se reduce con la utilización de film de PVC.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Realizar estudios microbiológicos para determinar la calidad higiénico-sanitaria y el deterioro de productos alimenticios comercializados por el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto (U.N.R.C).

3.2 Objetivos específicos

- 1) Análisis microbiológico de comidas elaboradas por el comedor de la U.N.R.C (menú tradicional y productos de self-service).
- 2) Análisis microbiológico de comidas elaboradas por empresas que expenden sus productos en el comedor de la U.N.R.C.
- 3) Análisis microbiológico de comidas elaboradas por empresas externas con y sin envase de PVC.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Toma de muestras

Se tomaron y analizaron 33 muestras de alimentos que se comercializan en el ámbito del comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto durante el periodo comprendido entre los meses de septiembre del 2016 a marzo del 2018. Del total, 21 correspondieron a productos elaborados por el comedor universitario y 12 muestras provenientes de empresas proveedoras, que fueron tomadas de las heladeras del sector minutos del comedor universitario disponibles para la venta por el sistema de autoservicio. El muestreo fue realizado al azar.

En todos los casos, las muestras fueron llevadas al laboratorio inmediatamente para su análisis.

El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Productos elaborados por el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto:

Se tomaron un total de 21 productos alimenticios elaborados por el comedor universitario, de los cuales 5 correspondieron al menú tradicional (tabla 3) y 16 al sector self-service (tabla 4).

La calidad microbiológica de las muestras de menú tradicional analizadas fue establecida verificando el cumplimiento de las normas microbiológicas constituidas en el artículo 156 tris del Código Alimentario Argentino (CAA), vigente en el ámbito de la República Argentina.

Con respecto a las muestras pertenecientes al sector self-service (16), se realizaron muestreos de verduras crudas y de verduras cocidas por duplicado, tomando 4 muestras en cada caso, las cuales fueron llevadas inmediatamente al laboratorio. En cada muestreo, se analizó la muestra control o de tiempo 0 (T0) de forma inmediata, mientras que las 3 muestras restantes fueron envueltas con film de PVC y conservadas a temperatura de refrigeración de 7 °C. Luego de 24 h de conservación en la heladera, se analizó la muestra correspondiente al tiempo 1 (T1); a las 48 h de refrigeración se analizó la muestra correspondiente al tiempo 2 (T2) y, cumplidas las 72 h de conservación, se analizó la última muestra afectada al tiempo 3 (T3).

Tabla 3: Alimentos elaborados por el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Menú tradicional

Tipo de menú	Muestras
Tradicional	Milanesa de carne con puré de papas
	Milanesa de ternera con arroz
	Pastel de carne
	Hamburguesa de carne vacuna con arroz y queso
	Pollo con ensalada de zanahoria, lechuga y cebolla

Tabla 4: Verduras elaboradas por el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Sector Self-service

Sector Self-service	Muestras
Verduras crudas	Ensalada de zanahoria, repollo y tomate
Verduras cocidas	Ensalada de lentejas, remolacha y garbanzos

- Productos elaborados por empresas de la ciudad de Río Cuarto:

Se tomaron y analizaron un total de 12 muestras de alimentos elaborados por 6 empresas de la ciudad de Río Cuarto (tablas 5 y 6).

En primera instancia, se realizó el análisis microbiológico de 6 productos alimenticios elaborados por 6 empresas de la ciudad de Río Cuarto. Su calidad microbiológica fue establecida verificando el cumplimiento de las normas microbiológicas constituidas en el artículo 156 tris del CAA.

En segunda instancia, se tomaron 6 muestras de un alimento elaborado por la empresa 1. Dos de éstas fueron procesadas para su análisis microbiológico de forma inmediata al llegar al laboratorio (muestras control correspondientes al tiempo 0 (T0). Las 4 muestras restantes se dividieron en 2 grupos de 2 muestras: uno con envoltura de film de PVC y el otro sin envoltura de papel film. Estas 4 muestras fueron conservadas a temperatura de refrigeración de 7 °C durante 7 días tiempo 1 (T1) y durante 11 días tiempo 2 (T2).

Tabla 5: Alimentos elaborados por distintas empresas de la ciudad de Río Cuarto

Empresas	Muestras
Empresa 1	Sándwich de miga de jamón cocido y verduras
Empresa 2	Mayonesa de ave (pollo, zanahoria, arvejas y queso)
Empresa 3	Bombas de carne con arroz integral
Empresa 4	Pizzeta de jamón, queso y aceitunas
Empresa 5	Pebete de jamón cocido y queso
Empresa 6	Costeleta de ternera con arroz, arvejas y zanahoria

Tabla 6: Alimentos elaborados por empresas de la ciudad de Río Cuarto con y sin envase

Empresa	Muestra
Empresa 1	Sándwiches de jamón y queso

4.2 Análisis microbiológico

El análisis microbiológico de las muestras se llevó a cabo siguiendo la metodología analítica de las normas ISO, APHA e ICMSF.

4.2.1 Preparación del homogenato o suspensión inicial y las diluciones sucesivas de las muestras. Metodología analítica: ICMSF:2000

El homogenato (dilución decimal 10^{-1}) se obtuvo mezclando 50 g \pm 0,1 representativo de la muestra a analizar con 450 ml del diluyente agua de peptona al 0,1% contenidos en un recipiente adecuado para su homogenización. Se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente y a partir de esta dilución se pipeteó un volumen de 10 ml y se colocó en un recipiente con 90 ml de diluyente para obtener así la dilución 10^{-2} . A partir de esta se tomó con pipeta 1 ml y se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua de peptona para obtener así la dilución 10^{-3} . En los casos donde se utilizaron más diluciones se repitió el paso anterior las veces necesarias.

4.2.2 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales. Metodología analítica: ISO 4833-2:2003

Se tomó 0,1 ml de las diluciones que fueron necesarias, se depositó en la superficie de Agar para Recuento (PCA) en cada placa de Petri (siembra de las diluciones por duplicado) y se extendió el inóculo utilizando una espátula de Drigalsky. Las placas de Petri se incubaron

a 30 ± 1 °C durante 72 ± 3 h y posteriormente se realizó el recuento expresando el resultado como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de muestra.

4.2.3 Recuento de enterobacterias totales. Metodología analítica: ISO 21528-2:2004

Se realizó recuento en placa en profundidad con agar Violeta-Rojo neutro- Bilis- Glucosa (VRBG) fundido y templado a 45 ± 1 °C. Se tomó 1 ml de las diluciones que fueron necesarias, se depositó en placas de Petri vacías (siembra de las diluciones por duplicado), se adicionaron 15 ml del medio de cultivo, se homogeneizó con los movimientos correspondientes y se dejó solidificar. Luego se añadió a cada placa aproximadamente 10 ml del mismo medio de cultivo como capa virgen. Las placas de Petri se incubaron a 37 °C durante 24 ± 2 h y se realizó el recuento expresando el resultado como UFC/g de muestra. Para confirmar que las colonias (figura 4) pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*, se realizaron las pruebas bioquímicas de Oxidasa y Fermentación de glucosa.



Figura 4. Colonias características de enterobacterias en medio Agar Violeta Rojo Neutro Bilis Glucosa (VRBG): violetas (fermetación de la glucosa) con halo fúcsia (precipitación de sales biliares)

4.2.4 Recuento de coliformes totales y *Escherichia coli*. Metodología analítica ICMSF:2000. Adaptación Método 2: Europeo

Se realizó por la técnica de Número Más Probable (NMP) o Fermentación en Múltiples Tubos Clásico, utilizando caldo Mac Conkey como medio de enriquecimiento en tubos con campana Durham, sembrando la correspondiente dilución decimal del alimento. Estos fueron incubados a 35-37 °C durante 24-48 h y se consideraron tubos positivos (coliformes totales) aquellos en donde se observó turbidez, viraje del indicador (acidez generada por la fermentación de la lactosa) y producción de gas. Se calculó el NMP de coliformes totales por gramo de muestra utilizando la tabla de NMP. A partir de los tubos positivos se procedió a

efectuar el aislamiento en placas de Petri con agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) y la posterior identificación de colonias características (negras/rojas (fermentación de la lactosa) con o sin brillo metálico) a través de las pruebas de Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer, Citrato (I.M.Vi.C.). El NMP de *E. coli* por g de alimento se determinó en función de los tubos de caldo Mac Conkey cuyas cepas presentes dieron positivas las pruebas bioquímicas correspondientes para esta bacteria.

4.2.5 Recuento de *Staphylococcus aureus*. Metodología analítica: ISO 6888-3:2003. Corrección 2004

Se realizó mediante la técnica del NMP modificado utilizando caldo Giolitti Cantoni como medio de enriquecimiento en tubos, sembrando las correspondientes diluciones decimales del alimento. Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 24-48 ± 2 h y se consideraron positivos aquellos donde se evidenció ennegrecimiento del medio de cultivo (reducción del telurito de potasio). A partir de éstos se procedió a realizar el aislamiento en placas de Petri con agar Baird-Parker y la posterior confirmación de las colonias típicas (negras, brillantes, rodeadas de una zona translúcida que presentan un anillo opalescente (figura 5)) y/o atípicas (colonias negras menos oscuras, sin zona clara y/o borde blanco) a partir de la prueba de la coagulasa (figura 6). Se calculó el NMP/g de la muestra basado en el número de tubos de cada dilución en los cuales se confirma la presencia de *Staphylococcus aureus*.



Figura 5. Colonia característica de *Staphylococcus aureus* en agar Baird-Parker: negra (reducción telurito de potasio), brillante, con borde blanco (actividad lecitinasas), rodeada de una zona clara (actividad lipasa).



Figura 6. Prueba bioquímica confirmatoria de *Staphylococcus aureus*: coagulasa (producción de coágulo).

4.2.6 Determinación de *Salmonella* spp. Metodología analítica: ISO 6579:2002

Se realizó la determinación de la presencia de *Salmonella* spp. en 25 g de muestra. El aislamiento y la identificación del microorganismo se realizaron en cinco pasos:

- Enriquecimiento no selectivo: se colocó 25 g de la muestra en 225 ml de Agua de Peptona Bufferada (APB). Se incubó a 34-38 °C durante 16-20 h.
- Enriquecimiento selectivo: se transfirió 1 ml del cultivo de enriquecimiento no selectivo en un tubo con 10 ml de caldo Tetrionato y se incubó a 37 ± 1 °C, durante 24 ± 3 h. En otro tubo con 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis se traspasó 0,1 ml de APB y se incubó a $41,5 \pm 1$ °C durante 24 ± 3 h.
- Siembra en placas de agar selectivo y diferencial: a partir de los cultivos de enriquecimiento selectivo se sembró en estrías por agotamiento para obtener colonias aisladas en los medios:
 - ☞ Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato: colonias del mismo color que el medio de cultivo, transparentes. A veces con centro negro (precipitación sulfuro de hierro).
 - ☞ Agar Bismuto-Sulfito: colonias pardas, grises, tendiendo a negro (precipitación sulfuro de hierro) con brillo metálico (reducción de iones bismuto a bismuto

metálico). El medio que las rodea es, por lo general, oscuro al principio volviéndose negro a medida que aumenta el periodo de incubación.

Las placas fueron incubadas a 37 ± 1 °C por 24-48 h. A partir de colonias típicas se realizaron las pruebas bioquímicas y serológicas correspondientes.

- Identificación por pruebas bioquímicas: a partir de cultivos puros se realizaron las pruebas de I.M.Vi.C., Triple Sugar Iron (TSI), Fenilalanina, Urea y Descarboxilación de Lisina.
- Estudio de características serológicas: se realizó con las cepas que dieron pruebas bioquímicas típicas. El análisis antigénico se realizó por aglutinación somática empleando antisueros polivalentes OS-A y OS-B.

4.2.7 Recuento de *Clostridium perfringens*. Metodología analítica: Adaptación APHA:1992

Se tomó 1 ml de las diluciones correspondientes (por duplicado), se depositó en tubos conteniendo agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina fundido a 45-50 °C, se homogeneizó el inóculo mediante agitación, se dejó solidificar y se añadió una capa de Vas-Par a cada tubo. Se incubaron los tubos a 35 °C por 24-48 h. Se realizó el recuento presuntivo de las colonias negras (reducción sulfito). Para confirmar estas colonias se tomaron 5 y se repicaron en tubos con caldo tetrionato o caldo Carne Cocida, se incubaron a 35 °C durante 18 a 24 h. Se realizó la coloración de Gram a partir de cada uno de estos. La presencia de microorganismos con la morfología correspondiente se confirmó por medio de pruebas metabólicas: hidrólisis de lecitina, coagulación de leche cisteinada, hidrólisis de gelatina, nitrato-movilidad, fermentación de azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa, rafinosa), producción de SH₂, α-hemólisis. Se expresó el resultado como UFC/g de muestra.

4.2.8 Recuento de *Bacillus cereus*. Metodología analítica: ISO 7932:2004

Se realizó recuento en placa en superficie en agar Manitol-Yema de Huevo-Polimixina (MYP). Se tomó 0,1 ml de las correspondientes diluciones, se depositó en la superficie del agar en cada placa de Petri (siembra por duplicado) y se extendió el inóculo utilizando una espátula de Drigalsky. Las placas de Petri se incubaron a 30 °C durante 18-48 h, se realizó el recuento de colonias características (grandes, de color rosado rodeadas de un halo denso de precipitación (actividad lecitinasa) sobre un fondo rojo violáceo) y se procedió a la confirmación de estas colonias mediante la prueba de β-hemólisis en agar Sangre de Carnero. El resultado se expresó como UFC/g de muestra.

4.2.9 Recuento de hongos y levaduras. Metodología analítica: Adaptación ISO 6611:2004-IDF 094

Se realizó recuento en placa en superficie en agar Extracto de levadura-Glucosa-Cloranfenicol (YGC). Se tomó 0,1 ml de las diluciones correspondientes, se depositó en la superficie del agar en cada placa de Petri (siembra de las diluciones por duplicado) y se extendió el inóculo utilizando una espátula de Drigalsky. Las placas de Petri se incubaron a 25 °C durante 5 días y posteriormente se realizó el recuento de las colonias (figura 7) expresando el resultado como UFC/g de muestra.



Figura 7. Levaduras blancas y pigmentadas en agar Extracto de levadura-Glucosa-Cloranfenicol (YGC).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se realizaron análisis microbiológicos de alimentos listos para el consumo elaborados en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto (U.N.R.C.) y por empresas de la ciudad de Río Cuarto que comercializan sus productos dentro del comedor universitario. Además, se realizaron análisis de comidas listas para consumo elaboradas por empresas con y sin film de PVC como envase alimentario.

Los productos terminados listos para el consumo pueden contener una carga microbiana considerable debido a diferentes factores, como la calidad microbiológica de la materia prima e ingredientes utilizados, las condiciones higiénicas en las que se elaboran y manipulan los alimentos, las máquinas e instalaciones y el medio ambiente.

5.1 Análisis microbiológico de productos terminados listos para el consumo elaborados por el comedor de la U.N.R.C.

5.1.1 Alimentos listos para el consumo elaborados por el comedor de la U.N.R.C. Menú tradicional.

Se analizaron 5 muestras de alimentos elaborados por el comedor universitario (menú tradicional). Los resultados obtenidos del análisis microbiológico se observan en la tabla 7.

Tabla 7: Alimentos elaborados por el comedor de la U.N.R.C. Menú tradicional

Muestra	<i>Enterobacterias</i> UFC/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>S. aureus</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> spp.	<i>C. perfringens</i> UFC/g	<i>B. cereus</i> UFC/g
Milanesa de carne con puré de papas	< 10	< 0,3	< 3	A	N/D	< 1 x 10 ²
Milanesa de ternera con arroz	< 10	< 0,3	< 3	A	< 10	< 1 x 10 ²
Pastel de carne	< 10	< 0,3	< 3	A	< 10	< 1 x 10 ²
Hamburguesa con arroz y queso	< 10	< 0,3	< 3	A	< 10	< 1 x 10 ²
Pollo con ensalada de zanahoria, lechuga y cebolla	N/D	1,1	7	A	< 10	N/D

Referencias: N/D=No Determinado; UFC=Unidades Formadoras de Colonias; A=Ausencia; NMP=Número Más Probable

Límites máximos: *Enterobacterias:* M=10⁴; *E.coli:* m<3; *S.aureus:* M=10²; *C.perfringens:* M=10³; *B.cereus:* M=10³

El 100% de las muestras analizadas elaboradas por el comedor universitario fueron aptas para el consumo humano según la normativa vigente.

5.1.2 Verduras listas para consumo elaboradas por el comedor de la U.N.R.C. (producto de self-service)

Se realizó el análisis microbiológico de 16 muestras del sector self-service del comedor universitario (muestreo por duplicado), de las cuales 8 correspondieron a verduras crudas y 8 a verduras cocidas. Del total de muestras, 4 se utilizaron como control (T0) analizadas el mismo día que llegaron al laboratorio y las 12 restantes se envolvieron con film de PVC almacenadas a temperaturas de refrigeración y analizadas en distintos periodos de tiempo.

El promedio de los resultados obtenidos en el primer y el segundo muestreo realizados para verduras crudas se muestra en la tabla 8.

Tabla 8: Análisis microbiológico de verduras crudas elaboradas por el comedor de la U.N.R.C. Sector Self-Service

Tiempo	RAT UFC/g	CT NMP/g	<i>E.coli</i> NMP/g	<i>S.aureus</i> NMP/g	HyL UFC/g
T0	$1,8 \times 10^5$	6×10^2	1,5	$4,8 \times 10$	$5,5 \times 10^3$
T1	$2,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^4$	< 0,3	2	$1,3 \times 10^5$
T2	$1,5 \times 10^8$	5×10^5	< 0,3	$2,3 \times 10$	$1,1 \times 10^7$
T3	1×10^9	5×10^7	2×10^3	$4,5 \times 10$	$2,5 \times 10^8$

Referencias: UFC= Unidades Formadoras de Colonias; RAT= Recuento de microorganismos Aerobios mesófilos viables Totales; CT= Coliformes Totales; HyL= Hongos y Levaduras; NMP= Número Más Probable

En el T0 se observaron recuentos elevados de aerobios totales, coliformes totales y de hongos y levaduras, los cuales fueron aumentando en aproximadamente 2 unidades logarítmicas a medida que transcurría el tiempo de almacenamiento. En cuanto a *S. aureus* se destaca una disminución del recuento en el T1 y T2 con respecto al observado en el T0, mientras que el T3 mostró un número elevado de este microorganismo. Asimismo, se observó un bajo recuento de *E. coli* en los tres primeros tiempos, mientras que en el T3, el recuento fue elevado (figura 8).

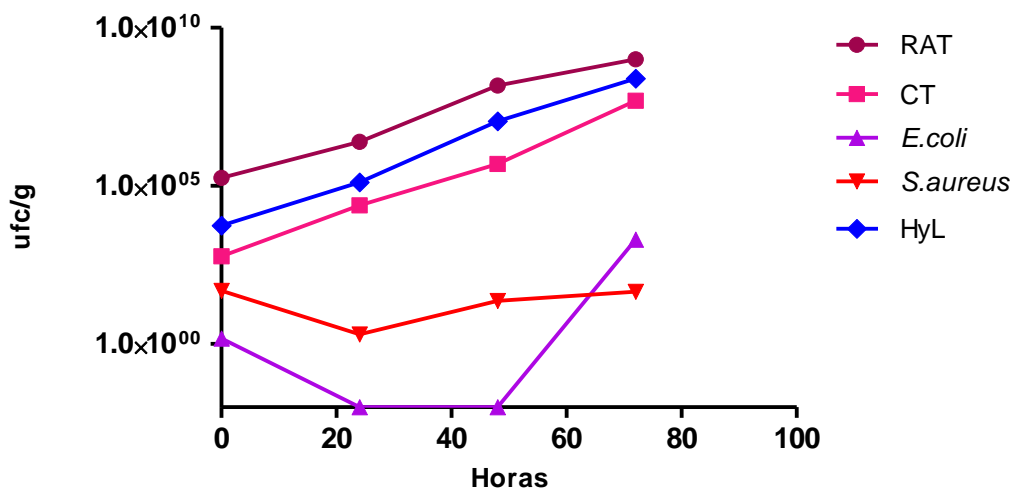


Figura 8. Desarrollo microbiano a través del tiempo en verduras crudas envasadas con film de PVC y almacenadas en refrigeración

El promedio de los resultados obtenidos a partir del análisis microbiológico de verduras cocidas se muestra en la tabla 9.

Tabla 9: Análisis microbiológicos de verduras cocidas elaborados por el comedor de la U.N.R.C. Servicio Self-Service

Tiempo	RAT UFC/g	CT NMP/g	E.coli NMP/g	S.aureus NMP/g	HyL UFC/g
T0	3×10^6	6×10^2	< 0,3	$1,2 \times 10^2$	$3,5 \times 10^4$
T1	2×10^8	6×10^5	$3,5 \times 10^3$	$5,5 \times 10^2$	1×10^5
T2	9×10^8	$5,9 \times 10^7$	$1,5 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	1×10^6
T3	4×10^9	$1,2 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$	$5,5 \times 10^3$	$4,5 \times 10^6$

Referencias: UFC= Unidades Formadoras de Colonias; RAT= Recuento de microorganismos Aerobios mesófilos viables Totales; CT= Coliformes Totales; HyL= Hongos y Levaduras; NMP= Número Más Probable

En el tiempo inicial se observan altos valores de HyL y RAT, mientras que en el T1 se muestra un aumento en los recuentos de hongos y levaduras, aerobios y coliformes totales

de 1, 2 y 3 unidades logarítmicas, respectivamente. Para los tiempos 2 y 3, se registraron aumentos de los tres recuentos entre 1 y 2 logaritmos.

Con respecto a *E.coli*, en el T0 no se observó desarrollo de este microorganismo, pero en los tiempos restantes mostró un alto recuento. Además, se observa un elevado recuento de *S.aureus* desde el tiempo inicial, el cual aumentó en 1 logatirmo a lo largo del almacenamiento (figura 9).

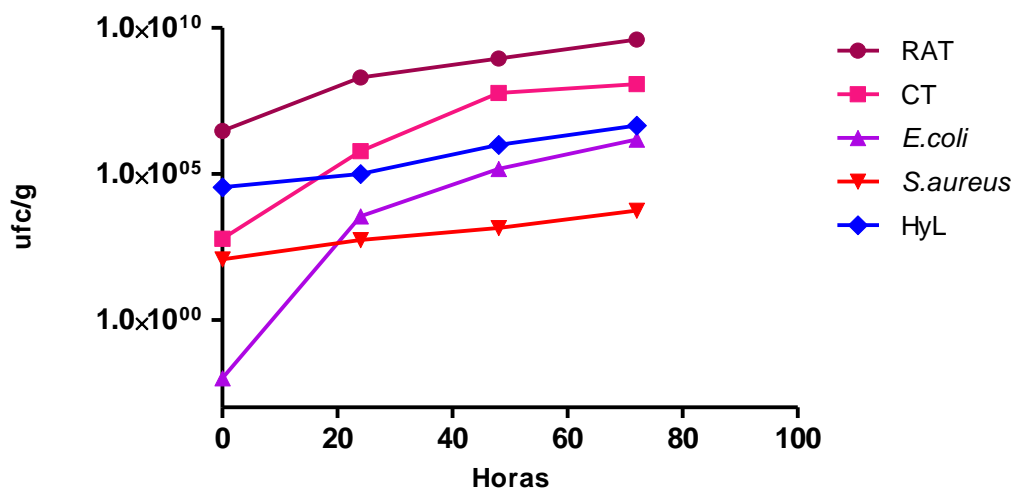


Figura 9. Desarrollo microbiano a través del tiempo en verduras cocidas envasadas con film de PVC y almacenadas en refrigeración

Un recuento elevado de aerobios totales podría indicar materia prima contaminada, deficiente manipulación durante la elaboración de los productos, presencia de patógenos, ya que la mayoría de éstos son mesófilos y, como consecuencia, alteración del producto (Pascual Anderson y Calderon y Pascual, 2010).

En el caso de hongos y levaduras, los recuentos altos se asocian a prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los alimentos, así como el uso de materia prima contaminada. También, son indicadores de la vida útil y la calidad del producto terminado, ya que dichas cualidades disminuyen notablemente por su presencia (Borbolla Sala y col., 2004; Galán Durán, 2012).

En cuanto a coliformes totales, niveles altos de estos microorganismos indican contaminación y/o elaboración deficiente de los alimentos (Pascual Anderson y Calderon y Pascual, 2010).

La presencia de *E.coli* en un alimento está influenciada por distintos factores como deficiencia en la higiene de las superficies que están en contacto con el mismo, del equipo o

del manipulador de alimentos, en cualquier etapa del proceso productivo (Alonso y Poveda, 2008). Además, implica un cierto riesgo de que pudiera estar presente un microorganismo patógeno. Al ser un huésped constante del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, se considera que es un indicador de contaminación directa o indirecta de origen fecal. Su supervivencia fuera del intestino es corta, por lo que su presencia en los alimentos indica contaminación fecal reciente. Recuentos elevados de este microorganismo en un alimento sugieren una falta general de limpieza en su manejo o un almacenamiento inadecuado (Acuña Peralta y col., 2014).

Un recuento elevado de *S.aureus* indicaría un manejo inadecuado del alimento, malas prácticas de limpieza, desinfección y control de temperatura por parte del manipulador y/o una posible contaminación cruzada. Esta bacteria se multiplica rápidamente a temperatura ambiente. Sus principales fuentes de transmisión son las vías respiratorias (boca, nariz), piel, entre otros. El material y equipos sucios y las materias primas de origen animal también pueden ser fuente de la contaminación. Su presencia o la de sus toxinas es signo evidente de falta de higiene (Campos Díaz y col., 2003; Rivera Mejía y Sagastizado Mendez, 2014).

En los últimos años se ha producido en Argentina un marcado desarrollo de la comercialización de hortalizas mínimamente procesadas, siendo esta tendencia similar a la observada a nivel mundial debido al incremento en su consumo por la facilidad de uso (Rodríguez y col., 2002). Los vegetales frescos cortados son altamente perecederos aún en refrigeración y su vida útil depende básicamente del control de la fisiología del tejido vegetal y de la actividad metabólica de los microorganismos presentes (Manzo y col., 2015). Los principales factores que influyen directamente en la calidad de estos vegetales son las prácticas de cultivo, el estado de madurez al momento de la recolección, la manipulación post-cosecha (reducción de la carga microbiana inicial por lavado y remoción de tejido dañado) y el acondicionamiento de la materia prima, así como las condiciones de almacenamiento (Torales y col., 2010).

La adherencia, la mayor supervivencia y el crecimiento de los patógenos se favorecen cuando se cortan o trituran las verduras durante un procesamiento mínimo el cual, además de proporcionar sitios para la unión de microorganismos, causa la liberación de exudados de las verduras que nutren las bacterias adheridas, las cuales pueden crecer y alcanzar altas poblaciones (Sant'Ana y col., 2012).

El crecimiento de un microorganismo específico durante el almacenamiento de un alimento depende de varios factores, siendo los más importantes: la carga microbiana inicial al comienzo del almacenamiento; las propiedades físico-químicas del alimento, como

contenido de humedad, pH, presencia de conservantes; el método de procesamiento utilizado en la producción del alimento; y el entorno externo de los alimentos, como composición del gas circundante y temperatura de almacenamiento (Kilcast y Subramaniam, 2000).

Las principales causas de disminución de vida útil de los alimentos son la pérdida de calidad sensorial causada por microorganismos y el crecimiento de patógenos a niveles detectables. En Estados Unidos, se ha reportado que la refrigeración de alimentos a temperaturas superiores a las recomendadas es la principal causa de origen de casos de enfermedades transmitidas por alimentos, debido a que favorece el crecimiento de bacterias patógenas alcanzando niveles que causan enfermedades. Es importante definir que la velocidad a la que transcurren las reacciones bioquímicas en los alimentos aumentan con la temperatura, por lo que el rango de temperaturas absolutas en el almacenamiento de los productos alimenticios es muy pequeño (Tirado y col., 2005).

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que tanto para verduras crudas como cocidas los recuentos de los distintos marcadores fueron altos, en la mayoría de éstos se registró un elevado valor en el T0, lo que afectó la vida útil del alimento. No se demostró una diferencia considerable en los recuentos entre verduras crudas y cocidas a pesar que, éstas últimas, fueron sometidas a un proceso térmico a alta temperatura que disminuyó la carga microbiana. Esto puede deberse a una contaminación posterior o a preparación con demasiada anticipación, con almacenamiento a temperaturas inadecuadas.

5.2 Análisis microbiológico de comidas elaboradas por empresas que expenden sus productos en el comedor de la U.N.R.C.

Se realizaron análisis microbiológicos de alimentos listos para consumo de 6 empresas de la ciudad de Río Cuarto y región.

En la tabla 10 se observan los resultados obtenidos del análisis microbiológico realizado a 6 alimentos de diferentes empresas.

Tabla 10: Análisis microbiológico de productos elaborados por empresas de Río Cuarto y región

Empresas	<i>Enterobacterias</i> UFC/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>S. aureus</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> spp.	<i>C. perfringens</i> UFC/g	<i>B. cereus</i> UFC/g
<u>Empresa 1:</u> Sandwich de miga de jamón cocido y verduras	N/D	< 0,3	< 3	A	< 10	< 1 x 10 ²
<u>Empresa 2:</u> Mayonesa de ave	< 10	< 0,3	4,8 x 10²	A	< 10	< 1 x 10 ²
<u>Empresa 3:</u> Bombas de carne con arroz integral	1,6 x 10 ³	< 0,3	2,3 x 10	A	< 10	< 1 x 10 ²
<u>Empresa 4:</u> Pizzeta de jamón, queso y aceitunas	< 10	0,4	4,3 x 10	A	N/D	< 1 x 10 ²
<u>Empresa 5:</u> Pebete de jamón cocido y queso	< 10	1,5	9	A	< 10	< 1 x 10 ²
<u>Empresa 6:</u> Costeleta de ternera con arroz, arvejas y zanahoria	1,3 x 10⁵	0,4	1,1 x 10³	A	< 10	< 1 x 10 ²

Referencias: N/D=No Determinado; UFC=Unidades Formadoras de Colonias; A=Ausencia; NMP=Número Más Probable

Límites máximos: *Enterobacterias*: M=10⁴; *E.coli*: m<3; *S.aureus*: M=10²; *C.perfringens*: M=10³; *B.cereus*: M=10³

De las 6 muestras obtenidas y analizadas de 6 empresas, se observó que 2 de ellas (Empresa 2 y Empresa 6) no fueron aptas para el consumo humano, ya que ambas superaron el límite establecido por la norma vigente para recuento de *S.aureus* y una de ellas sobrepasó el límite para recuento de *Enterobacterias*.

La presencia de *Enterobacterias* en gran número puede indicar malas prácticas higiénicas durante la preparación del alimento y/o un almacenamiento inadecuado del mismo (Imperiale, 2017). En los alimentos que han recibido un tratamiento para garantizar su sanidad, la presencia de niveles considerables de *Enterobacterias* indica tratamiento inadecuado y/o contaminación posterior al tratamiento; más frecuentemente a partir de materias primas, equipos sucios o manejo no higiénico (Analiza Calidad, 2005).

En ninguna de las muestras analizadas se detectó presencia de *Salmonella* spp., ni recuento de *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*.

El control microbiológico de 6 muestras de alimentos elaborados por 6 empresas de la ciudad de Río Cuarto proveedoras del comedor universitario mostró que el 67% (4 muestras) fueron aptas para consumo humano (figura 10).

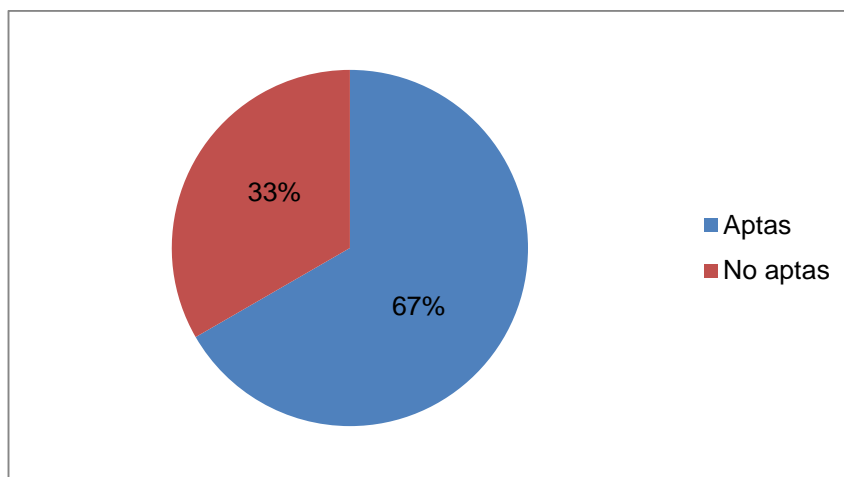


Figura 10: Aptitud de consumo humano del total de muestras elaboradas por las seis empresas analizadas

Es importante destacar que el director técnico es corresponsable con el propietario del establecimiento elaborador de alimentos del cumplimiento de las normas vigentes en materia alimentaria. El Reglamento Bromatológico de la Municipalidad de Río Cuarto (Capítulo II, art. 104), establece que la Dirección Bromatológica Municipal (ámbito de contralor oficial) requiere la implementación de la dirección técnica de los establecimientos elaboradores de alimentos, la cual es realizada por profesionales o técnicos con orientación en Higiene y Seguridad Alimentaria (director técnico) con la finalidad de capacitar al personal en higiene y manipulación de alimentos, diseñar, implementar y mantener el cumplimiento de las BPM y POES.

5.3 Análisis microbiológico de comidas elaboradas por empresas con y sin envase

Se analizaron 6 muestras de sándwich de jamón y queso elaboradas por una empresa de la ciudad de Río Cuarto (Empresa 1). Dos de éstas fueron procesadas para su análisis microbiológico de forma inmediata al llegar al laboratorio (muestras control correspondientes al tiempo 0 (T0)). Las 4 muestras restantes se analizaron en distintos periodos de tiempo divididas en 2 grupos de 2 muestras, uno con envase (film de PVC) y otro sin envase, almacenadas a temperatura de refrigeración.

En la tabla 11 se observan los resultados del análisis microbiológico de las muestras sin envase.

Tabla 11: Alimentos elaborados por una empresa de la ciudad de Río Cuarto sin envase

Tiempo	RAT UFC/g	Enterobacterias UFC/g	CT NMP/g	E.coli NMP/g	S.aureus NMP/g	HyL UFC/g
T0	1×10^5	$7,8 \times 10^3$	$2,4 \times 10$	0,7	$2,1 \times 10$	$3,5 \times 10^2$
T1	9×10^6	5×10^5	4	< 0,3	7	3×10^5
T2	2×10^8	8×10^5	$4,3 \times 10$	$1,5 \times 10$	7×10	1×10^7

Referencias: UFC= Unidades Formadoras de Colonias; RAT= Recuento de microorganismos Aerobios mesófilos viables Totales; CT= Coliformes Totales; HyL= Hongos y Levaduras; NMP= Número Más Probable

En la tabla 12 se observan los resultados del análisis microbiológico de las muestras envasadas.

Tabla 12: Alimentos elaborados por una empresa de la ciudad de Río Cuarto con envase

Tiempo	RAT UFC/g	Enterobacterias UFC/g	CT NMP/g	E.coli NMP/g	S. aureus NMP/g	H y L UFC/g
T0	$1,4 \times 10^4$	$2,8 \times 10^3$	1,5	0,3	$1,1 \times 10$	$3,5 \times 10^2$
T1	6×10^6	2×10^5	$2,1 \times 10$	< 0,3	7	9×10^5
T2	6×10^7	9×10^4	$9,3 \times 10$	< 0,3	< 3	1×10^7

Referencias: UFC= Unidades Formadoras de Colonias; RAT= Recuento de microorganismos Aerobios mesófilos viables Totales; CT= Coliformes Totales; HyL= Hongos y Levaduras; NMP= Número Más Probable

En las siguientes figuras se muestra una comparación entre las muestras con y sin envase de los distintos marcadores analizados.

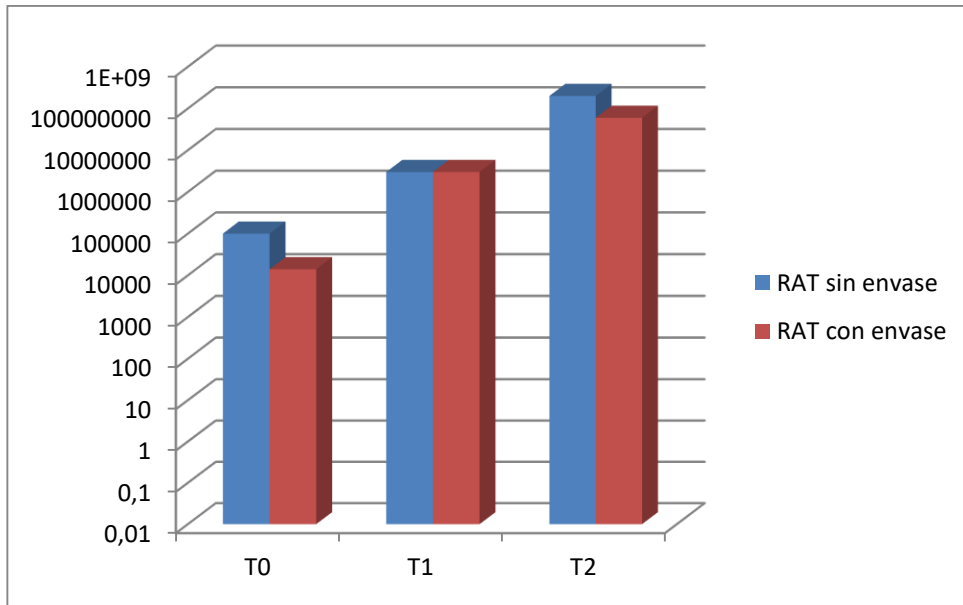


Figura 11: Recuento de RAT entre alimentos con y sin envase

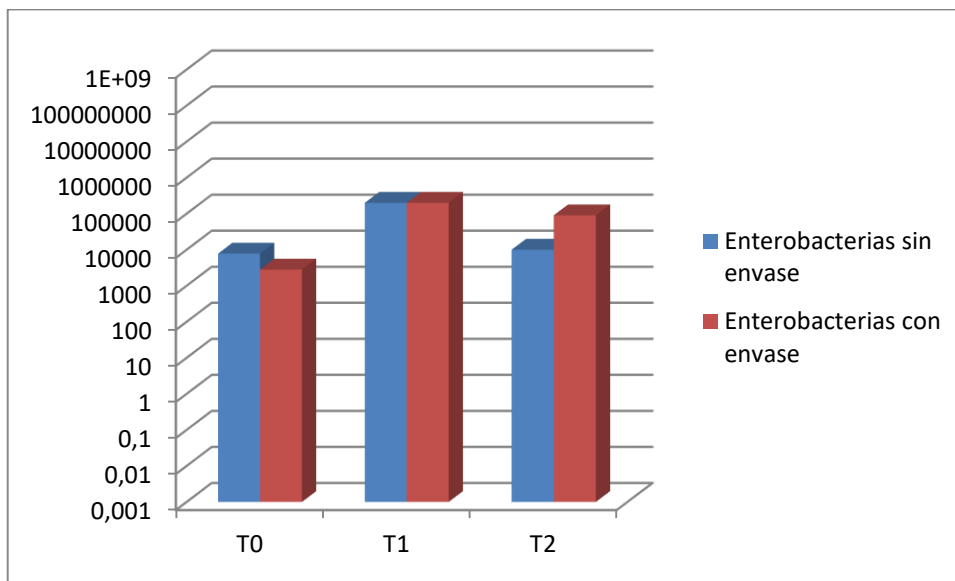


Figura 12: Recuento de Enterobacterias entre alimentos con y sin envase

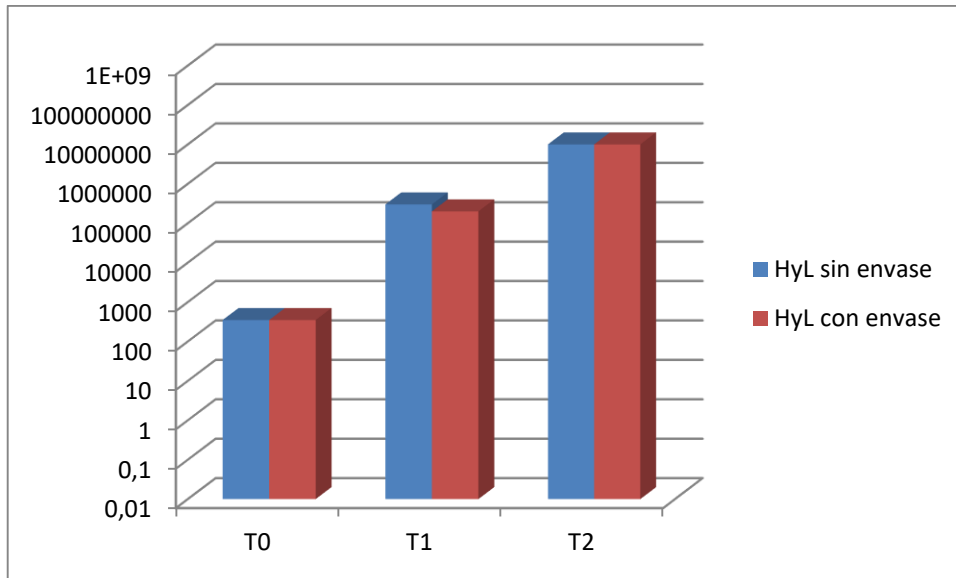


Figura 13: Recuento de HyL entre alimentos con y sin envase

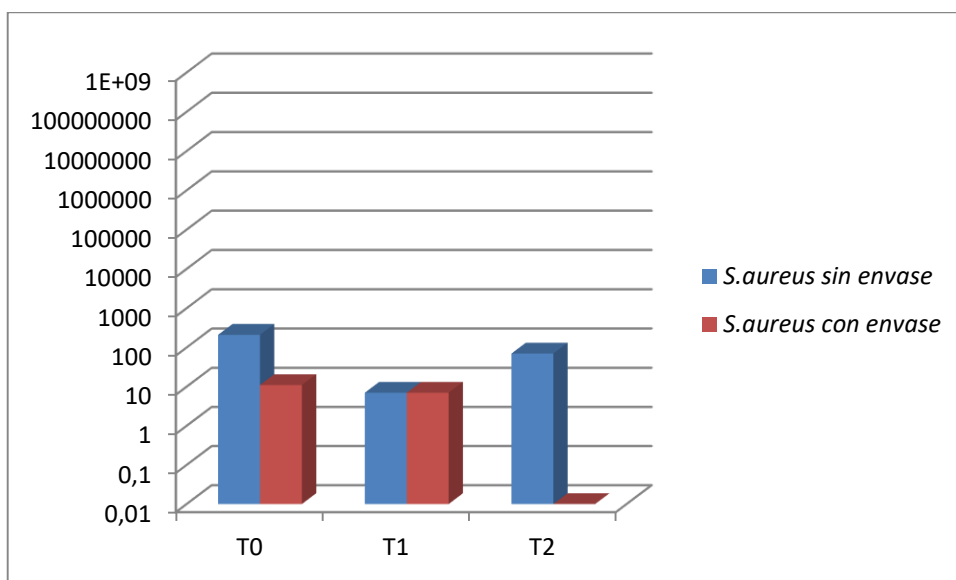


Figura 14: Recuento de S.aureus entre alimentos con y sin envase

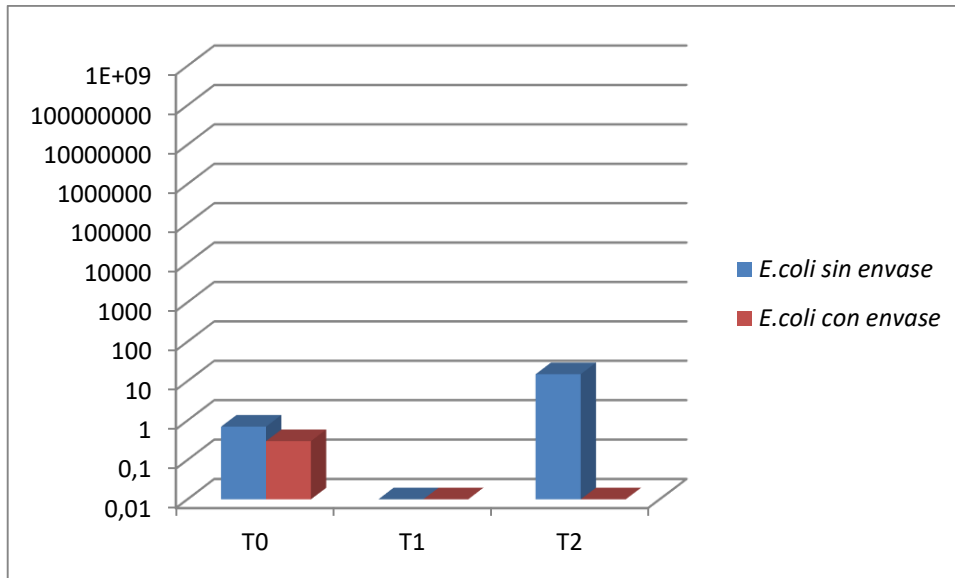


Figura 15: Recuento de *E.coli* entre alimentos con y sin envase

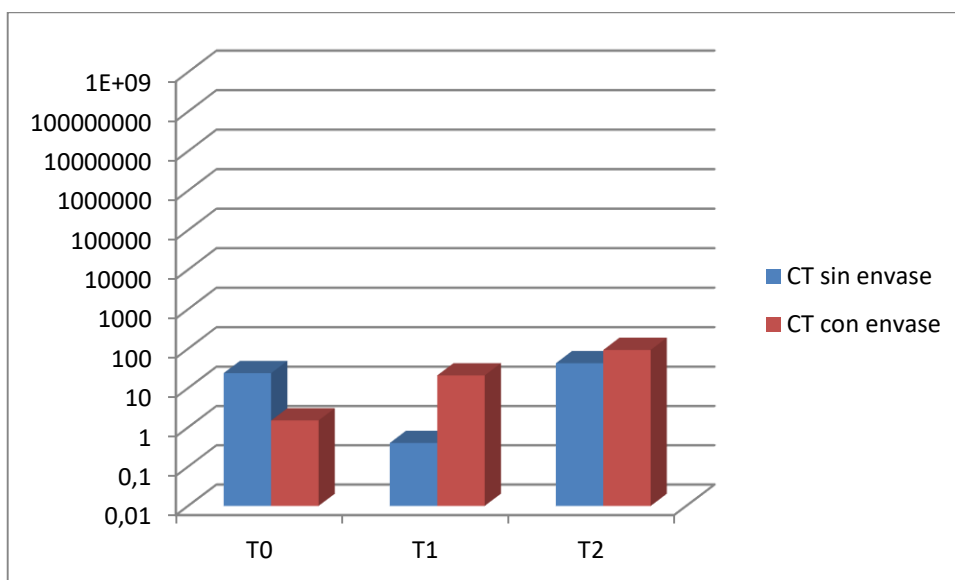


Figura 16: Recuento de CT entre alimentos con y sin envase

En el tiempo control y en los distintos intervalos de almacenamiento, los valores de los marcadores analizados no presentaron una diferencia considerable entre los alimentos con y sin envase. Esto indicaría que el film de PVC tiene poca influencia en el desarrollo microbiano presente en el producto alimenticio. Además, los recuentos de aerobios totales, Enterobacterias y hongos y levaduras (figura 11, 12 y 13) aumentaron en aproximadamente 2 unidades logarítmicas a lo largo del periodo de almacenamiento, lo que demuestra la notable disminución de la vida útil del alimento. Los recuentos de *S.aureus*, *E.coli* y CT (figura 14, 15 y 16) fueron bajos, atribuyendo las variaciones de los mismos a distintas condiciones de higiene y/o la intervención de distintos operadores en el proceso de elaboración.

Los sándwiches se elaboran con materias primas muy variadas como panes, fiambres, embutidos, carnes, quesos, vegetales y aderezos (salsas, mayonesa, manteca e inclusive mezcla de ambas). La producción de un sándwich implica una importante manipulación y se consume sin ningún tratamiento térmico posterior, factores que convierten a este alimento en un vehículo potencial de microorganismos patógenos. Además, estos productos alimenticios presentan características óptimas para el desarrollo de microorganismos, ya que tienen alto contenido de nutrientes, pH y agua (elevada aw) (Martín y col., 2016).

El crecimiento de patógenos y microorganismos de alteración se ve afectado por el nivel inicial de contaminación. Con altos niveles iniciales, los microorganismos contaminantes necesitan menos tiempo para alcanzar el nivel mínimo de deterioro, por lo tanto, la vida útil se reduce (Valero y col., 2012).

Los factores que contribuyen a los brotes de ETA son la refrigeración inadecuada, preparación temprana de los alimentos, falta de higiene en la manipulación e incorrecto almacenamiento de comidas preparadas. El consumo masivo de estos productos en eventos sociales, fiestas o adquiridos al paso como comida rápida en puestos, ferias y carros ambulantes (vía pública) constituyen un peligro potencial para la salud del hombre (Martín y col., 2016).

5.4 Evaluación total de muestras analizadas de menú tradicional y alimentos elaborados por empresas expendidas en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto

Del total de 11 muestras (5 correspondientes al menú tradicional y 6 correspondientes a 6 empresas proveedoras) tomadas y analizadas en el presente estudio, se observó que el 82% fueron aptas para consumo humano (9 muestras), mientras que el 18% restante (2 muestras provenientes de empresas) no fueron aptas por presentar altos recuentos de *S. aureus* y *Enterobacterias* (figura 17). Ninguna de las muestras analizadas presentó recuentos de *B.cereus* y *C.perfringens*, ni presencia de *Salmonella* spp.

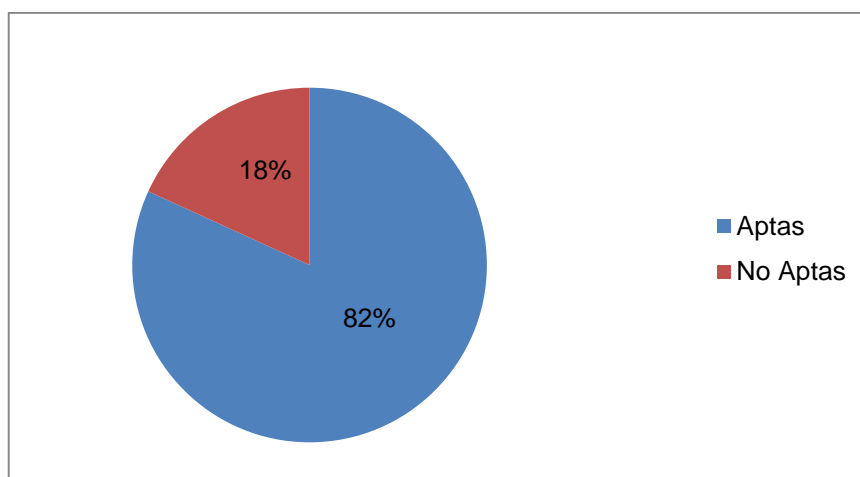


Figura 17: Aptitud de consumo humano del total de muestras elaboradas por las seis empresas y por el comedor universitario

Los resultados mostrados en este estudio coinciden parcialmente con los obtenidos por Ottonello (2017), donde el 68% de las muestras analizadas en el año 2015 presentaron una calidad microbiológica aceptable. Entre los años 2016 y 2017, este porcentaje subió al 82% y, en consecuencia, disminuyó el de alimentos no aptos en la misma proporción.

Según la OMS, la incidencia anual mundial estimada de diarrea es de 1.500 millones de casos y se ha descrito que el 70% de las diarreas se originan por la ingestión de agua y alimentos contaminados con microorganismos y/o sus toxinas, contituyendo una de las principales causas de morbilidad en todas las edades y de mortalidad en los niños (García Vesga, 2014; De La Hoz Gómez y Paba Osorio, 2016).

La población de los países en desarrollo es más propensa a sufrir enfermedades transmitidas por los alimentos debido a múltiples razones: falta de acceso a agua potable para la preparación de alimentos, transporte y almacenamiento inadecuados de los mismos y falta de capacitación sobre prácticas alimentarias seguras e higiénicas. Además, hay una carencia de sistemas efectivos de vigilancia y monitoreo de ETA, sistemas de inspección para la inocuidad de los alimentos y programas educativos sobre la conciencia de la higiene alimentaria, por lo que estas enfermedades tienen gran impacto en la salud pública y en la economía de un país (Jahan, 2012).

En Argentina, según la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación, en el año 2018 se reportó un brote de ETA en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) y tres brotes en Chubut con 40 y 44 casos, respectivamente (Dirección de Epidemiología, 2018).

La capacitación en BPM y en APPCC es una herramienta muy útil para mejorar la calidad dentro de la industria alimentaria en cuanto a seguridad alimentaria y aspectos generales de la calidad. La puesta en marcha de sistemas de gestión enfocados hacia la calidad y seguridad del producto, se ha convertido en una necesidad que ha pasado a ser obligatoria en muchos países. Dentro del espacio MERCOSUR, la obligatoriedad de que todas las empresas dispongan de BPM es un primer paso para el desarrollo de sistemas más amplios que en otros países son obligatorios, como es el caso del Sistema APPCC que en Europa es de cumplimiento obligatorio y en Argentina es voluntario. Las empresas que tienen intención de vender sus productos en mercados externos, se ven en la obligación de cumplir con la normativa de los países a los que exportan y, de esta manera, se hace obligatorio disponer de un sistema de gestión que considere al APPCC como la herramienta para asegurar la inocuidad de los productos que se elaboren (Román, 2007).

Efectuando una cronología de los resultados obtenidos a partir de estudios realizados en el laboratorio de Microbiología de Alimentos entre los años 2004 y 2017 sobre la aptitud de alimentos para el consumo humano expendidos en el comedor universitario, se puede observar que año a año el porcentaje de aptitud de las muestras fue en aumento conjuntamente con el crecimiento del comedor tanto en estructura como en el nivel de capacitación de los operarios del sector cocina.

Con respecto a los alimentos elaborados en el comedor de la UNRC, entre los años 2004 y 2012 los estudios microbiológicos efectuados mostraron que el 50% de las muestras no fueron aptas para el consumo humano debido, fundamentalmente, a que las condiciones de trabajo en el sector cocina no eran las adecuadas ante la alta demanda de alimentos. Por tal motivo, se efectuó la ampliación de este sector y del salón de recepción del comedor universitario e incorporación de nuevo personal que recibió la capacitación apropiada (Coria, 2005; Pasetti, 2009; Gnesutta, 2010; Lerda, 2010; Yachecen, 2012). Posteriormente, según Cantarutti (2015) y Otonello (2017), el 100% de las muestras resultaron aptas para consumo humano. Estos datos fueron coincidentes con los obtenidos en este estudio, ya que a partir de 5 muestras de alimentos analizados se observó que el 100% fue apto para consumo humano. Esto revela un proceso de constante control y educación efectuado por la responsable técnica del comedor universitario y por los profesionales del Laboratorio de Microbiología de Alimentos para el mejoramiento continuo de la calidad de productos alimenticios que se expenden en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

En cuanto al análisis microbiológico de comidas elaboradas por empresas proveedoras del comedor universitario, el estudio realizado por Pasetti (2009) mostró que ninguna de las muestras analizadas fueron aptas para el consumo humano. En otro estudio se observó que

de un total de 18 muestras analizadas provenientes de empresas elaboradoras de la ciudad de Río Cuarto, el 16% de las mismas fue apto para consumo (Gnesutta, 2010). Según Lerda (2010), el 33% cumplió con los criterios microbiológicos de la normativa vigente. Los resultados obtenidos por Yachecen (2012) fueron similares a los obtenidos por Lerda (2010), ya que de un total de 31 muestras, el 23% de las mismas fueron aptas para consumo humano. En el estudio realizado por Cantarutti (2015) se observó que de 27 muestras de alimentos, el 74% (20 muestras) cumplió con la norma establecida por el CAA. Según Otonello (2017), el 60,7% de las muestras fue apto mientras que el 39,3% restante no fue apto. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en este estudio, ya que a partir del control microbiológico de 6 muestras de alimentos elaborados por seis empresas proveedoras se observó que el 67% (4 muestras) fue apto para el consumo humano.

5.5 Evaluación total de muestras analizadas listas para consumo expendidas en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto envasadas con film de PVC

Según los resultados obtenidos en el presente estudio se observó que, tanto los alimentos provenientes del sector self-service del comedor universitario (verduras crudas y cocidas) como las comidas elaboradas por una empresa proveedora (sándwichs de miga de jamón y queso) y envasados con films de PVC, registraron importantes aumentos en los recuentos de las bacterias indicadoras de la vida útil del producto en el periodo de almacenamiento estudiado.

Cuando el producto fresco es envasado, se llevan a cabo dos procesos simultáneos: la respiración del producto y la permeabilidad de los gases a través de la película plástica. Si la velocidad de consumo de O_2 y producción de CO_2 es acompañada con un buen intercambio gaseoso de la película, es posible tener una atmósfera adecuada para el producto. El equilibrio se logra después de determinado tiempo, dependiendo de los requerimientos del producto y permeabilidad de la película, los cuales están en función de la temperatura y humedad relativa de almacenamiento (Ospina Meneses y Cartagena Valenzuela, 2008).

Este equilibrio se ve afectado en el envasado con film de PVC ya que éste no presenta suficientes propiedades de barrera para muchas aplicaciones de envasado. Esta limitación surge porque la adición de plastificantes en compuestos de PVC flexibles causa un aumento en la movilidad de la cadena molecular y las distancias intermoleculares del polímero. El resultado es una vía más directa para la difusión de los gases y vapor de agua (Massey, 2003). La alta permeabilidad del PVC plastificado es una propiedad aceptable en el envasado de carnes y quesos que son alimentos que necesitan una elevada tasa de respiración (Patrick, 2005). Sin embargo, una alta permeabilidad del oxígeno promueve varios tipos de reacciones

de deterioro en los alimentos, incluyendo la reducción de las grasas y las reacciones de pardeamiento. Además, la mayoría de las bacterias y hongos más comunes que afectan los alimentos requieren de oxígeno para su crecimiento (Vallejo Chuga y Velasco Mena, 2015).

En un estudio realizado por Rodríguez y col. (2002) se evaluó, a partir de los marcadores aerobios totales y hongos y levaduras, el efecto de diferentes películas plásticas en la conservación de choclos en granos mínimamente procesados. El recuento inicial de aerobios mesófilos fue de 6×10^4 ufc/g y llegó a 10^6 ufc/g al cabo de 6 días de almacenamiento en refrigeración, mientras que el recuento de hongos y levaduras inició con un valor aproximado de 750 ufc/g, llegando hasta 10^6 ufc/g luego de 9 días de almacenamiento.

En una investigación realizada por Sanz y col. (2006) se realizó un análisis de la influencia del film de envasado y la exposición de la luz en la vida útil del coliflor y brócoli mínimamente procesados. Los vegetales fueron envasados en 4 tipos distintos del film plástico y almacenados a 4 °C durante 25 días. Se realizaron análisis microbiológicos a los días 0, 1, 3, 7, 11, 15, 21 y 25. Se pudo demostrar que la permeabilidad del film no afectó significativamente la evolución de los recuentos microbianos.

Martín y col. (2016) realizaron un estudio sobre la calidad microbiológica y vida útil en sándwiches de miga envasados en film de PVC (policloruro de vinilo), envase preformado de PET (polietileno tereftalato), envasados al vacío con atmósfera modificada en envases laminados con PVC (policloruro de vinilo) y un control sin envase, los que fueron conservados en refrigeración por 21 días. Se realizó el análisis microbiológico de las muestras en el tiempo 0, a las 24 h y a los 3, 5, 7, 10, 15, 18 y 21 días de envasado. Los recuentos microbiológicos aumentaron notablemente excediendo, después de los 7 días de almacenamiento, los distintos límites establecidos por el CAA.

Según Barry-Ryan y col. (2000), se determinó la calidad de zanahorias trituradas envasadas con diferentes film de PVC, almacenadas a 8 °C durante 10 días. Los recuentos microbiológicos de aerobios totales y de hongos y levaduras aumentaron hasta 10 unidades logarítmicas al final del almacenamiento. Además, se observó que la muestra envasada con el film de mayor permeabilidad al oxígeno fue la que presentó mayor recuento microbiano.

Los estudios expuestos anteriormente coinciden con los resultados obtenidos en el presente trabajo, es decir que alimentos con elevada carga microbiana envasados con film polimérico de alta permeabilidad al O_2 y almacenados a bajas temperaturas presentaron una reducida vida útil.

Existen diversas investigaciones que demuestran que el agregado de sustancias antimicrobianas a los film de PVC tales como nanocompuestos de plata (Azlin-Hasim y col., 2016), dióxido de titanio (Xing y col., 2012; Metak, 2015), óxido de zinc (Li y col., 2009), soluciones del biopolímero quitosano enriquecidas con aceites esenciales de especias (Torlak y Nizamlioglu, 2011), lisozima (Conte y col., 2006) y bacteriocinas (Iseppi y col., 2008), extiende la vida útil de distintos productos alimenticios almacenados con estos envases. En todos los estudios se observó un buen efecto inhibitorio de estos compuestos sobre distintos patógenos transmitidos por alimentos como *E.coli*, *S.aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E.coli* O157:H7 y *Bacillus cereus*.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este estudio son las siguientes:

❖ De un total de 11 alimentos analizados elaborados por el comedor universitario y por empresas proveedoras, 9 (82%) cumplieron con la normativa nacional vigente (C.A.A.) presentando una calidad microbiológica aceptable.

❖ De las 5 muestras de alimentos elaboradas por el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto, se determinó que todas fueron aptas para el consumo humano, cumpliendo los requisitos microbiológicos establecidos.

❖ El control microbiológico de 6 muestras de alimentos elaborados por 6 empresas de la ciudad de Río Cuarto proveedoras del comedor universitario, reveló que el 67% (4 muestras) fue apto para el consumo humano. El 33% (2 muestras) restante no fue apto para consumo humano por no cumplir con la normativa vigente al superar los límites de recuento de *Staphylococcus aureus* y *Enterobacterias*.

❖ No se detectó presencia de *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.* ni de *Clostridium perfringens* en ninguna de las comidas de las seis empresas como así tampoco en las elaboradas por el comedor universitario.

❖ Las muestras provenientes del sector self-service del comedor universitario y de la empresa proveedora envasadas con films de PVC mostraron importantes aumentos en los recuentos de las bacterias indicadoras de la vida útil del producto lo que indicaría que este envase no es muy apropiado para la conservación a largo plazo de alimentos altamente perecederos.

6.1 RECOMENDACIONES

❖ Realizar capacitación y educación en Buenas Prácticas de Manufactura a los manipuladores de alimentos, recalcando todas las medidas de higiene que deben guardar, así como el correcto uso de la indumentaria necesaria a la hora de trabajar con los mismos.

❖ Evaluar los conocimientos adquiridos de dichas capacitaciones, para poner en evidencia lo aprendido.

❖ Verificar periódicamente la limpieza del establecimiento, condiciones en que se almacenan las verduras, así como el proceso de lavado y desinfección de las mismas antes de preparar las ensaladas frescas.

❖ Implementar métodos de envasado más eficaces para que la vida útil del alimento se extienda.

7. ANEXO

7.1 Medios de cultivo:

➤ **Agua de Peptona para Diluciones**

Peptona..... 1 g
Agua Destilada 1000 ml
pH: 7

➤ **Agar plate count (PCA)**

Peptona de caseína 5 g
Extracto de levadura 2,5 g
Glucosa 1 g
Agar 14 g
Agua destilada 1000 ml
pH: 7

➤ **Agar Violeta Rojo Neutro Bilis Glucosa (VRBG)**

Peptona de carne 7 g
Extracto de levadura 3 g
Cloruro de sodio 5 g
Glucosa 10 g
Sales biliares 1,5 g
Rojo neutro 0,03 g
Cristal violeta 0,002 g
Agar 15 g
Agua destilada 1000 ml
pH: 7,3

➤ **Medio basal para oxidación/fermentación de azúcares**

Tripteína 2 g
Cloruro de sodio 5 g
Fosfato diposático 0,3 g
Azul de bromotimol 0,03 g
Agar 2,5 g
Agua destilada 1000 ml

pH: 7,1

Una vez preparado el medio base, distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Agregar de manera aséptica el hidrato de carbono en estudio en concentración final al 1%.

➤ **Caldo Mac Conkey (CMC)**

Peptona.....	20 g
Sales biliares.....	5 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Lactosa	10 g
Púrpura de bromocresol.....	2,5 ml
(1,6% en alcohol)	
Agua Destilada.....	1000 ml

pH: 7,4

➤ **Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)**

Peptona.....	10 g
Lactosa	5 g
Sacarosa.....	5 g
Fosfato dipotásico.....	2 g
Agar.....	13,5 g
Eosina.....	0,4 g
Azul de metileno.....	0,065 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH: 7,2

➤ **Caldo Gioliti Cantoni (CGC)**

Tripteína.....	10 g
Extracto de levadura	5 g
Extracto de carne	5 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Cloruro de litio.....	5 g
Manitol	20 g
Glicina.....	1,2 g
Piruvato de sodio.....	3 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 6,9

Cada 100 ml de medio añadir 5 ml de una solución de telurito de potasio al 1% P/V.

➤ **Agar Baird-Parker (Medio Base)**

Peptona de caseína	10 g
Extracto de Carne	5 g
Extracto de Levadura	1g
Cloruro de litio	5 g
Agar	13 g
Glicina	12 g
Piruvato de sodio	10 g
Agua Destilada	1000 ml

pH: $6,8 \pm 0,2$

Cada 100 ml de medio base fundido y templado a 45°C añadir:

- 1 ml de solución telurito de potasio 1% P/V.
- 5 ml de solución yema de huevo.

➤ **Agua de Peptona Bufferada**

Digesto enzimático.....	10 g
de tejido animal	
Cloruro de Sodio.....	5 g
Fosfato Disódico.....	9 g
Fosfato Monopotásico.....	1,5 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH: 7

➤ **Agar Nutritivo (AN)**

Pluripeptona	5 g
Extracto de Carne	3 g
Cloruro de Sodio	8 g
Agar	15 g
Agua Destilada	1000 ml

pH: 7,3

➤ **Caldo Tetrionato Base (CT)**

Extracto de carne	10 g
-------------------------	------

Peptona.....	10 g
CO ₃ Ca.....	50 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7,4 - 7,6

Por cada 10 ml de medio base añadir 0,2 ml de solución iodo iodurada (5 g de ioduro de potasio más 6 g de iodo en 20 ml de agua destilada).

➤ **Caldo Rappaport Vassiliadis (CRV)**

Bacto triptona	4,54 g
Cloruro de Magnesio	13,4 g
Cloruro de Sodio	7,2 g
Fostato monopotásico	1,45 g
Verde de Malaquita.....	0,036 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 5,1

➤ **Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (Agar XLD)**

Extracto de levadura	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Xilosa	3,5 g
Lactosa	7,5 g
Sacarosa.....	7,5 g
Lisina.....	5 g
Desoxicolato de sodio	2,5 g
Tiosulfato de sodio	6,8 g
Citrato de amônio y hierro	0,8 g
Rojo fenol.....	0,08 g
Agar	13,5 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7,4

➤ **Agar Bismuto Sulfito (Agar B-S)**

Peptona.....	10 g
Extracto de carne	5 g
Glucosa.....	5 g

Fosfato disódico	4 g
Sulfato ferroso.....	0,3 g
Indicador de sulfito-bismuto.....	8 g
Verde brillante	0,025 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7,5

➤ **Agar Sulfito- Polimixina- Sulfadiazina (SPS)**

Peptona de caseína	15 g
Extracto de levadura	10 g
Citrato férrico.....	0,5 g
Sulfito de sodio.....	0,5 g
Sulfato de polimixina B.....	0,01 g
Sulfadiazina sódica	0,12 g
Agar	13,9 g
Agua destilada	1000ml

pH: 7

➤ **Agua de Peptona para Indol**

Peptona.....	10 g
Cloruro de Sodio	5 g
Agua Destilada	1000 ml

pH: 7

➤ **Medio de Clark y Lubs (RM-VP)**

Peptona.....	7 g
Glucosa.....	5 g
Fosfato Dipotásico.....	5 g
Agua Destilada	1000 ml

pH: 6,7 – 7,1

➤ **Caldo Cerebro Corazón (CCC)**

Infusión de Cerebro de Ternera.....	200 g
Infusión de Corazón vacuno.....	250 g
Cloruro de Sodio	5 g

Peptona.....	10 g
Fosfato Disódico.....	2,5 g
Glucosa.....	5 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH: 7,4

➤ **Agar Lisina Hierro (LIA)**

Peptona.....	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa.....	1 g
L-Lisina	10 g
Citrato férrico amónico	0,5 g
Tiosulfato de sodio	0,04 g
Purpura de bromocresol.....	0,02
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 6,7

➤ **Agar Extracto de levadura-Glucosa-Cloranfenicol (YGC).**

Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Cloranfenicol	0,1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 6,6

➤ **Agar Citrato de Simmons**

Sulfato de magnesio.....	0,2 g
Fosfato dipotásico	1 g
Fosfato monoamónico.....	1g
Citrato de sodio	2 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Azul de bromotimol.....	0,08 g
Agar	13 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7,2

➤ **Agar Fenilalanina (FA)**

DL- Fenilalanina	2 g
Extracto de Levadura	3 g
Cloruro de Sodio	5 g
Fosfato de Sodio	1 g
Agar	12 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH: 7,3

➤ **Agar Hierro Triple Azúcar (TSI)**

Peptona.....	20 g
Extracto de Carne	3 g
Glucosa.....	1 g
Lactosa	10 g
Sacarosa.....	10 g
Sulfato de hierro y amonio.....	0,20 g
Cloruro de Sodio	5 g
Tiosulfato de Sodio.....	0,2 g
Rojo Fenol.....	0,025 g
Agar	13 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH: 7,3 ± 0,2

➤ **Agar Manitol-Yema de Huevo-Polimixina (MYP)**

Peptona.....	10 g
Extracto de Carne	1 g
Manitol	10 g
Agar	15 g
Cloruro de Sodio	10 g
Rojo Fenol.....	0,025 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH: 7,2

Agregar a 100 ml de medio cultivo base enfriado a 45 °C, 10 ml de solución yema de huevo y 1 ml de solución acuosa de sulfato de polimixina.

➤ **Caldo Urea**

Urea	20 g
Extracto de Levadura	0,1 g
Dihidrógeno fosfato potásico	9,1 g
Hidrógeno fosfato disódico	9,5 g
Rojo fenol.....	0,01 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH: 6,8

➤ **VAS-PAR**

Mezcla de Vaselina (líquida) y Parafina (sólida). Se realiza la mezcla por calentamiento de ambos componentes en una proporción 2:1, es decir, 2 partes de vaselina por 1 parte de parafina. Se esteriliza en estufa.

7.2 Reactivos

✓ **Reactivo para Indol (Kovacs)**

Paradimetil-amino-benzaldehído	5 g
Alcohol Isoamílico	75 ml
Ácido Clorhídrico concentrado.....	25 ml

✓ **Reactivo para Rojo de Metilo**

Rojo de Metilo	0,1 g
Alcohol Etilico.....	65 ml
Agua Destilada	35 ml

✓ **Reactivos para VogesProskauer (VP)**

Reactivo A:

Alfa-naftol.....	5 g
Alcohol Etilico Absoluto	100 ml

La solución debe conservarse al resguardo de la luz.

Reactivo B:

Hidróxido de Potasio	40 g
Agua Destilada	100 ml

8. BIBLIOGRAFIA

- **Acuña Peralta, S.L.; Ruiz Barrueto, M.A.; Zamora Mejía, L.A. y Bustamante Canelo, O. del P.** (2014). *Evaluación de la calidad microbiológica de los alimentos que se expenden en la Universidad Señor de Sipán y alrededores. Diciembre 2013.* Tzhoecoen 6(1): 19-32.
- **Alonso N. y Poveda J.** (2008). *Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm 3M™ para el análisis de alimentos.* Tesis de grado. Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Orientación Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia.
- **Analiza Calidad.** (2005). *Microorganismos indicadores.* Recuperado de: www.analizacalidad.com/docftp/fi168arf2005-1.pdf (última consulta: julio 2018).
- **ANMAT (Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica).** (2012). *Enfermedades transmitidas por alimentos. Ficha técnica n° 8. Síndrome Urémico Hemolítico.* Recuperado de http://www.anmat.gov.ar/alimentos/ficha_enfermedades_alimentos_SUH.pdf (última consulta: mayo 2018).
- **ANMAT (Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica).** (2013). *Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos patógenos. Volumen 2.* Recuperado de http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_II.pdf (última consulta: mayo 2018).
- **ANMAT (Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica).** (2014). *Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos indicadores. Volumen 3.* Recuperado de http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_III.pdf (última consulta: mayo 2018).
- **ANMAT (Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica).** (2015). *Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Ficha técnica n° 9: Salmonelosis.* Recuperado de <http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/salmonelosis.pdf> (última consulta: mayo 2018).
- **Armendáriz Sanz, J.L.** (2008). *Seguridad e higiene en la manipulación de alimentos. Gestión ambiental y prevención de riesgos laborales en la hostelería.* (Primera ed.). Editorial Parainfo S.A. Madrid, España. ISBN 978-84-9732-682-7.
- **Astiasarán, I. y Martínez, J.A.** (2000). *Alimentos. Composición y propiedades.* (Segunda ed.). Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. ISBN 84-486-0305-2.
- **Azlin-Hasim, S.; Cruz-Romero, M. C.; Morris, M. A.; Padmanabhan, S. C.; Cummins, E. y Kerry, J. P.** (2016). *The potential application of antimicrobial silver polyvinyl chloride*

nanocomposite films to extend the shelf-life of chicken breast fillets. Food and Bioprocess Technology 9(10): 1661-1673.

- **Barros Velázquez, J.** (2016). *Antimicrobial food packaging*. (First ed.). Ed. Academic Press. ISBN 978-0-12-800723-5.
- **Barry-Ryan, C.; Pacussi, J. M. y O'beirne, D.** (2000). *Quality of shredded carrots as affected by packaging film and storage temperature*. Journal of Food Science 65(4): 726-730.
- **Borbolla-Sala, M.E.; Vidal-Pérez, M. del R.; Piña-Gutiérrez, O. E.; Ramírez-Messner, I. y Vidal-Vidal, J. J.** (2004). *Contaminación de los alimentos por Vibrio cholerae, coliformes fecales, Salmonella, hongos, levaduras y Staphylococcus aureus en Tabasco durante 2003*. Salud en Tabasco 10(2): 221-232.
- **Boric Bonifaz, V.** (2008). *Aplicaciones de la epidemiología molecular en la detección de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Avances en Latinoamérica*. Órgano Oficial del Colegio de Bioquímica y Farmacia de Bolivia (BIOFARBO) 16(1): 92-97.
- **CAA (Código Alimentario Argentino)** (2010). *Capítulo I: Disposiciones Generales*. Actualizado al 09/2010 (última consulta: noviembre de 2017).
- **CAA (Código Alimentario Argentino)** (2017). *Capítulo III: De los productos alimenticios*. Actualizado al 10/2017 (última consulta: junio de 2018).
- **Campos Díaz, J.; Rodríguez Alvarez, C.; Sierra López, A. y Arias Rodríguez, Á.** (2003). *Estudio microbiológico de las comidas servidas en los comedores escolares de la isla de Tenerife*. Revista española de salud pública 77(6): 749-760.
- **Cantarutti, I.** (2015). *Evaluación microbiológica de las comidas y del ambiente del comedor universitario de la Universidad Nacional de Río Cuarto*. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina.
- **Conte, A.; Buonocore, G. G.; Bevilacqua, A.; Sinigaglia, M. y Del Nobile, M. A.** (2006). *Immobilization of lysozyme on polyvinylalcohol films for active packaging applications*. Journal of Food Protection 69(4): 866-870.
- **Coria, G.** (2005). *Control microbiológico de platos preparados y del ambiente de elaboración en el comedor de la UNRC*. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina.
- **Dankers, C.** (2004). *Las normas sociales y ambientales, la certificación y el etiquetado de cultivos comerciales*. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/008/y5136s/y5136s00.htm> (última consulta: marzo 2019).

- **De la Hoz Gómez, E. A. y Paba Osorio, B.** (2016). *Comportamiento epidemiológico de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en el departamento de Sucre durante el período 2012-2015*. Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Enfermería, Especialización en Epidemiología. Santa Marta, Colombia.
- **Dirección de Epidemiología.** (2018). *Boletín Integrado de Vigilancia N° 419– SE 34 2018*. Ministerio de la Nación. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Recuperado de https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv_419_se34.pdf (última consulta: agosto 2018).
- **Equipo Vértice.** (2005). *Dietética y Manipulación de alimentos*. (Primera ed.). Editorial Publicaciones Vértice S.L. Málaga, España. ISBN 9788492578290.
- **FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)** (2010). *Políticas de seguridad e inocuidad y calidad alimentaria en América Latina y el Caribe*. Foro regional. Santiago, Chile. Recuperado de <http://www.cvpconosur.org/wp-content/uploads/2010/08/seguridad-alimentaria-2010.pdf> (última consulta: mayo 2018).
- **FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)** (2014). *Normas internacionales y códigos*. Roma, Italia. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/014/am859s/am859s14.pdf> (última consulta: mayo 2018).
- **Feldman, P.; Melero, M.; Teisaire, C.; Nonzioli, A.; Santín, C.; Alderete, J.M.; Clause, J.; Ferrario, R.; Gulielmetti, B. y Novas G.** (2016). *Sistemas de Gestión de Calidad en el Sector Agroalimentario. BPM-POES-MIP-HACCP*. Publicación de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Argentina. Recuperado de http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/publicaciones/calidad/BPM/Gestion_Calidad_Agroalimentario_2016.pdf (última consulta: mayo 2018).
- **Forsythe, S.J.** (2003). *Alimentos seguros. Microbiología*. (Primera ed.). Editorial Acribia S.A. ISBN 9788420010175.
- **Galán Durán, J.** (2012). *Esencia de hongos en los alimentos*. Universidad Católica de Cuenca, Unidad Académica de Ingeniería Química Biofarmacia, Industrias y Producción. Cuenca, Ecuador.
- **García Romana, A.** (2012). *Seguridad e higiene en la manipulación alimentaria (restaurantes, hoteles y otras colectividades)*. (Primera ed.). Editorial Visión Libros. Madrid, España. ISBN 978-84-9011-247-2.
- **García Vesga, A.** (2014). *Caracterización epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en el periodo 2008-2012 en la ciudad de Bogotá D. C.* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina. Bogotá, Colombia.

- **Gnesutta, B.** (2010). *Evaluación microbiológica de las comidas y del ambiente del comedor universitario de la UNRC*. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina.
- **Guerrero, J.A.** (2016). *Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Enfermedades transmitidas por alimentos*. Instituto Nacional de Salud (INS). República de Colombia. Recuperado de <http://www.hosusana.gov.co/sites/default/files/u1/capacitacion/PRO%20Enfermedades%20Trans.%20por%20alimentos.pdf> (última consulta: mayo 2018).
- **Gutiérrez Bello, J.** (2000). *Ciencias Bromatológicas. Principios generales de los alimentos*. Editorial Díaz Santos S.A. Madrid, España. ISBN 9788479784478.
- **IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura)**. (2009). *Buenas Prácticas de Manufactura. Una guía para pequeños y medianos agroempresarios*. San José, Costa Rica. Recuperado de <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A5294e/A5294e.pdf>. (última consulta: mayo 2018).
- **Imperiale R., Rudà E., Bianchi D.M., Gallina S., Gilli G. y Decastelli I.** (2017). *Microbiological quality of sandwiches from local cafés and food vending machines in Turin, Italy*. *EC Microbiology* 5.6: 209-214.
- **Iseppi, R.; Pilati, F.; Marini, M.; Toselli, M.; de Niederhäusern, S., Guerrieri, E. y Bondi, M.** (2008). *Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging*. *International Journal of Food Microbiology* 123(3): 281-287.
- **Jahan, S.** (2012). *Epidemiology of Foodborne Illness. Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*. Ed. InTech. ISBN: 978-953-307-916-5.
- **Kilcast, D. y Subramaniam, P.** (2000). *The stability and shelf-life of food*. (First ed.). Ed. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England. ISBN 1-85573-500-8.
- **Leadbitter, J.** (2003). *Packaging materials 5. Polyvinyl Chloride (PVC) for food packaging applications*. International Life Sciences Institute. Recuperado de [http://www.pac.gr/bcm/uploads/5-polyvinyl-chloride-\(pvc\)-for-food-packaging-applications.pdf](http://www.pac.gr/bcm/uploads/5-polyvinyl-chloride-(pvc)-for-food-packaging-applications.pdf) (última consulta: junio 2018).
- **Lerda, B.** (2010). *Evaluación microbiológica de las comidas y del ambiente del comedor universitario de la UNRC*. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina.

- **Li, X.; Xing, Y.; Jiang, Y.; Ding, Y. y Li, W.** (2009). *Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens*. International Journal of Food Science and Technology 44(11): 2161-2168.
- **Manzo, N.; Dertiano, D.; Burgos, N.; Gori, F.; Staffolani, S. M. y Céspedes, J. M.** (2015). *Variables intrínsecas y aptitud comercial de zanahoria y radicheta mínimamente procesadas y conservadas a 5° C y 10° C*. Invenio 18(35): 123-134.
- **Martín, F.R.; Alcantú, S.M.L.; Evangelista, S. M.; Guajardo, A.B.; Díaz, M.L.; De La Sierra, Y. y Sandoval, B.** (2016). *2RE-A1-Calidad Microbiológica y Vida Útil en Sándwiches de Miga en Distintos Tipos de Envases*. XVI Simposio Sudamericano de Ingeniería de la Producción. San Rafael, Argentina. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Federico_Del_Giorgio_Solfa2/publication/309592955_Memorias_del_Simposio_de_Ingenieria_de_la_Produccion_XVI_SEPROSUL/links/58190cba08ae50812f5ddf73/Memorias-del-Simposio-de-Ingenieria-de-la-Produccion-XVI-SEPROSUL.pdf#page=19 (última consulta: agosto 2018).
- **Martínez Tenorio, Y. y López Malo, V.** (2011). *Envases activos con agentes antimicrobianos y su aplicación en los alimentos*. Temas selectos de ingeniería de alimentos 5(2): 1-12.
- **Massey, L. K.** (2003). *Permeability properties of plastics and elastomers: a guide to packaging and barrier materials*. (Second ed.). Ed. William Andrew Publishing/Plastics Design Library. New York, United States. ISBN 1-884207-97-9.
- **McKeen, L.W.** (2017). *Film Properties of Plastics and Elastomers*. (Fourth ed.). Ed. Elsevier. ISBN 978-0-12-813292-0.
- **Metak, A. M.** (2015). *Effects of nanocomposite based nano-silver and nano-titanium dioxide on food packaging materials*. International Journal of Applied Science and Technology 5(2): 26-40.
- **Monteiro, C.A. y Da Costa Louzada, M.L.** (2015). *Ultra-procesamiento de alimentos y enfermedades crónicas: implicaciones para las políticas públicas*. Recuperado de http://capacidadeshumanas.org/oichsite/wp-content/uploads/2015/06/07_Ultra-procesamiento-de-alimentos.pdf (última consulta: enero de 2018).
- **Mossel, D.A.A.; Moreno, B. y Struijk, C.B.** (2006). *Microbiología de los Alimentos*. (Segunda ed.). Editorial Acribia S.A. ISBN 9788420009988.
- **Oliva Martínez, M.M.** (2008). *Enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos*. Revista Ciencia Médica La Habana 14(3): 102-115.
- **OMS (Organización Mundial de la Salud).** (2017). Recuperado de http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/ (última consulta: mayo 2018).

- **OPS (Organización Panamericana de la Salud)** (2015). *Alimentos y bebidas ultraprocesados en América Latina: tendencias, efecto sobre la obesidad e implicaciones para las políticas públicas*. Recuperado de http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/7698/9789275318645_esp.pdf (última consulta: mayo de 2018).
- **OPS (Organización Panamericana de la Salud)**. (2016). *Enfermedades Transmitidas por Alimentos*. Actualizado al 08/2016 (última consulta: mayo 2018).
- **Ordóñez Pareda, J.A.; Cambero Rodríguez, M.I. y Cabeza Briales, M.C.** (2017). *Higienización de alimentos listos para consumo mediante electrones acelerados*. *Salud i Ciencia* 22(5): 476-478.
- **Ospina Meneses, S.M. y Cartagena Valenzuela, J.R.** (2008). *La atmósfera modificada: una alternativa para la conservación de los alimentos*. *Revista Lasallista de Investigación* 5(2): 112-123.
- **Otonello, A.M.A.** (2017). *Evaluación microbiológica de las comidas y del ambiente del comedor universitario de la Universidad Nacional de Río Cuarto*. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina.
- **Panalimentos OPS/OMS** (2002). Recuperado de <http://www.panalimentos.org/comunidad/educacion1.asp?id=67> (última consulta: mayo 2018).
- **Pascual Anderson, M. del R. y Calderon y Pascual, V.** (2010). *Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. (Segunda ed.). Editorial Díaz de Santos S.A. Madrid, España. ISBN 84-7978-424-5.
- **Pasetti, M.A.** (2009). *Evaluación microbiológica de las comidas y del ambiente del comedor universitario de la UNRC*. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina.
- **Patrick, S.G.** (2005). *Practical Guide to Polyvinyl Chloride*. (First ed.). Ed. Rapra Technology Limited. ISBN 1-85957-511-01.
- **PCAA (Programa de Calidad de los Alimentos Argentinos)**. (2014). *Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)*. Boletín de difusión. Dirección de Promoción de la Calidad Alimentaria-SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación). República Argentina. Recuperado de <http://www.saludneuquen.gob.ar/wp-content/uploads/2014/06/Bolet%C3%ADn-de-difusi%C3%B3n-Buenas-Pr%C3%A1cticas-de-Manufactura-SAGPYA.pdf> (última consulta: mayo 2018).

- **Proaño, S.** (2002). *Empaques alimenticios tipo film: estudio de mercado y determinación del costo relativo en el producto final*. Tesis de maestría. Universidad Andina Simón Bolívar. Quito, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.uasb.edu.ec/bitstream/10644/2346/1/T0195-MBA-Proa%C3%B1o-Empaques.pdf> (última consulta: junio 2018).
- **Ramírez Ortiz, M.E.** (2015). *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*. (Primera ed.). Editorial Omnia Science Monographs. ISBN 9788494422928.
- **Rivera Mejía, C.M. y Sagastizado Mendez, J.A.** (2014). *Determinación de la calidad microbiológica de colados para bebés comercializados en supermercados ubicados en el distrito 2 de la zona 2 del área de San Salvador*. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador.
- **Rodríguez, S. D. C.; Montañez, J. P.; Mansilla, M. y Qüesta, A. G.** (2002). *Choclos en Granos Mínimamente Procesados. Efecto de diferentes películas plásticas en su conservación*. Universidad Nacional de Catamarca, Secretaria de Ciencia y Tecnología. Catamarca, Argentina.
- **Román, D. M.** (2007). *BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA. Planes de higiene y sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control para la pequeña y mediana empresa quesera*. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Argentina. Recuperado de <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/662.pdf> (última consulta: agosto 2018).
- **Sant'Ana, A. S.; Barbosa, M. S.; Destro, M. T.; Landgraf, M. y Franco, B. D.** (2012). *Growth potential of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life*. International journal of food microbiology 157(1): 52-58.
- **Sanz, S.; Olarte, C.; Echávarri, F. y Ayala, F.** (2006). *Influencia del film de envasado y la exposición a la luz en la vida útil de coliflor y brocoli mínimamente procesados*. Innovaciones Fisiológicas y Tecnológicas de la Maduración y Post-Recolección de Frutas y Hortalizas.
- **Singh, P.; Wani, A.A. y Langowski, H.C.** (2017). *Food packaging materials testing and quality assurance*. (First ed.). Ed. CRS Press. ISBN 9781466559950.
- **Tirado, J.; Paredes, D.; Velazquez, G. y Torres, J.A.** (2005). *Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados*. Ciencia y Tecnología Alimentaria 5(1): 66-76.
- **Torales, A. C.; Chaves, A. R. y Rodríguez, S. D. C.** (2010). *Cambios en la calidad de Rúcula mínimamente procesada. Efecto de distintos envases*. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha 11(2): 196-203.

- **Torlak, E. y Nizamlioglu, M.** (2011). *Antimicrobial effectiveness of chitosan-essential oil coated plastic films against foodborne pathogens*. Journal of Plastic Film and Sheeting 27(3): 235-248.
- **Universidad de Murcia.** (2014). *Higiene Alimentaria. Microorganismos marcadores: índices e indicadores*. Recuperado de https://www.um.es/nutbro/docs/hica/Microorganismos_marcadores.pdf (última consulta: mayo 2018).
- **Valero, A.; Carrasco E. y García-Gimeno, R.M.** (2012). *Principles and Methodologies for the Determination of Shelf-Life in Foods*. Trends in Vital Food and Control Engineering. Ed. InTech. ISBN: 978-953-51-0449-0.
- **Vallejo Chuga, J.D. y Velasco Mena, A.A.** (2015). *Aplicación de la tecnología de empaque bajo atmósferas modificadas (MAP) en la conservación y vida útil de arveja (Pisum sativum L.) variedad Obonuco Andina*. Universidad de Nariño, Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Programa de Ingeniería Agroindustrial. San Juan de Pasto, Colombia.
- **Walsh, H. y Kerry, J.P.** (2012). *Packaging of ready-to-serve and retail-ready meat, poultry and seafood packaging*. Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging (pp: 406-436).
- **Xing, Y.; Li, X.; Zhang, L.; Xu, Q.; Che, Z.; Li, W. y Li, K.** (2012). *Effect of TiO₂ nanoparticles on the antibacterial and physical properties of polyethylene-based film*. Progress in Organic Coatings 73(2-3): 219-224.
- **Yachecen, L.** (2012). *Evaluación microbiológica de las comidas y del ambiente del comedor universitario de la Universidad Nacional de Río Cuarto*. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina.
- **Yam, K.L.** (2009). *The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology*. (Third ed.). Ed. John Wiley and Sons. ISBN 978-0-470-08704-6.
- **Yildirim, S.** (2011). *Active packaging for food biopreservation*. Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation (pp: 460-489).
- **Zapata, M.E.; Rovirosa A. y Carmuega E.** (2016). *La mesa argentina en las últimas dos décadas. Cambios en el patrón de consumo de alimentos y nutrientes (1996-2013)*. Centro de Estudios sobre Nutrición Infantil (CESNI). Recuperado de <http://www.cesni.org.ar/archivos/biblioteca/LA-MESA-ARGENTINA-EN-LAS-ULTIMAS-DOS-DECADAS.pdf> (última consulta: mayo 2018).