



*Facultad Don Bosco  
de Enología y Ciencias  
de la Alimentación*



Universidad  
Católica de Cuyo  
*Rodeo del Medio*

1

# **Universidad Católica de Cuyo**

Facultad Don Bosco de Enología y Ciencias de la  
Alimentación

Licenciatura en Tecnología de los Alimentos

# Estudio del Efecto de la Adición de Conservantes y del Envasado en Atmósfera Modificada, en la Vida Útil de Sándwiches.

Axel Iván Rinaldi

## Profesores

Docente Asesor: *Lic. Damián Sánchez*

Revisión Formal: ***Mgter. Ing. Elena Caliguli***

Lugar y Fecha: Mendoza, Rodeo del Medio, Diciembre 2023

## Defensa Oral

Libro: \_\_\_\_\_ Folio N° \_\_\_\_\_: Acta N° \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Calificación: \_\_\_\_\_

## Firmas y Aclaración del Tribunal Examinador

\_\_\_\_\_

## Índice General

Dedicatoria .....	6
Agradecimientos.....	7
Resumen.....	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Desarrollo.....	14
Capítulo I: Aditivos Conservantes.....	15
Nisina (INS 234) .....	16
Lisozima (INS 1105) .....	25
Ácido Fumárico (INS 297).....	37
Propionato de Calcio (INS 282).....	40
Capítulo II: Microorganismos de Interés .....	42
Grupos Vulnerables o de Riesgo .....	43
Síntomas Generales .....	43
Clasificación de las bacterias según la composición de su pared celular .....	44
Bacteria Gram positiva .....	44
Bacteria Gram negativa.....	47
Comparación pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas .....	49
Bacterias Lácticas.....	52
Características generales de las BAL.....	52
Clasificación de las BAL .....	52

Metabolismo de azúcares y ácidos orgánicos .....	53
Metabolismo de los compuestos nitrogenados .....	57
Principales Bacterias Causantes de ETA.....	61
Salmonella Typhimurium .....	61
Escherichia Coli.....	63
Listeria Monocytogenes.....	64
Enterococcus Faecalis .....	66
Staphylococcus Aureus.....	68
Shigella – Shigelosis .....	71
Clostridium Perfringens .....	76
Bacillus Cereus .....	80
Clostridium Botulinum.....	84
Factores que Posibilitan la Aparición de ETAs y cómo Prevenirlas.....	87
Capítulo III Envasado en Atmósfera Modificada .....	89
Bioconservación .....	103
Capítulo IV Marco Legal .....	110
Código Alimentario Argentino (CAA).....	111
Artículo 156 tris – (Resolución Conjunta SPReI y SAV N° 4 - E/2017) .....	111
Artículo 747 - (Dec. 61, 17.1.77).....	113
Artículo 749 - (Dec. 61, 17.1.77) (Res. 153, 9.05.95).....	114
Diseño de la Investigación, Metodología, Materiales y Métodos.....	115

Análisis Microbiológicos .....	117
Características de la Composición de los Envases .....	120
Resultados y Discusión .....	124
Fase I. Análisis nutricionales.....	125
Fase II. Aislamiento e identificación de hongos propios del pan de miga. ....	127
Caracterización de microbiotas en pan de sándwich con olor desagradable. ....	127
Conservantes Presentes en Pan Tipo Inglés.....	130
Fase III. Análisis de vida útil sin conservantes, sólo con inyección en envase de atmósfera modificada. Evaluación Sensorial.....	131
Fase IV. Análisis in vitro del efecto de inhibición de los distintos conservantes y sus combinaciones en la vida de anaquel. Evaluación Sensorial. ....	137
Conclusión .....	146
Índice de Figuras.....	150
Índice de Tablas .....	154
Referencias Bibliográficas .....	157
Anexo I.....	162

## **Dedicatoria**

Le dedico de corazón esta tesis a mi madre quien siempre ha estado a mi lado apoyándome, cuidándome, quien me brindo su bendición a diario, una educación y valores para ser el profesional y la persona que soy hoy.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento al director de esta tesis el Licenciado en Tecnología de los Alimentos Damián Sanchez y al dueño y director del laboratorio Lab-Care al Ingeniero Industrial Francica, Pablo por la dedicación y apoyo que han brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida.

Pero un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales.

Agradezco a mi familia, mi pareja, amigos, profesores y profesionales que me brindaron su apoyo a lo largo de este camino recorrido, que me enseñaron a no bajar los brazos nunca y seguir adelante, para poder llegar al final del mismo, con la frente en alto, con orgullo y felicidad. Gracias a Dios, por ser mi guía.

A todos, muchas gracias.

## Resumen

Los productos de sandwichería son altamente perecederos, afectados a nivel microbiológico por hongos y bacterias. La industria ha invertido en investigaciones de nuevas tecnologías como el uso de conservantes y el envasado en atmósfera modificada. La finalidad del estudio es aumentar la vida útil de productos de sandwichería, a través del envasado en atmósfera modificada, donde las características del producto tanto inocuidad como calidad se mantuvieran. Se realizaron los correspondientes análisis microbiológicos según lo establecido en el Código Alimentario Argentino (CAA) en el art. 156 tris y específicamente de aquellos factibles de ser alterantes de sus caracteres organolépticos, por ende, de su calidad. Como resultado se observó que los sándwiches mantienen sus caracteres organolépticos y no se desarrollan microorganismos del tipo patógenos aun habiendo pasado 28 días desde su envasado; sin embargo, se demuestra que la carga microbiológica de partida de bacterias lácticas es elevada y las condiciones del medio, como lo son las características fisicoquímicas del producto y el envasado en atmósfera modificada favorecen su desarrollo, bajo condiciones de anaerobiosis, generando su desarrollo bajo metabolismo fermentativo de los carbohidratos, lo que se traduce en un hinchamiento del envase. Esto llevó al uso de conservante/s que limiten su desarrollo, realizando ensayos con los siguientes: propionato de calcio, ácido fumárico, lisozima, nisina, combinado/s con el envasado en atmósfera modificada. El mejor resultado lo exhibió la nisina.

**Palabras clave:** conservantes, bacterias lácticas, microorganismos, vida útil, atmósfera modificada, sándwich.

## Abstract

Sandwich products are highly perishable, affected at a microbiological level by fungi and bacteria. The industry has invested in research into new technologies such as the use of preservatives and modified atmosphere packaging. The purpose of the study is to increase the useful life of sandwich products, through modified atmosphere packaging, where the product characteristics, both safety and quality, are maintained. The corresponding microbiological analyzes were carried out as established in the Argentine Food Code (CAA) in art. 156 tris and specifically those that are likely to alter its organoleptic characteristics, therefore, its quality. As a result, it was observed that the sandwiches maintain their organoleptic characteristics and no pathogenic microorganisms develop even after 28 days have passed since packaging; However, it is shown that the starting microbiological load of lactic bacteria is high and the conditions of the environment, such as the physicochemical characteristics of the product and packaging in a modified atmosphere, favor their development, under anaerobiosis conditions, generating their development under metabolism. fermentation of carbohydrates, which results in swelling of the container. This led to the use of preservative/s that limit its development, carrying out tests with the following: calcium propionate, fumaric acid, lysozyme, nisin, combined with modified atmosphere packaging. The best result was exhibited by nisin.

**Keywords:** preservatives, lactic bacteria, microorganisms, shelf life, modified atmosphere, sandwich.

## Introducción

Las industrias alimenticias en Argentina se encuentran en la búsqueda de un crecimiento continuo. Con el propósito de disminuir los costos de producción y el posicionamiento de sus productos en el mercado, las industrias han optado por la implementación de tecnologías, tales como uso de empaques especializados, estandarización de proceso y adición de conservantes para la mitigación de dichas problemáticas.

Las industrias de los alimentos se proponen avanzar en cuanto a las tecnologías de producción, que les brinden una diferenciación frente a la competencia, mejoras en cuanto a la calidad de los productos que ofrecen, optimización de los tiempos de producción, disminución de pérdidas donde incluimos la vida útil que influye de forma directa en su logística y del tiempo que disponemos para la llegada de los mismos al público, su venta y consumo, sin llegar a su caducidad por vencimiento, el cual, es el tiempo en el que aseguramos que mantiene su calidad y su aptitud microbiológica.

La investigación se centra en productos de sandwichería y el empleo de la tecnología del envasado en atmósfera modificada, y en nuestro caso aplicado a dos variedades de sándwiches, que son objeto de estudio de esta tesis:

Sándwich en pan inglés con fiambre cocido de pata de cerdo, queso danbo y mayonesa

Sándwich en pan inglés con jamón crudo, queso danbo, y mayonesa

De frente a la problemática planteada, el propósito es evaluar los efectos del envasado en atmósfera modificada en dichos productos, lo cual nos llevó a conocer sus características fisicoquímicas y microbiológicas en su punto de partida (elaboración) y su evolución en el transcurso del tiempo para determinar su vida útil.

En dicho sentido muchas técnicas se han desarrollado para preservar la vida útil y prevenir el deterioro causado principalmente por hongos y bacterias en productos alimenticios. La industria ha invertido en investigaciones para asegurar la inocuidad utilizando nuevas

tecnologías como lo es el uso de conservantes. Éstos se definen como: "Cualquier sustancia que no se consume normalmente como alimento por sí misma, cuya adición intencional al alimento es para un fin tecnológico" El principal propósito del uso de conservantes es aumentar la estabilidad del alimento, sin alterar la naturaleza del mismo (RTCA, 2005). Es por esto que se decidió evaluar el empleo de la combinación del envasado en atmósfera modificada y el uso de conservantes.

El objetivo general de la investigación es:

Determinar el aumento en la vida útil de los sándwiches en pan inglés con fiambre cocido de pata de cerdo, queso danbo y mayonesa, y de los sándwiches en pan inglés con jamón crudo, queso danbo y mayonesa, obtenido por los conservantes y el envasado en atmósfera modificada, analizando el efecto in vitro de diferentes niveles de conservantes en la inhibición de los hongos aislados y bacterias.

Los objetivos específicos fueron:

Aislar e identificar los hongos desarrollados en el pan inglés.

Analizar la influencia de las bacterias lácticas en el envasado en atmósfera modificada.

Es por esto que abordaremos en los próximos capítulos el estudio de los aditivos con función de conservantes, los cuales formarán parte de la presente investigación, para comprender el motivo de trasfondo de su aplicación y principalmente cómo actúan a nivel celular frente a microorganismos.

En cuanto a la metodología de desarrollo experimental, se propuso analizar los microorganismos exigidos dentro del marco legal donde se clasifican estos productos en el Código Alimentario Argentino (CAA), según el artículo 156 tris, como preparaciones culinarias, considerados agentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) y

específicamente, aquellos factibles de ser alterantes de sus caracteres organolépticos. Incluimos un breve resumen de los factores que facilitan y los factores que previenen la aparición de las ETAs en los procesos de elaboración de productos alimenticios.

Además, abordaremos el empleo de la atmósfera modificada y profundizaremos respecto porque favorece el desarrollo de las bacterias lácticas y qué beneficios trae consigo.

Finalmente estudiaremos las bacterias lácticas, y cómo actúan inhibiendo el desarrollo de microorganismos patógenos considerándose como método de bioconservación.

## Desarrollo

**Capítulo I:**  
**Aditivos Conservantes**

## **Nisina (INS 234)**

La única bacteriocina reconocida por la GRAS (Generally Recognited as Safety) desde 1988 y por la FDA (Food and Drug Administration) para utilizarse como conservante en alimentos es la nisina. La nisina fue aislada en 1928 y comenzó a utilizarse como antimicrobiano. Presenta una actividad antimicrobiana frente a un rango limitado de bacterias grampositivas, particularmente sobre aquellas formadoras de esporas. La molécula es acídica y por tanto exhibe su mayor estabilidad bajo condiciones ácidas. Es también más soluble a pH bajo. Este bio compuesto funciona como antibiótico de reducido espectro ya que tienden a dañar solo a aquellos microorganismos similares a las bacterias que los producen. La nisina es un antibiótico policíclico y peptídico, que se utiliza habitualmente como bio conservante, y es sintetizada de forma natural por *Lactococcus lactis* a partir de una fermentación en medio lácteo modificado. La molécula contiene una treintena de aminoácidos entre los que destacan, la lantionina, el B-metil lantionina, la metilantionina, la dehidroalanina y el ácido dehidroaminobutírico. (Sánchez Martín Almudena et al., 2019)

Las bacteriocinas son péptidos obtenidos de bacterias ácido lácticas con actividad antagonica contra algunas cepas relacionadas con la productora. Las bacteriocinas pueden servir como barreras bactericidas y ayudar a reducir el espectro de microorganismos que pudieran desarrollarse en el alimento.

Varias bacteriocinas poseen propiedades muy seguras para utilizarse en la conservación de alimentos, su utilización en la industria alimentaria disminuiría el uso de conservantes químicos y la intensidad de los tratamientos térmicos que permiten mantener los alimentos en buen estado, con ello se logran alimentos cuyas características organolépticas son mejores, así como sus propiedades nutricionales.

Ofrecen por lo tanto una alternativa muy satisfactoria a la creciente demanda por parte de los consumidores de obtener alimentos más frescos, seguros y listos para comer con un mínimo procesado.

Es un aditivo utilizado en la industria de alimentos como sustancia conservadora. Entre sus aplicaciones se encuentran, productos lácteos, productos procesados, comidas y platos principales, postres y helados, sopas, salsas y condimentos, jugos de frutas, en panadería, en guarniciones y acompañamientos, etc.

Actúa frente a las bacterias grampositivas, como *Clostridium ssp*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, y *Bacillus cereus*, lo que las hace muy interesantes como conservantes, por su potencial aplicación en la industria de alimentos como agentes naturales de conservación. Es estable en pH ácido y algo termosensible. El organismo la degrada y no produce resistencia cruzada con otros antibióticos, por lo que no es tóxica para las personas.

El efecto de distintos factores físico-químicos sobre la actividad de una bacteriocina no sólo tiene el fin de caracterizarla, sino también sirve para inferir su posible aplicación industrial, ya que las altas temperaturas y las amplias variaciones de pH son, entre otras, algunas de las condiciones que debe resistir una bacteriocina para ser útil como potencial agente inhibidor de microorganismos no deseados en procesos alimenticios como en fermentaciones de leche, la maduración de los quesos, el curado de encurtidos, etcétera.

La nisina es una sustancia ácida y es más estable en estas condiciones. Las soluciones de pH 2 son estables durante el almacenamiento prolongado entre 2-7 °C y pueden soportar el calentamiento hasta 121 °C sin pérdida de actividad. En condiciones alcalinas, la actividad se pierde y se destruye en 30 min. a 63 °C y pH 11. Hay una disminución parcial de actividad cuando se utiliza nisina en alimentos procesados debido al calentamiento.

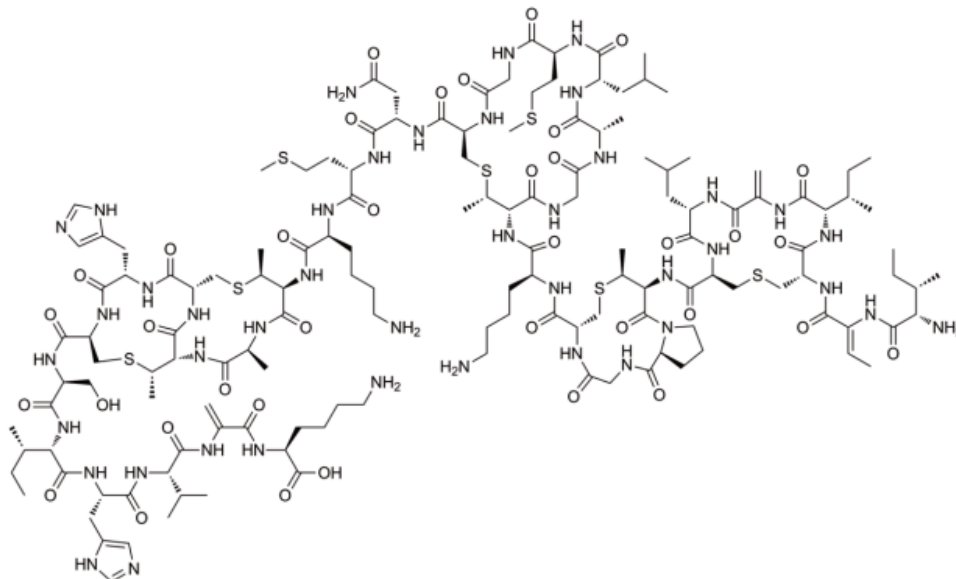
Las concentraciones de nisina empleadas normalmente en la conservación de alimentos son totalmente solubles en agua y en otros líquidos de procesamiento, pero no es soluble en disolventes no polares.

La nisina es un aditivo alimentario que actualmente está autorizado en la UE para varias categorías de alimentos, bajo el Anexo II del Reglamento (CE) 1333/2008. En el Panel de la EFSA (European Food Safety Authority) de Aditivos, Aromas, Coadyuvantes Tecnológicos y Materiales en Contacto con Alimentos, ya se evaluó su seguridad hace algunos años, con un consumo diario aceptable de 0,13 mg/kg de peso corporal. La discusión actual ha surgido debido a que la EFSA ha dado a conocer una serie de estudios científicos que evalúan la seguridad de la nisina y debido a que se han encontrado nuevos datos toxicológicos y ante la posibilidad de su uso a quesos no curados y productos cárnicos con tratamientos térmicos. Pero con estos nuevos antecedentes se han tenido en cuenta en un nuevo estudio de toxicidad subcrónica; y se ha concluido que la extensión de uso, que se ha propuesto además como aditivo para el queso no curado, a un nivel máximo de 12 mg/kg y para productos cárnicos con tratamiento térmico, a un nivel máximo de 25 mg/kg, no supone riesgo. (Sánchez Martín Almudena et al., 2019)

El suero lácteo es un subproducto de la industria láctea que puede utilizarse para producir la bacteriocina nisina A, usando la cepa nativa *Lactococcus lactis* UQ2. Su uso es específico para lácteos, pero luego se comprobó que también el uso de nisina en otro tipo de alimentos también era factible.

## **Figura 1**

*Estructura Química de la Nisina*



Nota. Extraído de (Sánchez Martín Almudena et al., 2019).

No tiene gran influencia sobre las bacterias gramnegativas y no tiene ninguna acción sobre hongos y levaduras. Las células vegetativas de ciertas bacterias grampositivas tienen una sensibilidad cambiante hacia la nisina, entre los que se encuentran microorganismos como *Bacillus*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Micrococcus* y *Streptococcus*. Puesto que las bacterias gramnegativas no son afectadas, el empleo de la nisina como conservador de alimentos no se puede contrarrestar con una mala higiene; ya que su escaso espectro antibacteriano y su estabilidad ácida determinan unas condiciones de aplicación diferentes. (Sánchez Martín Almudena et al., 2019)

Sólo puede emplearse cuando los microorganismos alterantes nisina-sensibles son prácticamente los únicos que están presentes en el alimento. Algunas especies de bacterias como *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Micrococcus* tienen una sensibilidad a la nisina expresada de manera distinta. La misma sensibilidad la tienen las especies formadoras de esporas *Bacillus* y *Clostridium*, lo cual juega el papel más decisivo para la determinación de la vida útil de productos alimenticios procesados térmicamente. También es termoestable especialmente en

condiciones de acidez; de aquí que la nisina se pueda emplear como coadyuvante del tratamiento térmico. El calor aplicado puede reducirse a sólo el necesario para destruir *Clostridium botulinum*, ya que es el anaerobio esporulado más nisina-resistente. Este menor tratamiento térmico mejora la calidad del producto y presenta mejores condiciones de almacenamiento, principalmente a altas temperaturas.

Cuando la legislación lo permite la nisina no sólo se emplea para prevenir el abombamiento de las latas sino también para conservar el chocolate con leche o el queso procesado, ya que la eficacia de la nisina ya está demostrada en los quesos tipo ricota en los que se determinó la eficacia de la nisina para controlar la invasión del alimento por *Listeria monocytogenesis*.

En un experimento en el que se prepararon los quesos a partir de leche no pasteurizada, se comprobó que en aquellos en los que se había añadido nisina como conservante el crecimiento de bacterias fue mucho menor que aquellos en los que no se habían añadido nisina.

Por tanto, la nisina presenta un efecto preservante para muchos productos. La estabilidad de la nisina en medio ácido hace posible realizar procesos térmicos de productos sin pérdidas visibles de la actividad preservadora.

La aplicación de la nisina se ha demostrado efectiva para la preservación de los siguientes productos:

Queso y preparaciones de queso procesado.

Productos como hongos que están enlatados.

Leche pasteurizada y esterilizada.

Postres de leche, que incluyan harinas, azúcar, crema o leche.

Es usada además en sopas en lata, productos de tomate enlatados, pimienta, espárragos, y otros vegetales enlatados.

Es un antibiótico muy efectivo contra las bacterias grampositivas, sobre las que actúa bloqueando sus membranas. (Sánchez Martín Almudena et al., 2019)

El modo de acción de una sustancia inhibidora frente a una célula sensible puede ser bacteriolítico, bacteriostático o bactericida. El primero implica la muerte celular seguida de una lisis, con la añadida disminución de la densidad óptica (DO). El modo de acción bactericida produce también muerte celular que se manifiesta en la disminución en el conteo de colonias, pero sin lisis y por consiguiente la densidad óptica se mantiene constante. El modo de acción bacteriostático no produce muerte celular, pero detiene el crecimiento, por lo cual, sin muerte celular, el conteo de colonias y la densidad óptica se mantienen constantes. (Sánchez Martín Almudena et al., 2019)

En la figura 2 puede observarse el efecto producido por el agregado de nisina. Se exhibe el modo de acción de la bacteriocina a pH 6.5, donde claramente se visualiza la disminución de la densidad óptica posterior al agregado de esta. Con la adición de nisina, el número de microorganismos presentes fue menor a 103 UFC/ml. De lo expuesto, se demuestra que el modo de acción de nisina sobre *L. fructivorans* a pH cercano a la neutralidad es bacteriolítico. Mientras que la figura 2b, muestra cómo el agregado de la bacteriocina provoca que las lecturas de densidad óptica (DO) se mantengan constantes en el tiempo de experimentación. Del recuento en placa se observa que el modo de acción de nisina sobre *L. fructivorans* a pH 3,5 es bactericida ya que el número de microorganismos disminuyó con el transcurso del tiempo. (Sánchez Martín Almudena et al., 2019)

De los estudios basados en las características catiónicas e hidrofílicas de la nisina, se ha demostrado que son dos los mecanismos que explican el modo de acción de la nisina sobre la permeabilización de la membrana celular:

1) las bacteriocinas actúan como un complejo de “poración” en el cual los monómeros de esta se unen, insertan y oligomerizan en la membrana citoplasmática para formar un poro.

2) las bacteriocinas desestabilizan la membrana a modo de un detergente.

Los resultados de muchos estudios tienden a apoyar el modelo de la formación de poros sobre el que propone una acción tipo detergente. En la figura 3, se resume el modelo que muestra el mecanismo de acción dual de la nisina de *Lactococcus lactis*. (Sánchez Martín Almudena et al., 2019)

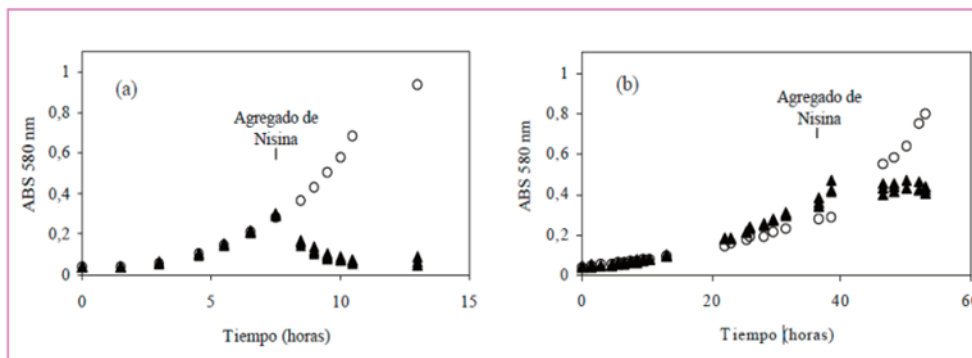
En el paso 1, la nisina posee una carga positiva que incrementa su interacción con las cargas negativas de los componentes de la pared celular.

En el paso 2, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular interfiriendo con su síntesis, lo que lleva a la bacteria a muerte celular.

En el paso 3, varias moléculas de nisina utilizan al lípido II para fijarse e insertarse en la membrana celular y empezar la formación de poros, con lo cual se produce en la muerte celular de la bacteria.

## **Figura 2**

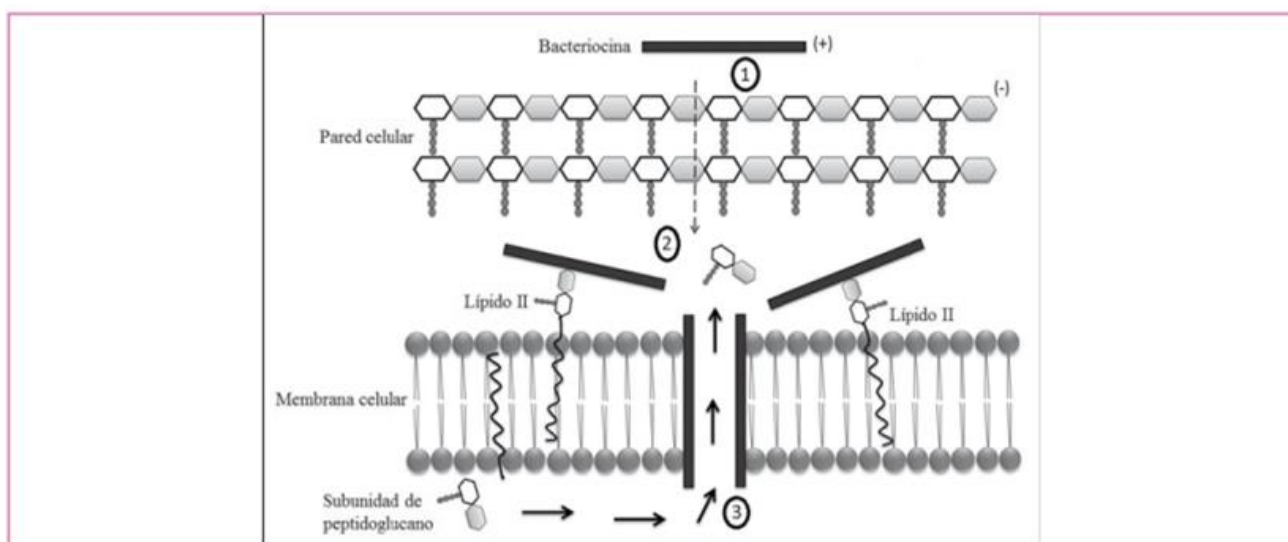
*Crecimiento de Lactobacillus Fructivorans a pH 6,5 (a) y 3,5 (b) sin el Biopreservador (o) y en Presencia de 2.000 ppm de Nisina*



Nota. Extraído de (Sánchez Martín Almudena et al., 2019).

### Figura 3

*Estudio del Modelo que Muestra el Mecanismo Dual de Actuación de la Nisina de Lactococcus Lactis*



Nota. Extraído de (Sánchez Martín Almudena et al., 2019).

Los resultados de los diferentes estudios demuestran que 2.000 ppm de nisina comercial tienen efecto bacteriolítico sobre *L. fructivorans* a pH 6,5, mientras que a pH 3,5 presenta un modo de acción bactericida.

El estudio del Panel de la EFSA de Aditivos, Aromas, Coadyuvantes Tecnológicos y Materiales en Contacto con Alimentos, ha concluido que la extensión de uso propuesta para la nisina como aditivo para el queso no curado, a un nivel máximo de 12 mg/kg y para productos cárnicos con tratamiento térmico a un nivel máximo de 25 mg/kg no supone ningún riesgo para la seguridad alimentaria. (Sánchez Martín Almudena et al., 2019)

## **Lisozima (INS 1105)**

Muchos son los trabajos que se han llevado a cabo para describir las distintas actividades biológicas de esta proteína como son su actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, analgésica, antitumoral y antioxidante. (Carrillo, 2013, pág. 314 a 321)

Su actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas es la actividad más ampliamente estudiada. Muchas investigaciones se han realizado para ampliar el espectro antibacteriano y poder atacar bacterias Gram-negativas.

La lisozima o muramidasa forma parte del grupo de las hidrolasas glucosídicas y cataliza la hidrólisis del enlace  $\beta$  (1-4) entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico de las paredes celulares de las bacterias (Jana et al., 2017). Su estructura primaria está formada por una cadena polipeptídica simple cuyo número de residuos de aminoácidos varía: 130 en la lisozima humana (hLyz) y 129 en la lisozima de pollo (cLyz) (Cao et al., 2015).

La lisozima se encuentra en muchos organismos como virus, insectos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, produciéndose en multitud de tejidos y fluidos, incluyendo huevos de aves, leche humana, lágrimas, saliva y es además secretada por leucocitos polimorfonucleares (Niyonsaba y Ogawa, 2005). En los humanos, la lisozima juega un rol muy importante en la defensa frente a las infecciones. En las lágrimas se encuentra en cantidades comprendidas entre 3.000 y 5.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y protege frente a bacterias y virus (Lesnierowski et al, 2007). En la saliva protege frente una gran variedad de microorganismos como bacterias, virus y hongos de diferentes especies de *Cándida* (Tenovuo, 2002; Samaranayake et al., 2008).

Se han descrito otras actividades a la lisozima de huevo como actividad antioxidante (Liu y col., 2006), actividad antiheparínica (Mega y col., 1994), actividad antifúngica, capacidad fusogénica con fosfolípidos y potenciación del efecto de antibióticos (Ibrahim y col., 2001).

La lisozima de huevo está catalogada como aditivo de uso alimentario con el código (E-1105). Vegetales frescos, pescado, carne, frutas, langostinos y otros alimentos han sido preservados por contacto de la superficie del alimento con la lisozima. Esta proteína también es usada para conservar otros alimentos como pepinillos Kimuchi, sushi y fideos chinos. Entre sus usos encontramos la protección en los quesos frente a bacterias dañinas como el *Clostridium tyrobutyricum* que provoca la hinchazón de los quesos. Varias patentes garantizan que la lisozima a bajas concentraciones controla el crecimiento de microorganismos en quesos durante más de 24 meses. Recientemente se han creado plásticos que contienen la lisozima adherida fuertemente a un biopolímero, estos biofilms son utilizados como conservantes por contacto del alimento con los biopolímeros (Mine y col., 2004).

La lisozima también está adquiriendo gran importancia en la elaboración del vino. El dióxido de sulfuro es comúnmente usado como conservante en enología. Actúa como un antioxidante para proteger de la oxidación a los compuestos fenólicos. Además, el SO<sub>2</sub> inhibe las oxidasas endógenas y previene la fermentación indeseable como fermentación acética y maloláctica. Se quiere reducir el uso de SO<sub>2</sub> por su efecto tóxico en la salud humana. Por ello se han establecido unos límites para añadirlo en la fabricación de los vinos. (Carrillo, 2013, págs. 314 - 321)

Se han realizado muchos estudios para desarrollar protocolos enológicos con aditivos alternativos que sustituyen al sulfito en las mencionadas funciones. Mundialmente se busca la fabricación de vinos libres de sulfitos. A partir de los años 1990 el uso de la lisozima de clara de huevo ha sido propuesto para el control de la fermentación maloláctica en la elaboración de los vinos, porque promueve la estabilización microbiana y previene el aumento de las concentraciones de ácido acético y aminas biógenas. Se ha demostrado que la lisozima previene el crecimiento de *Oenococcus oeni* y bacterias lácticas alterantes. De acuerdo con la legislación de la comunidad europea EC Nr 2066 se permite agregar 500 mg/L para vinos tintos y 250 mg/L

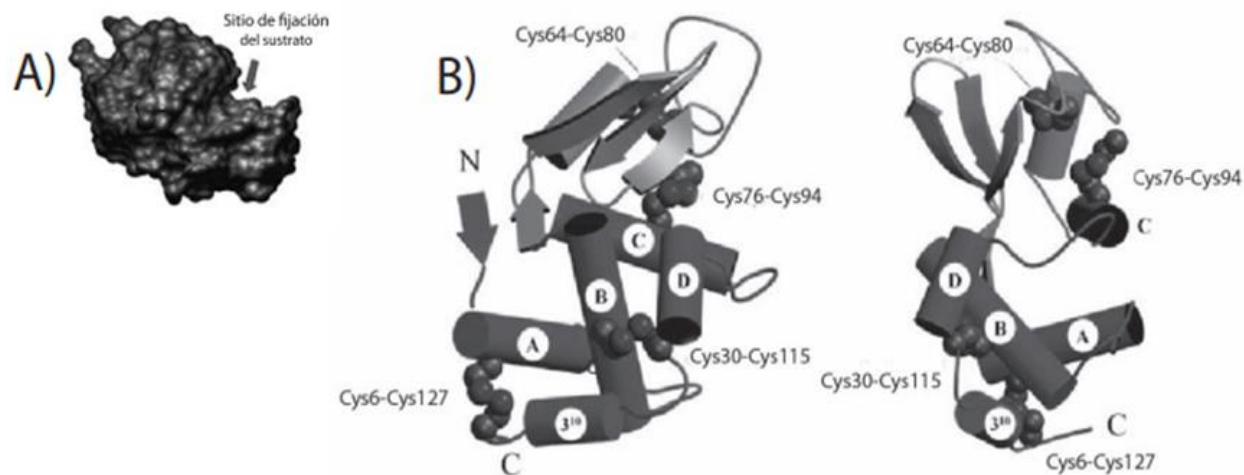
para los blancos (Sonni y col., 2009; Weber y col., 2009). Aunque en la industria del vino se utiliza para controlar el crecimiento de bacterias lácticas (*Oenococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*), tiene poca acción sobre las bacterias Gram-negativas (bacterias acéticas) y levaduras por lo que no puede reemplazar totalmente al anhídrido sulfuroso (Delfini y col., 2004; Tirelli y De Noni, 2007).

De todas las lisozimas existentes, la lisozima de huevo de gallina ha sido la más estudiada, por encontrarse en alta concentración (1-3 g/L de clara de huevo), su fácil manejo y la posibilidad de purificación por cristalización en NaCl al 5% a pH 9,5. La lisozima de huevo es una proteína que puede representar cerca del 3,4% de las proteínas de la clara de huevo. Su masa molecular es 14.307 Da y está compuesta por una secuencia de 129 residuos de aminoácidos. Es una proteína muy catiónica, con un elevado punto isoeléctrico ( $pI = 10,7$ ), con 19 aminoácidos en su secuencia cargados positivamente. Posee cuatro puentes disulfuro que le confieren una alta estabilidad, en ellos se encuentran las ocho cisteínas presentes en la molécula (You y col., 2010).

La lisozima es de la clase de enzimas que destruye las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas por ruptura del enlace  $\beta$  (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina del peptidoglicano (NAG) [Figura 5], debilitando así la pared celular. El resultado es la penetración de agua en la célula que se hincha y acaba por estallar, un fenómeno denominado lisis [Figura 6]. (Carrillo, 2013, pág. 314 a 321)

#### **Figura 4**

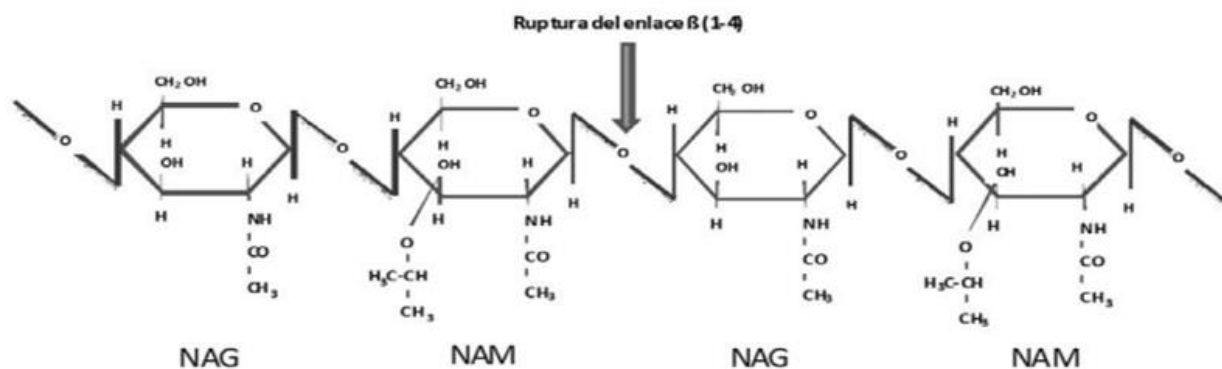
*Estructura de la Lisozima de Huevo*



Nota. A) Estructura tridimensional donde se observa la hendidura de fijación del sustrato. B) Representación MOLSCRIPT de la lisozima nativa. Las hélices están representadas como cilindros. Los puentes disulfuro del dominio  $\alpha$  son: (Cys6 - Cys127 y Cys30 - Cys115). Los otros puentes disulfuro son Cys64-Cys80, localizado en el dominio- $\beta$ , y Cys76 - Cys94, se encuentra entre los dos dominios. Extraído de (Van den Berg y col., 1999).

### Figura 5

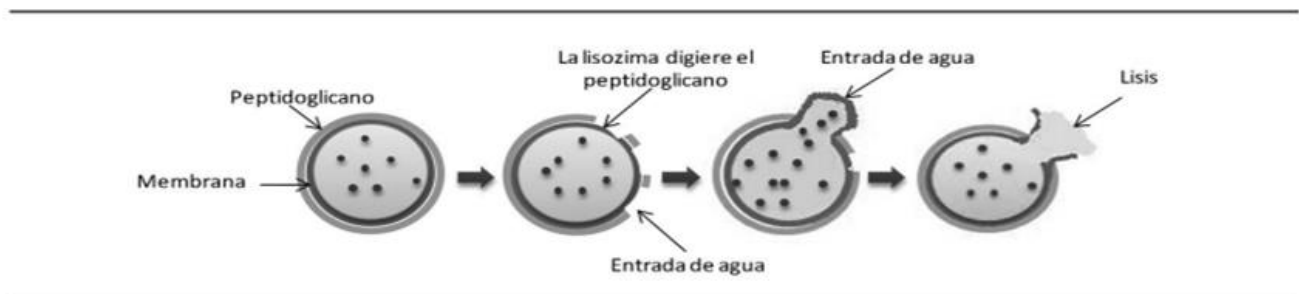
*Estructuras Repetitivas del Peptidoglucano de la Pared Celular de Bacterias. Se Muestra el Sitio de Corte de la Lisozima*



Nota. Extraído de (Carrillo, 2013, pág. 317)

### Figura 6

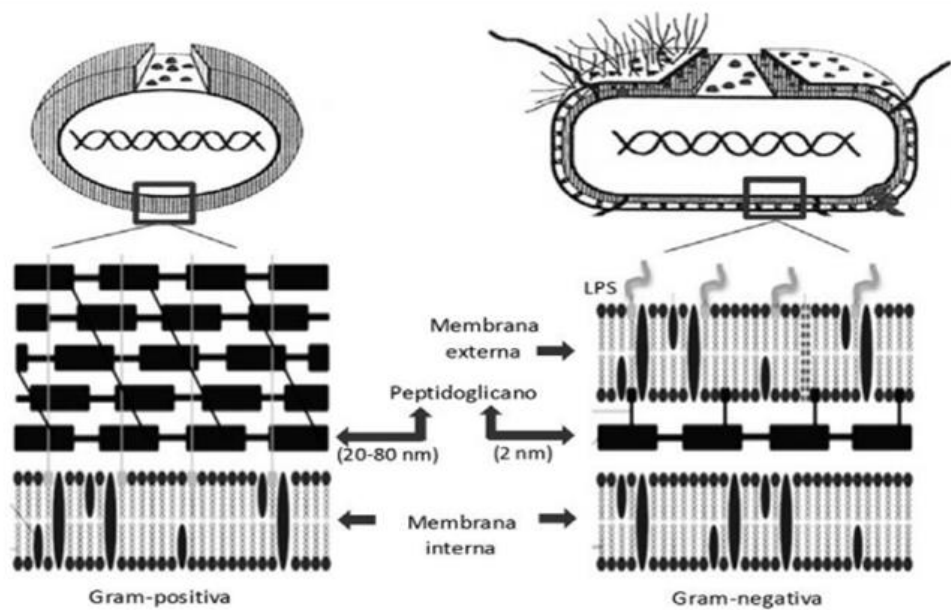
*Formación de Protoplastos: en una Solución Diluida, la Rotura de la Pared Libera el Protoplasto que Inmediatamente se Liza al ser muy Débil la Membrana Citoplasmática*



Nota. Extraído de (Carrillo, 2013, pág. 317))

### Figura 7

*Comparación de la Estructura de Paredes Celulares de Bacterias Gram – Positiva (Izquierda) y Gram – Negativa (Derecha)*



Nota. A) Morfología de las células. B) Corte sobre la estructura morfológica (Imagen tomada y modificada de Ibrahim y col., (2002)).

La lisozima es casi inactiva frente a microorganismos Gramnegativos por la dificultad de acceder al peptidoglicano que se encuentra protegido por la membrana externa. Esta propiedad de hidrolizar el peptidoglicano se conoce como actividad neuraminidasa o muramidasa (Ibrahim y col., 2002). También es importante destacar que en las bacterias Grampositivas el peptidoglicano representa alrededor del 90 % de la pared celular, mientras que en las Gramnegativas apenas abarca el 10 %. (Carrillo, 2013, págs. 314 - 321)

Durante la lactación, la lisozima protege a los bebés frente a infecciones respiratorias y gastrointestinales. La exposición a las bacterias en los neonatos ocurre en el tracto gastrointestinal, la mucosa intestinal no contiene normalmente fagocitos o células inmunológicamente maduras, por ello tiene que existir un sistema de defensa del organismo. En el momento del desarrollo del sistema inmune, la leche materna aporta al neonato entre 0,3-0,5 g/L de lisozima proporcionando de esta manera una importante defensa frente a los microorganismos. Es sabido que la lisozima de la leche humana juega un papel importante en el sistema inmune de los recién nacidos. Rosenthal y Lieberman (1931) fueron los primeros en describir la importancia de la lisozima en la flora intestinal de los recién nacidos y lactantes. Estos autores observaron que el tracto intestinal del recién nacido libre de bacterias en el momento del nacimiento, era invadido, en un corto periodo de tiempo, por los microorganismos del medio ambiente. Esta flora inicial desaparece al tercero o cuarto día en los lactantes alimentados en forma natural y es reemplazada por una flora en la cual predomina el *Lactobacillus bifidus*. En los niños alimentados en forma artificial no sucede lo mismo, desarrollándose una flora microbiana intestinal muy variada y sin predominio de ninguna especie determinada. Estos investigadores además encontraron lisozima sólo en las deposiciones de los niños alimentados naturalmente, concluyendo que esta enzima se encuentra en mayor cantidad en la leche humana

que en la leche de vaca (fórmulas infantiles) y que atraviesa el tracto intestinal, sin ser destruida por el jugo gástrico ni por las secreciones intestinales. En los recién nacidos el pH gástrico es mayor que el de los adultos y se encuentra en valores de pH 4,0. Al ser menos ácido el pH, la acción de la pepsina se ve reducida, lo que puede favorecer el paso a la circulación de proteínas intactas.

Los huevos de gallina se incluyen como uno de los “grandes ocho” alimentos más alergénicos, siendo el ovomucoide (OM) y la ovoalbúmina (OVA) los ejemplos más típicos de proteínas de huevo con potencial alergénico. Sin embargo, aunque no se haya estudiado en profundidad, la lisozima (Gal d4, 14 KDa, 3,5%) es también uno de los principales alérgenos de clara de huevo y se han descrito reacciones clínicas a la lisozima y con frecuencia se han encontrado anticuerpos IgE anti-lisozima en los pacientes alérgicos de huevo como marcadores de sensibilización.

En la industria alimentaria se utilizan muchas proteínas como aditivos o conservantes ya sea por sus propiedades funcionales como capacidad espumante o por sus propiedades biológicas como la capacidad antibacteriana. (Carrillo, 2013)

Muchos derivados del huevo son utilizados para estos fines, entre estos derivados se encuentra la lisozima de clara de huevo de gallina, la cual está catalogada y aceptada como aditivo de uso alimentario en muchos países por su comprobada actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas. Por ejemplo, en la Unión Europea, está permitido su uso en la fabricación de quesos (Directiva Europea Nº 95/2/EC), en la que se establece que se puede utilizar entre 50 y 350 mg de lisozima por kg de queso. La adición de estos conservantes en los alimentos puede conducir a reacciones alérgicas especialmente en personas ya sensibilizadas. Incluso cantidades comprendidas entre 1 y 2 mg de lisozima de huevo pueden producir reacciones en personas muy sensibles. Estos alérgenos ocultos son un problema común en la

seguridad alimentaria que se conoce desde hace muchos años y que además puede estar contribuyendo a la prevalencia de las alergias alimentarias (Weber y col., 2007; 2009).

La lisozima de clara de huevo tiene un 60% de homología con la lisozima de leche humana y comparten la resistencia a las enzimas proteolíticas. El proceso de la digestión juega un papel importante en la sensibilización alérgica. Saber qué les sucede a los alérgenos alimentarios en el tracto gastrointestinal (fragmentación, absorción, biodisponibilidad y conjugación con otras proteínas) es importante para el conocimiento del mecanismo que subyace en las alergias. Un gran número de alérgenos alimentarios son estables en condiciones que simulan la digestión gastrointestinal in vivo. Entre estas proteínas hay ciertas características comunes, se asume que tienden a ser proteínas mayoritarias en los alimentos, resistentes a la digestión y estables a los tratamientos de procesado, sobre todo al tratamiento térmico (Taylor y Lehrer, 1996).

Un modelo dinámico descrito en la literatura es el modelo intestinal descrito por Moreno y col. (2005). Este modelo analiza cómo afecta la estructura del alimento en la liberación de alérgenos en el tracto gastrointestinal, su estabilidad y su degradación en el lumen intestinal. También es importante tener en cuenta las interacciones de las proteínas con otros componentes. Las asociaciones lípido-proteína podría ejercer un efecto protector frente a la digestión, puesto que absorción de la proteína en la interfase aceite/agua origina cambios en la conformación que hacen que algunos enlaces susceptibles no sean accesibles al ataque enzimático. Por ejemplo, Mandalari y col (2009) encontraron que el surfactante biológico fosfatidilcolina (secretado por el estómago y también presentes en las sales biliares) interfiere con la degradación del alérgeno  $\alpha$ -lactoglobulina. Además, hay que tener en cuenta que un 30% de los lípidos de la yema de huevo son fosfolípidos, de los cuales un 80% es fosfatidilcolina (Thomas y col., 2007).

La industria alimentaria también se ve afectada, por la contaminación de alimentos. Este hecho genera pérdidas millonarias anualmente. Por ello la industria alimentaria busca agentes antimicrobianos eficaces. En la actualidad, existe mucho interés por los agentes antimicrobianos de origen natural, debido a que por lo general presentan baja toxicidad, amplio espectro microbiano y su obtención es económica. Por ejemplo, desde hace décadas en la industria alimentaria se utilizan como conservantes la nisina una bacteriocina y la lisozima de huevo (Pellegrini y col., 2003 b).

Los factores más importantes que se tienen en cuenta para considerar la selección de un agente antimicrobiano incluyen: (1) el espectro antimicrobiano y las propiedades fisicoquímicas del compuesto; (2) la seguridad del compuesto que se pretende usar; y (3) el tipo de microorganismo al que se ataca. Considerando todos estos factores muchas veces se necesita más de un agente antimicrobiano. Para ello se pueden combinar compuestos que por efecto sinérgico potencien su actividad. Por tanto, cualquier hecho que permita potenciar la especificidad de un agente antimicrobiano seguro que logre actuar sobre un amplio espectro de bacterias, puede considerarse como una importante contribución a la biotecnología moderna, en la lucha contra la resistencia de los microorganismos (Ibrahim y col., 2002).

Los péptidos antimicrobianos representan un antiguo sistema de defensa en un gran rango de organismos como son: mamíferos, aves, anfibios, crustáceos, peces, insectos, plantas y microbios (Bacheré, 2003; Tomma y col., 2003). Algunos péptidos antibacterianos son producidos habitualmente por el organismo mientras que otros son sintetizados como respuesta a un ataque microbiano (Gallo y col., 2002). La rápida disponibilidad de estos péptidos es importante para el sistema inmune innato, ya que su alta efectividad les pone en primera línea de defensa en el organismo. Los péptidos antimicrobianos son capaces de matar a un gran rango de células y microbios incluidas las bacterias, hongos, protozoos, virus, células tumorales y algunos parásitos (Vizioli y Salzet, 2002 a y b). Muchas de estas moléculas exhiben mecanismos

de acción altamente complejos y distintos. Estos péptidos tienen mayor afinidad por los microorganismos que por las células de mamíferos, siendo así sustancias que no son tóxicas para los tejidos. Se ha descrito que los péptidos antimicrobianos logran distinguir entre los tejidos infectados por patógenos acumulándose en esos sitios. Dentro de las características que comparten estas moléculas se encuentran la conservación de la estructura y la carga. Se ha visto que los péptidos antimicrobianos a pH fisiológico son anfipáticos y con carga neta catiónica. Se considera que los péptidos antimicrobianos comparten ciertos parámetros estructurales como son la conformación, carga, hidrofobicidad, momento hidrofóbico, anfipaticidad y ángulo polar. Todas estas características permiten seleccionar posibles péptidos con actividad antibacteriana (Epanand y Vogel, 1999; Yeaman y Yount, 2003).

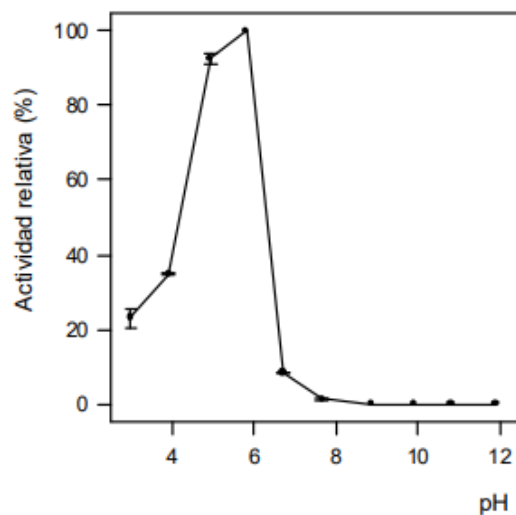
La lisozima de clara de huevo es una de las proteínas alimentarias utilizada en la industria para diferentes fines por su demostrada actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas y su actividad antiviral. Es utilizada en la industria farmacéutica, alimentaria, en veterinaria, en medicina y en la industria cosmética. Muchas modificaciones de la proteína permiten ampliar su espectro antibacteriano logrando así afectar a bacterias Gram-negativas. Se ha demostrado que el tratamiento térmico de la proteína a pH 6 potencia su actividad antibacteriana. Los mismos resultados se han conseguido con modificaciones químicas reduciendo sus puentes disulfuro, con modificaciones genéticas e hidrólisis enzimática. Esta nueva actividad es independiente de la actividad muramidasa. Por todo lo anterior, la lisozima se ha convertido en una molécula con muchas posibilidades de uso en la industria alimentaria. La Unión Europea ha reglamentado su uso en la elaboración de vinos y en la fabricación de quesos. Sin olvidar de ninguna manera su capacidad alergénica en personas sensibilizadas y los posibles riesgos que conlleva para estas personas consumir alimentos que contengan lisozima. (Carrillo, 2013)

**Tabla 1***Características de la Lisozima de la Almeja Tivela stultorum*

Peso molecular	17.0 kDa
Punto isoeléctrico	7,7
pH óptimo	5,5 - 5,8
Temperatura óptima	40°C
Molaridad óptima del amortiguador citrato fosfato	0,1 M
Fuerza iónica de máxima actividad	0,1043*
Actividad a 4°C	26,70%
Actividad a 85°C	10,40%
Actividad a pH de 2,8	24,30%
Rango de estabilidad a diferentes pHs a 4°C	2,8 - 7,8
Actividad específica en relación con la lisozima de huevo de gallina	6 veces mayor

\*Cantidad equivalente a 0,08 M amortiguador citrato fosfato.

Nota. Extraído de (Ortega Montenegro & Viana, 1999, pág. 238)

**Figura 8***Actividad Relativa Residual de la Lisozima de Tivela stultorum en Función del pH*

Nota. Extraído de (Ortega Montenegro & Viana, 1999, pág. 238). El 100% de actividad se consideró la actividad máxima observada. El error estándar está indicado en cada uno de los valores promedio (temperatura 37°C, molaridad = 0,08).

## Ácido Fumárico (INS 297)

El ácido fumárico (ácido trans-butenodioico; PM 116,07 g/mol) es un sólido blanco poco soluble en agua y fácilmente analizable por LC-DAD por su alta respuesta en el UV debido al doble enlace. Dosis de hasta 600 mg/L de ácido fumárico no se detectan sensorialmente en pruebas triangulares. (Morata, y otros, 2020)

El ácido fumárico como una molécula disruptiva, que ha sido aprobada por la OIV como inhibidor microbiológico. Es utilizada en la industria alimentaria y tiene un efecto potente en el control de las bacterias lácticas. Se trata de una molécula de origen natural, cuyo doble enlace favorece que tenga mucha respuesta en el ultravioleta y sea de fácil análisis espectroscópico. (Morata, El uso del ácido fumárico como inhibidor microbiológico, 2021)

Según la resolución de la OIV-OENO 581A-2021\* ya está permitido su uso como tratamiento para el control y la inhibición de la fermentación maloláctica (FML). Hay, además, otra resolución que permitiría utilizarlo como acidificante (aprobada como tal en el Codex Alimentarius) pero todavía está en fase de estudio por la OIV. Con la resolución aprobada, lo que se buscaba es utilizarlo como aditivo para inhibir la FML mediante el control del crecimiento de las bacterias lácticas responsables de la FML. También hay otros objetivos como la preservación de la acidez málica o la reducción de la dosis de SO<sub>2</sub>. Históricamente, en la elaboración de tintos se ha promovido la fermentación maloláctica porque mejora la estabilidad del producto. La inhibición de la FML abre la posibilidad de obtener un vino tinto estable sin necesidad de hacer esa fermentación. (Morata, El uso del ácido fumárico como inhibidor microbiológico, 2021)

El ácido fumárico es acidificante y a bajas dosis inhibitorias para la FML, de 0,2-0,3 mg/L, se puede rebajar el pH en una décima. (Morata, El uso del ácido fumárico como inhibidor microbiológico, 2021)

El ácido láctico ejerce un papel parecido al ácido fúmárico, ya que a dosis de 2 g/L no inhibe la FML, pero a dosis de 4 g/L o más, sí la inhibe. El conferenciante hace referencia a un estudio que están llevando a cabo sobre la acidificación biológica con levaduras, con el uso de, por ejemplo, *Lachancea thermotolerans*, capaces de producir niveles altos de ácido láctico durante la fermentación alcohólica por lo que tienen un efecto en el pH y en lo sensorial, y con capacidad de bloquear la FML. (Morata, El uso del ácido fumárico como inhibidor microbiológico, 2021)

También se utiliza el SO<sub>2</sub> para detener la FML, pero su efecto decae a lo largo del tiempo. Por ello es interesante el uso del ácido fumárico como molécula que permite reducir el exceso de sulfuroso. Puede interesar inocular la fermentación maloláctica y una vez transcurrido un 20% de la misma, en la que se ha degradado 0,5 g de málico, añadir 600 mg/L de ácido fumárico, que detiene por completo la fermentación. (Morata, El uso del ácido fumárico como inhibidor microbiológico, 2021)

A continuación, se referencia un ensayo realizado a gran escala en bodega: tras analizar vinos de la Rioja con dosis de 600 mg/L de ácido fumárico se comprobó la imposibilidad de que realizasen la FML. También se trabajó con vinos tintos de Uruñuela y de Fuenmayor con 1g/hL de cepas de *Oenococcus oeni alpha*, con el resultado de que se podía controlar la FML y mantener valores de acidez muy bajos con preservación de la acidez málica. El ensayo se hizo también con vinos rosados de zonas cálidas. (Morata, El uso del ácido fumárico como inhibidor microbiológico, 2021)

Los datos sobre el comportamiento del ácido fumárico como agente acidificante son: a concentraciones de 1 a 3 g/L no se percibe acidez alguna, pero a partir de 4 g/L, la acidez ya hace acto de presencia. (Morata, El uso del ácido fumárico como inhibidor microbiológico, 2021)

En definitiva, las conclusiones son que el ácido fumárico controla la FML y las bacterias lácticas, lo que permite preservar la acidez málica; que puede reducir el pH en algunas décimas y con niveles más bajos de acidez volátil; que permite conseguir vinos más estables sin realizar FML; que mejora el frescor y la estabilidad físico-química y microbiológica; y controla las malolácticas no deseadas en vinos espumosos. (Morata, El uso del ácido fumárico como inhibidor microbiológico, 2021)

Constituyen una alternativa interesante y más eficaz que la lisozima para evitar pérdidas de acidez y frescura en los vinos por desarrollo indeseado de la FML. El ácido fumárico además tiene un ligero efecto acidificante a las dosis que se recomiendan como inhibidor de la FML. Dosis de hasta 600 mg/L de ácido fumárico son difíciles de detectar sensorialmente. (Morata, y otros, 2020)

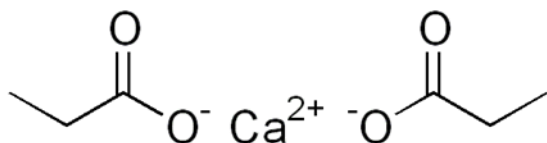
## Propionato de Calcio (INS 282)

Sal cálcica del ácido propanoico, recogido en el Codex Alimentarius con el código de E-282.

Tiene la fórmula química  $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_5\text{COO})_2$ . Se obtiene de forma industrial a partir de ácido propiónico y óxido de calcio. (pochteca, s.f.)

### Figura 9

*Estructura Química del Propionato de Calcio*



Nota. Extraído de (Wikipedia, 2007)

Las sales propiónicas, neutralizadas con hidróxido de calcio para formar propionato de calcio, bajo el código 282, son comúnmente usadas como agentes antimicrobianos. Según Codex Alimentarius (2015) su uso no es restrictivo, éste depende de las buenas prácticas de manufactura. Es reconocido como inocuo donde a concentraciones desde 0.075% hasta 3.75% no hay residuos dañinos en el cuerpo (Drozen 2004), ni cambios en las características sensoriales del alimento. La acción del propionato sobre los hongos es efectiva y es generalmente usado en productos con levaduras ya que la acción contra éstas es mínima, su límite sugerido es 2000 mg/kg (Branen et al. 2002).

Es un ácido graso de cadena corta y las sales se usan como conservantes especialmente en panadería. Es uno de los más efectivos contra mohos y de baja efectividad contra levaduras y bacterias. Se utiliza especialmente en sales, ya que, el ácido tiene un olor muy fuerte y su costo es económicamente sustentable. (Soto, 2015) Es soluble en agua y en etanol. Es estable a

temperatura ambiente y se degrada lentamente a temperaturas superiores a 120 °C. (quimicaindustrial.cl)

Es un inhibidor de moho elaborado con alta tecnología cuyas propiedades garantizan una buena protección contra mohos y crecimiento microbiano, su actividad se potencializa a un pH 5, sin embargo, funciona a niveles más altos de pH. (Soto, 2015)

Es un polvo fino de gránulos de tamaño medio, color blanco, sin sabor y con un olor muy fuerte. Su función es actuar como conservante al evitar que los microorganismos produzcan la energía que necesitan para funcionar, aunque a diferencia de los benzoatos, no requieren un entorno ácido para que ejerzan su función. (pochteca, s.f.)

Al igual que el propionato de sodio, el propionato de calcio es muy efectivo previniendo que los bacilos que producen la filamentación y los hongos se desarrollen. Aunque, su mecanismo de acción no inhibe la acción de la levadura utilizada para panificación. (pochteca, s.f.)

**Capítulo II:**  
**Microorganismos de Interés**

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos son provocadas por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos o parásitos, o por las sustancias tóxicas que estos producen. (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2022)

Las bacterias y los virus son los agentes etiológicos más comunes. (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2022)

Una gran variedad de alimentos puede ocasionar ETA: las carnes crudas (vacuna, ave o cerdo), leche sin pasteurizar, huevos crudos, mariscos, frutas y verduras pueden contaminarse en el campo debido a malas prácticas. Las conservas mal pasteurizadas o esterilizadas también pueden ocasionar ETA. Hasta el agua si llegase a estar contaminada (por ejemplo, por cólera). (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2022)

### **Grupos Vulnerables o de Riesgo**

Existen grupos como los niños, los ancianos y las mujeres embarazadas que, por su baja resistencia a las enfermedades, son especialmente vulnerables. En estos casos las precauciones deben extremarse, pues las consecuencias de las ETA pueden ser severas, dejar secuelas e incluso hasta provocar la muerte. (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2022)

### **Síntomas Generales**

Los síntomas de las ETA pueden durar algunos días e incluyen vómitos, dolores abdominales, diarrea y fiebre. También pueden presentarse síntomas neurológicos, ojos hinchados, dificultades renales, visión doble, etc.

La duración e intensidad de los síntomas varía de acuerdo a la cantidad de bacterias o toxinas presentes en el alimento, a la cantidad de alimento consumido y al estado de salud de la persona, entre otros factores. (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2022)

Para las personas sanas, las ETA son enfermedades pasajeras, que sólo duran un par de días y sin ningún tipo de complicación. (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2022)

## **Clasificación de las bacterias según la composición de su pared celular**

### ***Bacteria Gram positiva***

#### **Pared celular de las bacterias Gram positivas**

La envoltura celular de las bacterias grampositivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglucano, que rodea a la anterior. La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico. La capa de peptidoglucano confiere una gran resistencia a estas bacterias y es la responsable de retener el tinte durante la tinción de Gram. A diferencia de las bacterias gram positivas, las gram negativas presentan una segunda membrana lipídica externa a la pared celular. (Ghuysen & Hakenbeck, 1994)

Incluyen especies tanto móviles (vía flagelos) como inmóviles con forma de bacilo (*Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria*) o coco (*Staphylococcus*, *Streptococcus*); con gruesas paredes celulares o sin ellas (*Mycoplasma*). Algunas especies son fotosintéticas, pero la mayoría son heterótrofas. Muchas de estas bacterias forman endosporas en condiciones desfavorables. Realmente, no todas las bacterias del grupo son grampositivas (no se tiñen por la aplicación de ese método), pero se incluyen aquí por su similitud molecular con otras bacterias grampositivas. (Ghuysen & Hakenbeck, 1994)

La célula bacteriana está rodeada por una envoltura que, observada al microscopio electrónico, se presenta como una capa gruesa y homogénea, denominada pared celular. Luego en sección (corte) se observa una estructura semejante a dos líneas paralelas separando una capa menos densa; esto corresponde a la membrana plasmática. Entre la membrana plasmática y la pared celular se encuentra el periplasma o espacio periplasmático. En el interior de la membrana plasmática se encuentra el citoplasma que está constituido por una disolución acuosa,

el citosol, en el cual se encuentran ribosomas y otros agregados de macromoléculas, y en el centro se ubica la zona menos densa llamada nucleoide, que contiene una madeja de hebras difícil de resolver (distinguir) y cuyo principal componente es el ADN. (Ghuysen & Hakenbeck, 1994)

La pared externa de la envoltura celular de una bacteria grampositiva tiene como base química fundamental el peptidoglicano, que es un polímero de N-acetilglucosamina, unido en orientación  $\beta$ -1,4 con ácido N-acetilmurámico, a este se agregan por el grupo lactilo cuatro o más aminoácidos. Esta molécula se polimeriza gran cantidad de veces, de modo que se forma una malla especial, llamada sáculo de mureína. Dicho compuesto es de vital importancia para conservar la forma y darle rigidez a la célula bacteriana (si este compuesto no existiese, la célula reventaría debido a su gran potencial osmótico). (Dale Brock, Madigan, Martinko, & Parker, 2005)

Las siguientes características están presentes generalmente en una bacteria grampositiva:

Membrana citoplasmática.

Capa gruesa de peptidoglicano.

Ácidos teicoicos y lipoteicoicos, que sirven como agentes quelantes y en ciertos tipos de adherencia.

Polisacáridos de la cápsula.

Si algún flagelo está presente, este contiene dos anillos como soporte en oposición a los cuatro que existen en bacterias Gram negativas porque las bacterias gram positivas tienen solamente una capa membranal. (Dale Brock, Madigan, Martinko, & Parker, 2005)

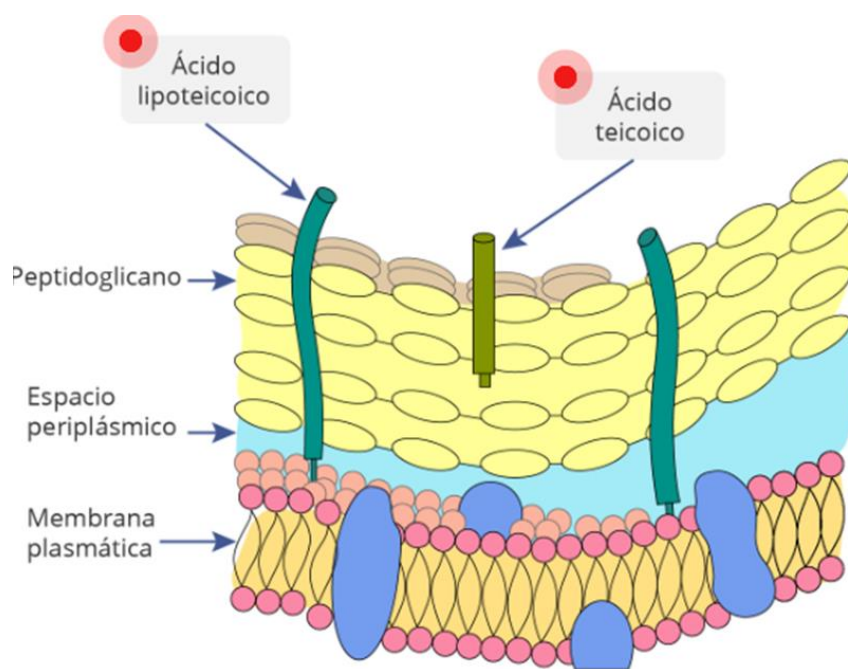
Tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas pueden presentar una capa superficial cristalina denominada capa S. En las bacterias Gram negativas, la capa S está unida

directamente a la membrana externa. En las bacterias Gram positivas, la capa S está unida a la capa de péptidoglicano. Es único a las bacterias Gram positivas la presencia de ácidos teicoicos en la pared celular. Algunos ácidos teicoicos particulares, los ácidos lipoteicoicos, tienen un componente lipídico y pueden asistir en el anclaje del péptidoglicano, en tanto el componente lipídico sea integrado en la membrana. (Dale Brock, Madigan, Martinko, & Parker, 2005)

Además, la pared celular de las bacterias Gram positivas contiene ácidos teicoicos que están compuestos, principalmente, por un alcohol (glicerol o ribitol) y fosfato. Existen dos clases de ácidos teicoicos en la pared celular de las bacterias Gram positivas:

### Figura 10

#### *Envoltura de Gram Positivo*



Nota. Extraído de (Morales Rodriguez, 2018)

La pared celular bacteriana Gram positiva se compone de tres capas principales.

1. La membrana citoplasmática.

2. Una capa fina de peptidoglicano, situada en el espacio periplásmico.
3. Una membrana externa que contiene lipopolisacáridos y proteínas porinas.

Membrana citoplasmática: rodea el citoplasma de las bacterias gram positivas y gram negativas y regula el paso de las moléculas hacia el interior y hacia el exterior de la bacteria.

Peptidoglicano: el peptidoglicano de la pared celular gram negativa es una malla fina (5 nm a 10 nm) de unidades repetidas que contienen azúcares y aminoácidos.

El espacio periplásmico: se encuentra entre la membrana externa y la citoplasmática. Se compone de una matriz parecida a un gel que contiene una amplia variedad de proteínas importantes para distintas funciones celulares.

La membrana externa protege a la bacteria y actúa como barrera contra ciertos antibióticos. En la membrana externa encontramos:

Proteínas porinas: penetran la membrana externa de las bacterias Gram negativas, formando poros que permiten la difusión pasiva de las moléculas hidrofílicas entre la bacteria y el exterior.

Lipopolisacáridos son específicos de la capa más superficial de la membrana externa. Tiene carga negativa, lo que contribuye a mantener la forma de la bacteria.

Lipopolisacáridos son famosos por su potencial de causar shock tóxico en el huésped infectado.

### ***Bacteria Gram negativa***

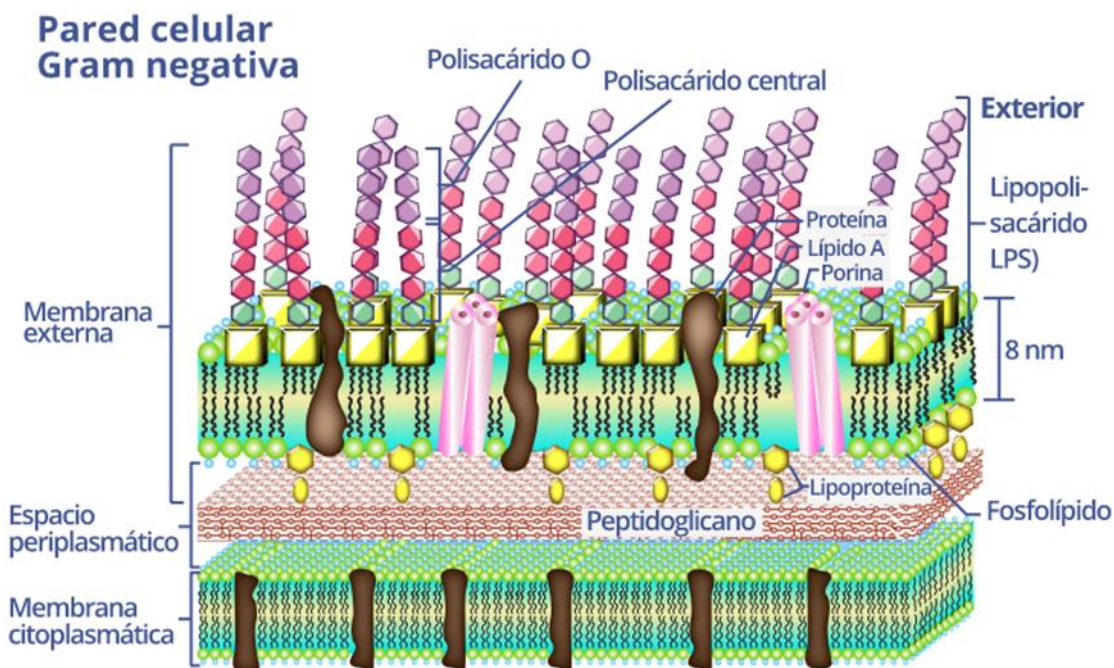
#### **Pared celular de las bacterias Gram negativa**

La estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativa es más compleja, desde el punto de vista estructural y químico. Está conformada por la membrana citoplasmática y por fuera encontramos una delgada capa de peptidoglucano (que representa entre un 5% y un 10% del peso de la pared celular). (Morales Rodriguez, 2018)

En la parte externa de la capa de peptidoglucano se encuentra la membrana externa, la cual sólo se encuentra en las bacterias Gram negativa.

## Figura 11

### *Envoltura de Gram Negativo*



Nota\*. Extraído de (Morales Rodriguez, 2018)

El espacio periplásmico es la zona comprendida entre la superficie externa de la membrana citoplásmica y la superficie interna de la membrana externa. En este espacio se encuentran diversas enzimas hidrolíticas, muy importantes para la degradación y metabolización de las macromoléculas de gran tamaño. (Morales Rodriguez, 2018)

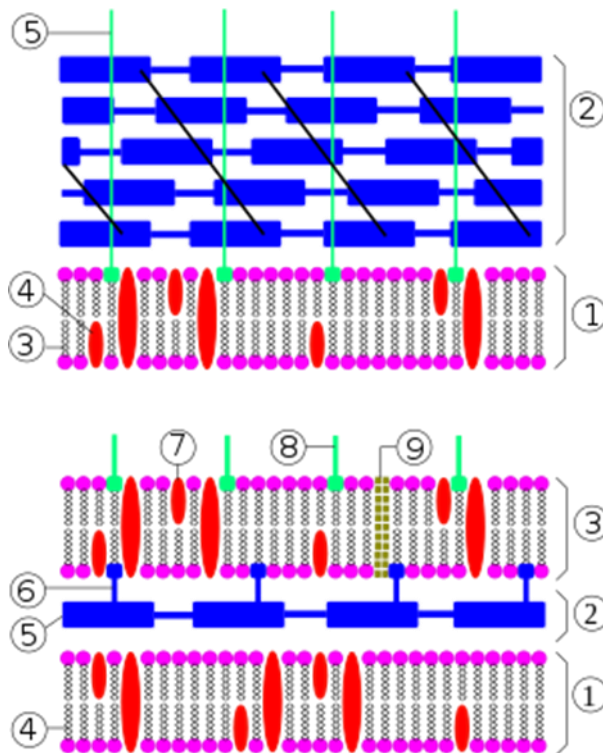
La membrana externa está compuesta por una bicapa, cuya hoja interna tiene una composición similar a la de la membrana celular, la hoja externa contiene constituyentes diferentes dentro de los cuales encontramos a los lipopolisacáridos. Posee conductos especiales formados por proteínas denominados porinas, que permiten la difusión pasiva de compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular, como azúcares, aminoácidos y ciertos iones. (Morales Rodríguez, 2018)

### ***Comparación pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas***

La pared de las bacterias Gram positivas está compuesta por varias capas de peptidoglucano, que conforman una estructura gruesa y rígida, éste es un elemento clave para la estructura, la replicación y la supervivencia de la célula en las condiciones normalmente hostiles en las que proliferan las bacterias. (Morales Rodríguez, 2018)

### **Figura 12**

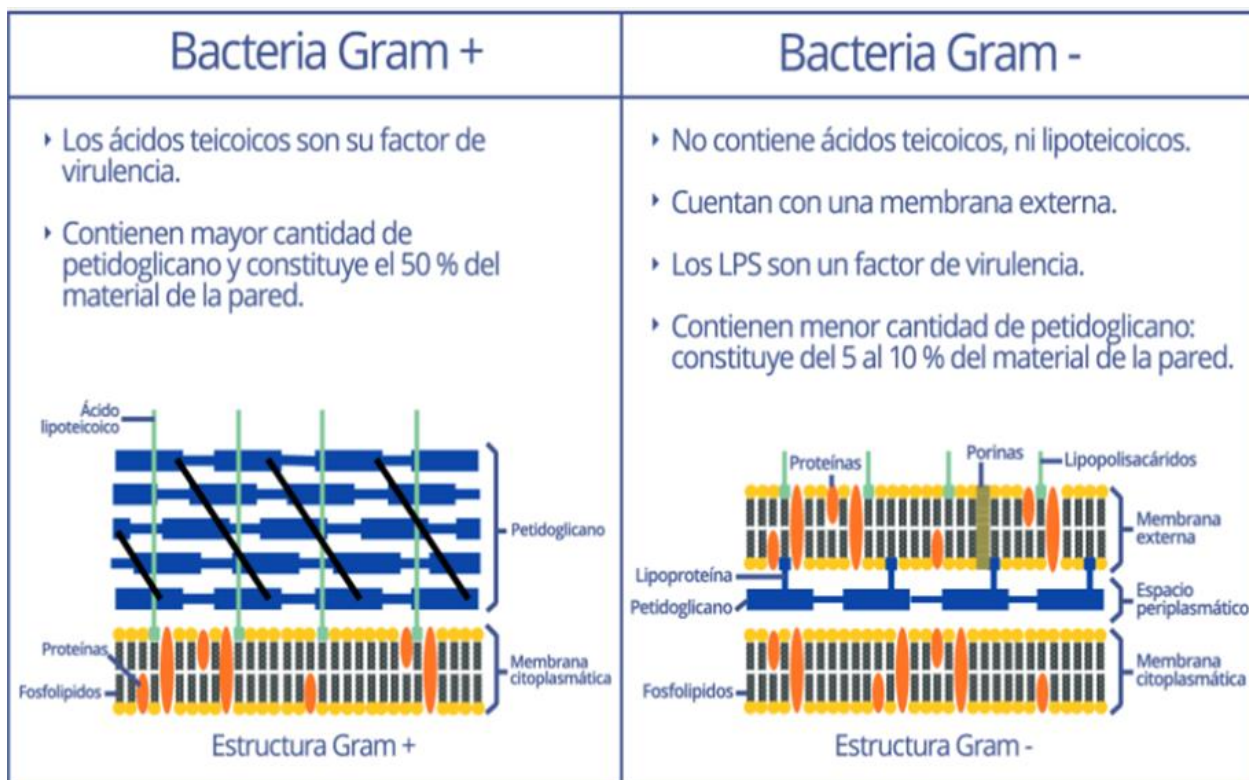
*Comparación de las Envolturas Celulares Bacterianas*



Nota. Extraído de (Ghuysen & Hakenbeck, 1994). Arriba: Bacteria grampositiva. 1-membrana citoplasmática, 2-peptidoglicano, 3-fosfolípidos, 4-proteínas, 5-ácido lipoteicoico. Abajo: Bacteria gramnegativa. 1-membrana citoplasmática (membrana interna), 2-espacio periplasmático, 3-membrana externa, 4-fosfolípidos, 5-peptidoglicano, 6-lipoproteína, 7-proteínas, 8-lipopolisacáridos, 9-porinas.

### Figura 13

*Cuadro comparativo Bacteria Gram Positiva y Bacteria Gram Negativa*



Nota. Extraído de (Morales Rodriguez, 2018)

**Tabla 2**

*Diferencias Entre las Bacterias Gram (+) y Gram (-)*

Características	Gram +	Gram -
Membrana externa	X	Si
Pared celular	Gruesa	Delgada
LPS	X	Si
Endotoxina	X	Si
Ácido teicoico	Presenta a menudo	X

Morales, N. (2017). Comparación de bacterias Gram + y Gram -.

Nota. Extraído de (Morales Rodriguez, 2018)

## **Bacterias Lácticas**

### ***Características generales de las BAL***

BAL son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. La mayoría de las BAL presentan morfología de coco o bacilo, son Gram positivos, no esporulados y no móviles. Pueden presentar metabolismo respiratorio anaerobio o microaerofílicos o aerotolerante. Son oxidasa y catalasa negativas, carecen de citocromos, no reducen nitratos a nitritos y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Vásquez et al., 2009).

Las BAL son consideradas ácido tolerantes debido a que algunas presentan la capacidad de crecer a valores de pH bajos como 3,2, otras a valores altos como 9,6, mientras la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5. De esta forma pueden sobrevivir en medios donde otras bacterias no soportarían el aumento de la concentración de ácidos orgánicos (Carr et al., 2002).

El metabolismo reproductivo de las BAL se basa en la utilización de azúcares como la glucosa y lactosa. Además, requieren aminoácidos vitaminas y otros factores de crecimiento. Los alimentos representan una buena fuente de estos nutrientes, siendo la leche el medio típico y óptimo para la proliferación de las BAL. Sin embargo, existen otros alimentos tales como la masa de cereales, los vegetales y la carne, que representan un excelente medio de crecimiento y producción de metabolitos (Vásquez et al., 2009).

### ***Clasificación de las BAL***

Las BAL constituyen un grupo de géneros que presentan características similares respecto a su morfología, metabolismo, fisiología, crecimiento a diferentes temperaturas, configuración de ácido láctico producido, capacidad de crecer a elevadas concentraciones de sal y en la tolerancia ácido-base. (Ruiz, 2019, pág. 43)

Se clasifican en diferentes géneros en función de las características específicas antes mencionadas, al modo de fermentación de la glucosa y al producto final obtenido (Doyle et al., 2013).

La clasificación en base al producto final de la fermentación permite distinguir a las BAL homofermentadoras de las heterofermentadoras:

- Las homofermentadoras poseen la enzima aldolasa y generan ácido láctico como producto final de la fermentación de la glucosa, utilizando la vía de glucólisis Embden-Meyerhof. Los géneros representativos de este tipo de bacterias son: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunas especies de *Lactobacillus spp.* (Ramírez et al., 2011).

- Las heterofermentadoras se caracterizan por convertir hexosas a pentosas mediante la vía 6- fosfogluconato-fosfocetolasa, generando a través del proceso, además de ácido láctico, cantidades significativas de otros productos tales como acetato, etanol y CO<sub>2</sub>. Los géneros que representan a esta clase de bacterias son: *Leuconestoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunas especies de *Lactobacillus spp.* (Carr et al., 2002).

En función de las características buscadas, se utilizarán unas u otras. En la industria alimentaria generalmente son utilizadas las BAL heterofermentadoras debido a su aplicación tecnológica en la formación de compuestos aromáticos e intensificadores de sabor como diacetilos y acetaldehídos. (Ruiz, 2019, pág. 44)

El estudio del metabolismo de las bacterias abarca dos grandes grupos, el de los azúcares y compuestos relacionados, donde se incluyen los ácidos orgánicos y el de los compuestos nitrogenados. (Del Valle Rivero, 2018, pág. 40)

### ***Metabolismo de azúcares y ácidos orgánicos***

Las BAL pueden diferenciarse en dos grupos principales en base a la vía utilizada para la fermentación de los azúcares y compuestos relacionados, homofermentativos o heterofermentativos (Madigan y col., 2004). Las bacterias homofermentativas convierten los azúcares por la vía Embden-Meyerhoff-Parnas o vía glicolítica casi exclusivamente hacia la formación de ácido láctico (Figura 14 A) siendo incapaces de fermentar pentosas y gluconato. Las bacterias heterofermentativas utilizan la vía del 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa o también denominada vía de la pentosa fosfato, produciendo además de ácido láctico, dióxido de carbono y etanol (y/o ácido acético) como productos finales (Figura 14). (Del Valle Rivero, 2018, pág. 40)

La diferencia entre ambas vías reside en la enzima clave aldolasa, la cual está ausente en las bacterias heterofermentativas lo que les impide escindir la molécula de fructosa-1,6-difosfato. En su lugar, oxidan la glucosa-6-fosfato a gluconato-6-fosfato, luego la descarboxilan a xilulosa-5- fosfato y escinden en gliceraldehido-3-fosfato y acetil-fosfato en presencia de la enzima fosfoacetolasa. Por último, el gliceraldehido-3-fosfato es convertido en ácido láctico con la producción de una molécula de ATP, mientras que el acetil-fosfato se reduce, en presencia de NADH, a etanol (Figura 14 B). Es por esta razón que el rendimiento energético de la vía heterofermentativa es la mitad que el de la vía homofermentativa en la que se producen 2 moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa fermentada, sin producción neta de poder reductor. (Del Valle Rivero, 2018, pág. 40)

Por lo tanto, en base al tipo de mecanismo fermentativo las BAL se dividen en:

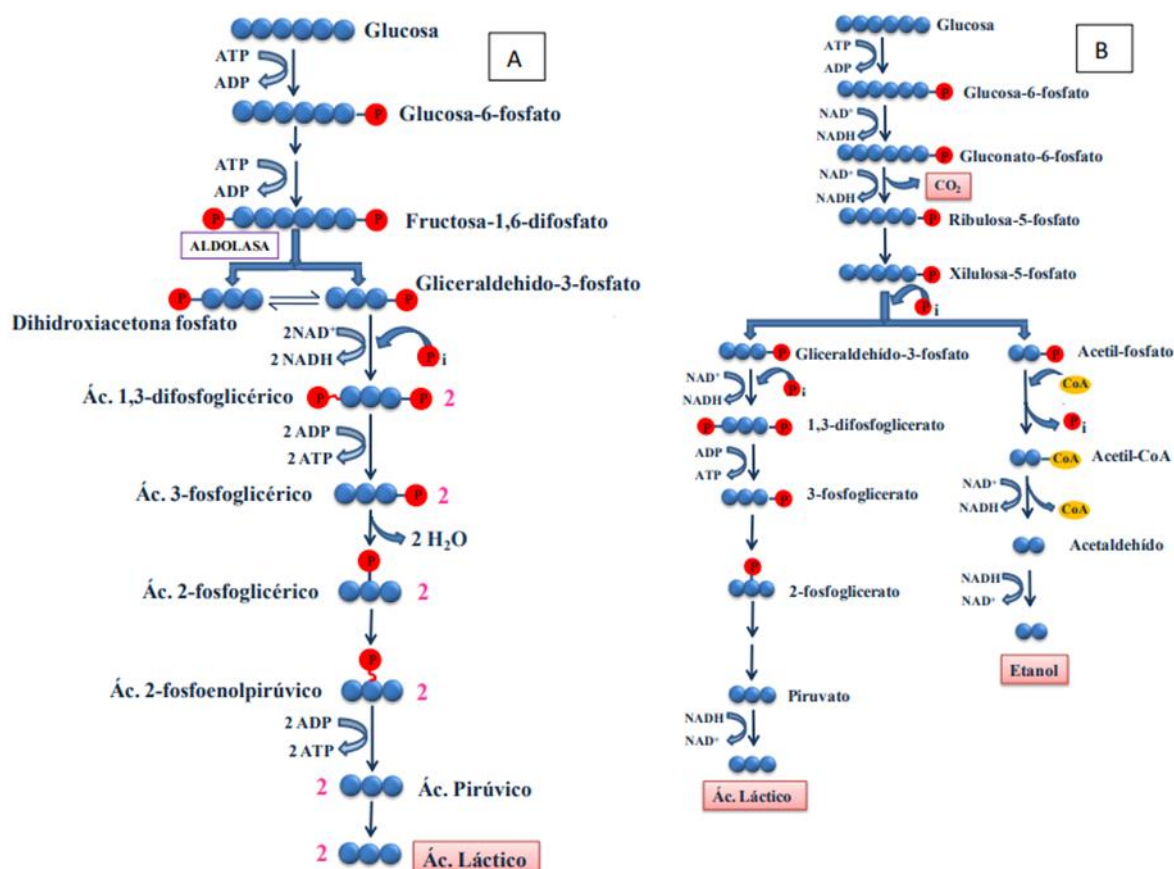
I. Homofermentativas estrictas: Fermentan hexosas solamente por la vía glicolítica.

II. Heterofermentativas facultativas: Tienen la capacidad de utilizar ambas vías, siendo su metabolismo principalmente homofermentativo. Sin embargo, si se modifican las condiciones del medio, tales como la concentración de glucosa, pH, y la disponibilidad de nutrientes cambian su metabolismo a heterofermentativo (Axelsson, 2004).

III. Heterofermentativas estrictas: utilizan exclusivamente la vía de la pentosa fosfato, degradando tanto las hexosas como las pentosas por la vía 6-PG/PK. 1 mol de ATP es producido a partir de un mol de glucosa fermentada Figura 14 B) (Ruiz-Rodríguez y col., 2017).

**Figura 14**

*Esquema General de la Vía de Embden-Meyerhoff-Parmás*



Nota. Extraído de (Adaptado de Tortora y col., 2007). Vía de Embden-Meyerhoff-Parmás empleadas por BAL homofermentativas (A) y de la vía de la pentosa fosfato empleada por BAL heterofermentativas (B).

Puede concluirse que las diferencias entre las BL homo y heterofermentativas, en lo que a productos finales de la fermentación se refiere, son consecuencia de diferencias básicas de tipo genérico y fisiológico. Las homofermentativas poseen los enzimas fructosa 1,6-

difosfatoaldolasa y hexosaisomerasa que no tienen las heterofermentativas, mientras que éstas últimas poseen una fosfoacetolasa, de la que carecen las primeras. (Del Valle Rivero, 2018, pág. 42)

El rendimiento energético de ambas rutas es también claramente diferente. Las bacterias homofermentativas son capaces de extraer doble cantidad de energía de la fermentación de la glucosa que la que genera la ruta heterofermentativa. Del mismo modo, que la cantidad de ácidos producida es mayor en la ruta homofermentativa que en la heterofermentativa. Además de las diferencias fisiológicas comentadas, hay que tener en consideración que las condiciones de crecimiento pueden alterar significativamente los productos finales formados. Estos cambios pueden producirse por la alteración del metabolismo del piruvato y/o por el uso de otros aceptores de electrones externos, como el O<sub>2</sub> o algunos compuestos orgánicos (Axelsson, 2004).

Con referencia al ácido láctico producido, hay que indicar que existen dos posibles isómeros, el D (-) y el L (+), cuya formación depende de que el enzima que lleve a cabo la reducción del piruvato a lactato sea la D-lactato o la L-lactato deshidrogenasa. Las especies de bacterias lácticas pueden producir sólo uno de los isómeros o una mezcla de ambos y tiene importancia taxonómica el tipo de isómero producido. Cuando se producen ambas enzimas, éstos suelen tener distinta actividad, lo que da lugar a un exceso de uno de los isómeros y raramente se produce una mezcla racémica. (Del Valle Rivero, 2018, pág. 42)

Respecto al metabolismo de los sustratos carbonados es interesante destacar que las BAL son capaces de degradar con cierta facilidad algunos ácidos orgánicos como el málico, el cítrico y el tartárico.

El ácido málico es un compuesto que se encuentra en cantidades importantes en los productos vegetales y en el vino, y es un sustrato común para algunas especies de este grupo que lo transforman en láctico y CO<sub>2</sub>, proceso que se denomina “fermentación maloláctica”. El

enzima que cataliza dicha reacción recibe el nombre de enzima maloláctica. Esta fermentación tiene una gran importancia en el proceso de vinificación contribuyendo en gran medida a la formación del gusto y del aroma de los vinos. La especie más importante es *Oenococcus oeni*.

El ácido cítrico está también presente en cantidades apreciables en la mayoría de los vegetales y es abundante en los productos lácteos fermentados, donde es considerado el principal precursor del aroma característico a “mantequilla”.

El ácido tartárico, mayoritario en el mosto de uva y detectado también en vegetales, aunque en cantidades poco importantes, es al igual que el málico un buen sustrato para el crecimiento de algunas BAL. El mecanismo de degradación del tartárico es diferente según se trate de una bacteria homo o heterofermentativa, produciéndose compuestos distintos en cada caso. Así, mientras la homofermentadoras forman acético, láctico y CO<sub>2</sub>, las heterofermentadoras forman acético, CO<sub>2</sub> y cantidades minoritarias de ácido succínico. (Del Valle Rivero, 2018)

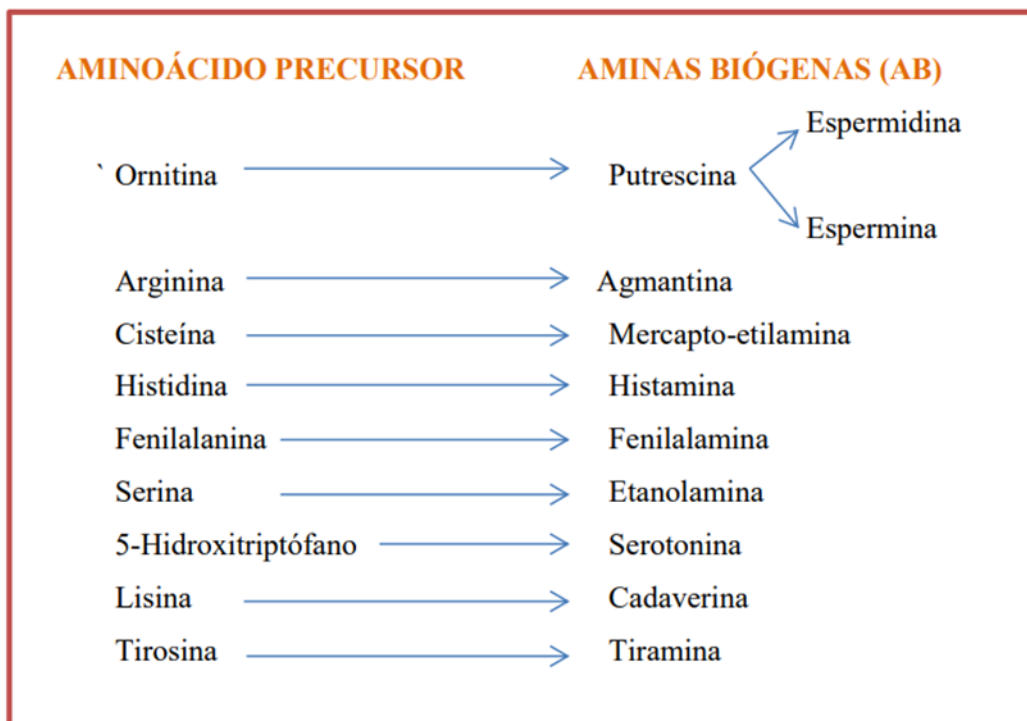
### ***Metabolismo de los compuestos nitrogenados***

Las BAL son capaces de transformar, utilizando distintas rutas metabólicas, las proteínas, los péptidos y algunos aminoácidos. Éstas han desarrollado “sistemas proteolíticos” complejos que les permiten utilizar eficientemente las fuentes de nitrógeno presentes en los medios de cultivo, liberando péptidos y/o aminoácidos, que serán transportados a través de la membrana citoplasmática, mediante sistemas de transporte específicos y finalmente utilizados en el interior celular (Saguir y col., 2008). A pesar de ello, la presencia de aminoácidos preformados en el medio es de gran importancia para estas bacterias, dada su limitada capacidad para sintetizar aminoácidos a partir de fuentes de nitrógeno inorgánico (Saguir y Manca de Nadra, 2007), además de que, como hemos indicado anteriormente, los utilizan como fuente de carbono. Los sistemas proteolíticos de las BAL son complejos, siendo los más estudiados y mejor

conocidos, por su importancia tecnológica en la fermentación de la leche, los sistemas proteolíticos de los lactococos (Kunji y col., 1996) y en especial el de *Lc. lactis subsp. lactis*, del que se han aislado e identificado algunas de sus proteasas y peptidasas, tanto extracelulares como intracelulares. En este, las proteasas se localizan en su mayor parte a nivel de la pared celular, aunque también se ha detectado una débil actividad intracelular, mientras que las peptidasas están situadas tanto en la pared, como en la membrana citoplasmática, como en el citoplasma. Por acción de las peptidasas se eliminan péptidos de pequeño tamaño, responsables del sabor amargo de algunos alimentos. En la última fase de la proteólisis se produce acumulación de aminoácidos libres, algunos de los cuales influyen en la textura, son una importante reserva de compuestos precursores de aromas y contribuyen al sabor característico de algunos alimentos. Además de la actividad proteolítica, entre las BAL, es frecuente encontrar especies capaces de descarboxilar algunos aminoácidos, procesos que llevan a la formación de dióxido de carbono y la correspondiente amina. La presencia de estas aminas denominadas “biógenas” ha sido descrita en algunos alimentos fermentados, como los embutidos, los productos lácteos, los derivados del pescado, los vinos o los encurtidos (Landete y col. 2005) siendo en estos últimos la histamina, la más frecuentemente encontrada (Saguir y Manca de Nadra, 2008). En la Figura 15 se muestran algunos ejemplos de las aminas biógenas con mayor presencia en los alimentos y los aminoácidos a partir de los que se originan (Saguir y Manca de Nadra, 2008).

### **Figura 15**

*Aminoácidos Descarboxilados por las BAL y sus Correspondientes Aminas Biógenas*



Nota\*. Extraído de (Del Valle Rivero, 2018, pág. 44)

El gran interés suscitado por estos compuestos, proviene del hecho de que algunas de ellas como la histamina, pueden ser tóxicas incluso ingeridas en bajas concentraciones. Además, tanto la tiramina como la histamina tienen propiedades vasoactivas y/o psicoactivas, por lo que su presencia en los alimentos supone un riesgo importante para los consumidores. (Del Valle Rivero, 2018)

No obstante, para que en los alimentos se produzca acumulación de AB es necesario que confluyan circunstancias tales como disponibilidad de los aminoácidos precursores, presencia de microorganismos con actividad amino descarboxilasa y condiciones favorables tanto para su crecimiento como para la actividad descarboxilante. La capacidad de las BAL para descarboxilar aminoácidos es dependiente de la especie e incluso algunos autores (Bover-Cid y Holzapfel, 1999) indican que tiene carácter intraespecífico, habiéndose observado claras diferencias tanto

en la cantidad como en el tipo de amina producida, entre cepas de una misma especie. (Del Valle Rivero, 2018)

Por los riesgos toxicológicos que representa la presencia de AB en los alimentos puede suponer, la determinación de la capacidad aminobiogénica es uno de los estudios que deben realizarse en la selección de cepas para el diseño de cultivos iniciadores (Bover-Cid y col., 2001), especialmente en aquellos que van a ser utilizados en la elaboración de productos cárnicos, por su elevado contenido en proteínas. Esta determinación puede hacerse por métodos cuantitativos como la cromatografía de líquidos o cualitativos como el descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999), basado en el cambio de color que se produce en el medio de cultivo como consecuencia del incremento de pH producido por las descarboxilaciones. Otros autores (Lucas y Lonvaud-Funel, 2002) por el contrario, han optado por determinar la presencia de los genes que codifican para las enzimas implicadas en estas descarboxilaciones utilizando la técnica de la PCR o de reacción en cadena de la polimerasa. Por último, las BAL pueden llevar a cabo otras transformaciones en los aminoácidos como son las reacciones de transaminación y de desaminación que, aunque menos frecuentes, son también de gran importancia ya que conducen a la formación de aldehídos, fenoles, indoles y otros compuestos azufrados fuertemente aromáticos, que pueden provocar malos olores. (Del Valle Rivero, 2018, pág. 45)

## Principales Bacterias Causantes de ETA

### *Salmonella Typhimurium*

Las salmonellas son los microorganismos patógenos más frecuentemente identificados como agentes etiológicos de toxiinfecciones alimentarias. Son muchos los alimentos y serotipos de salmonellas los implicados en infecciones humanas en países desarrollados, y en países en vías de desarrollo, tal como se ha constatado en las últimas décadas (Koochmaraie y col., 2011).

*Salmonella*, pertenece al género de la familia *Enterobacteriaceae* está constituido por bacilos Gram-negativos, aerobios facultativos, generalmente móviles, debido a la presencia de flagelos peritricos. Las salmonellas pueden adaptarse a condiciones adversas, pueden utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos con capacidad para metabolizar nutrientes por vía respiratoria o por fermentación. Las bacterias crecen óptimamente a 37 °C y algunas cepas pueden crecer a elevadas temperaturas (hasta 54 °C) mientras que otras muestran propiedades psicotróficas, llegando a crecer en alimentos conservados entre 2 y 4 °C, o mantenerse viables durante largos periodos de tiempo en alimentos almacenados y congelados. Son microorganismos resistentes a la deshidratación por lo que se mantienen viables en productos de baja actividad de agua. Además, su resistencia térmica aumenta a medida que disminuye la actividad de agua ( $a_w$ ), por lo que no debe extrañar su presencia en leche en polvo. Recientemente también se ha demostrado que *Salmonella spp.* pueden adherirse y formar biofilms en superficies que se encuentran en las plantas de procesado de alimentos (entre las que se incluyen plástico, cemento y acero); esta capacidad se debe a que posee estructuras de superficie, como la SEF 17 fimbriae, que facilitan la adhesión a las superficies inanimadas, proporcionando a las células cierta capacidad de resistencia frente a fuerzas mecánicas (Montville y Matthews, 2008).

Esta respuesta adaptativa puede provocar un incremento de la resistencia de los microorganismos ante factores inactivantes como tratamientos térmicos, con conservantes, acidificación, etc. (Montville y Matthews, 2008).

Según el esquema de clasificación Salmonella se dividen en dos especies *S. bongori* y *S. enterica* (con seis subespecies arizonae, diarizonae, enterica, hutena, indica y salamae) (LPSN bacterio.net). La mayoría aisladas del hombre y de animales pertenecen a *S. enterica subespecie enterica*. Entre ellas cabe destacar las serovariedades *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Enteritidis*, por ser las más comúnmente asociadas con brotes de toxoinfección alimentaria (Álvarez Ojeda y col, 2009).

Causan una amplia variedad de enfermedades entéricas humanas, desde leves síntomas de corta duración (náuseas y calambres abdominales) a severas gastroenteritis con o sin bacteriemia como fiebre tifoidea, una enfermedad potencialmente mortal. La salmonelosis transmitida por alimentos contaminados se caracteriza por un período de incubación de 8 - 72 h y un período corto de duración de la enfermedad (4 - 7 días) siendo este tipo de intoxicación alimentaria raramente fatal (menos del 1%). (Del Valle Rivero, 2018)

## ***Escherichia Coli***

Representa la especie tipo del género *Escherichia* perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* cuyos integrantes se caracterizan por ser bacilos rectos Gram (-), móviles por flagelos peritricos, no esporulados, aerobios facultativos, catalasa (+) y oxidasa (-). No son exigentes desde el punto de vista nutricional, fermentan azúcares con producción de gas y una mezcla de ácidos orgánicos. En condiciones aeróbicas suplen sus requerimientos energéticos a partir de la degradación de los carbohidratos a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Se encuentra como flora intestinal normal del hombre y animales por lo que se la considera como indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos. Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biología molecular. Desde su identificación como patógeno humano *E. coli* fue considerado como el microorganismo más importante responsable de severas enfermedades como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), asociado al consumo de alimentos (Rivero y col., 2004), incluidos frutas y hortalizas crudas y procesados (Sagdic y col., 2013). En nuestro país, la infección por *E. coli enterohemorrágica* asociada al consumo de alimentos contaminados se considera como la principal etiología de SUH (Rivero y col., 2004).

## ***Listeria Monocytogenes***

*L. monocytogenes* es la especie característica del género *Listeria*, perteneciente a la familia *Listeriaceae*. Son pequeños bacilos Gram-positivos de extremos redondeados de 0,4-0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0,5-2  $\mu\text{m}$  de longitud. Sin embargo, a medida que el cultivo envejece la reacción de Gram se torna irregular. Las células pueden encontrarse aisladas, en pares o formando cadenas cortas, raras veces forman largos filamentos. Esta bacteria es aerobia facultativa, catalasa (+), no presenta cápsula ni forma endosporas. Crece mejor en presencia de baja tensión de oxígeno, elevada concentración de dióxido de carbono y medios enriquecidos. Fermenta glucosa y ramnosa con producción de ácidos, pero no de gas, hidrolizan esculina y es débilmente  $\beta$ -hemolíticas. Gracias a la presencia de flagelos peritricos son móviles a 20 - 25 °C aunque no a 37 °C. En términos generales pueden crecer en un amplio intervalo de temperaturas, entre 1 y 43 °C, si bien su temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 30 y 37 °C. Son psicrotrofos y toleran condiciones de acidez y de alcalinidad, siendo capaces de crecer entre pH 5,5 y pH 9,6 aunque crece óptimamente a pH neutro o ligeramente alcalino. (Del Valle Rivero, 2018)

Las especies del género *Listeria* se encuentran en nichos muy dispares; son bastantes ubicuas. Además, son bastante resistentes a condiciones disgenésicas y pueden desarrollarse en sustratos muy diversos y en amplios rangos de condiciones ambientales. Se han aislado tanto del suelo como de aguas residuales, de vegetales en descomposición, de heces animales, de salas de mataderos, así como de alimentos frescos, ahumados y congelados. Las cepas del género *Listeria* presentan una gran capacidad para adherirse a superficies vivas e inertes y, requieren solo un corto espacio de tiempo para la unión e iniciar la adhesión (Keskinen y col., 2008). Por lo tanto, considerando todas estas características, no es de extrañar que se detecten

en muchos alimentos y que puedan acceder a ellos en cualquier etapa de la producción. (Del Valle Rivero, 2018)

De las 10 especies incluidas dentro del género, *L. monocytogenes* es un patógeno bien reconocido. Es el agente causal de Listeriosis en el ser humano, que se caracteriza por tener una baja morbilidad y alta tasa de mortalidad (20 – 30%) (Ramaswamy y col., 2007). La infección por *Listeria* puede causar síntomas leves, como fiebre, gastroenteritis, náuseas, vómitos y diarrea, o severos, como meningitis, encefalitis o septicemia en niños, ancianos o personas inmunodeprimidas (Ramaswamy y col., 2007). Choi y col. (1994) han demostrado que *L. monocytogenes* puede producir infecciones en el hombre por contaminación en forma indirecta o directa a través del consumo de leche de animales infectados, o alimentos contaminados como vegetales y frutas y productos lácteos. (Del Valle Rivero, 2018, pág. 18)

## ***Enterococcus Faecalis***

Los organismos del género *Enterococcus* son cocos Gram-positivos, no esporulados, aerobios facultativos que se presentan individualmente, en pares o en cadenas. Hasta la fecha se admiten 50 especies (LPSN bacterio.net), siendo las más relevantes en el ámbito alimentario *E. faecalis* y *E. faecium*. Estos y otros representantes del género *Enterococcus* se encuentran ampliamente distribuidos por doquier, aunque uno de sus principales nichos, como es de suponer considerando su nombre, es el tracto gastrointestinal de animales y humanos. Las especies detectadas con más frecuencia en heces son *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. durans*, siendo más frecuentes en heces animales de abasto que en las humanas. De todas las especies de *enterococcus* asociadas a los humanos, *E. faecalis* es la predominante (Foulquié y col., 2006). De todas maneras, este microorganismo debe considerarse ubicuo ya que no solo se aísla de animales de sangre caliente sino también del suelo, de aguas superficiales, plantas, verduras e insectos. Estos microorganismos se caracterizan por ser muy resistentes a ambientes disgenésicos incluyendo pH alcalino y elevadas concentraciones de cloruro de sodio. Además, muchas cepas crecen en un amplio intervalo de temperaturas, desde temperaturas de refrigeración hasta los 45°C e incluso más, aunque el crecimiento óptimo suele cifrarse en torno a los 37°C. Su resistencia y su adaptabilidad a diversos sustratos y factores que condicionan el crecimiento implica que puedan encontrarse en muchos alimentos, sobre todo en los elaborados a partir de una materia prima que no se trate térmicamente, como la carne para fabricar embutidos crudos o la leche cruda para ciertos quesos, aunque también se detectan asiduamente en aquellos que se han higienizado, ya sea por su inherente resistencia a los tratamientos conservantes, ya sea como consecuencia de una contaminación postratamiento, pero, en estos casos, su concentración suele ser escasa. Por todo esto se les ha considerado unos buenos indicadores para valorar las condiciones higiénicas y de conservación de los alimentos y su posible contaminación a partir de aguas fecales o heces (Foulquié y col., 2006). Sin embargo, la

presencia de *E. faecalis* y otros *enterococcus* en muchos alimentos no siempre se relaciona con una contaminación fecal, dejando en entredicho su papel indicado. Sin embargo, algunas cepas de *E. faecalis* y otros enterococos son patógenas oportunista sobre todo en ambientes hospitalarios, pudiendo causar infecciones del tracto urinario, en algunos casos endocarditis, incluyendo cuadros esporádicos de infecciones en el sistema nervioso. Este carácter peligroso de los enterococos se ve acrecentado por el hecho de su demostrada resistencia a muchos antibióticos, lo que hace que estos microorganismos se encuentran entre los más frecuentes causantes de enfermedades nosocomiales junto a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Aguirre y col, 2011).

## ***Staphylococcus Aureus***

*S. aureus* es una de las bacterias más resistentes a las condiciones ambientales dentro de las que no forman esporas. Puede sobrevivir en condiciones ambientales no fisiológicas y tolerar medios con alto contenido salino. Por lo tanto, no es sorprendente que sea un patógeno de alta ubicuidad, capaz de causar importante patología tanto a pacientes hospitalizados como a individuos sanos de la comunidad. Coloniza la nasofaringe y/o la piel de aproximadamente la tercera parte de la población general. Las mucosas y la piel del hombre ofrecen una barrera mecánica eficiente contra la invasión tisular local. Pero, si por algún motivo esta barrera se quiebra (cirugía, quemadura, etc.), *S. aureus* puede alcanzar el tejido subyacente. Si al multiplicarse supera los mecanismos de defensa local, puede ingresar a la circulación, diseminarse y así producir distintas enfermedades graves. Por lo expuesto, se considera que *S. aureus* es un patógeno oportunista. Una elevada proporción de los individuos normales de la comunidad alberga *S. aureus* en diversos sitios anatómicos, como las fosas nasales y pliegues cutáneos (axilas e ingle). De esta manera, *S. aureus* se puede comportar como comensal e integrar el microbiota humano normal. Desde estos reservorios y ante una alteración de las defensas del huésped (ruptura de la barrera epitelial por quemadura o traumatismo), la bacteria puede invadir tejidos y causar severas infecciones. Dado este origen, estas infecciones se denominan endógenas. (Sordelli, 2020)

*S. aureus* tiene la pared celular típica de un Gram (+). Contiene tres componentes principales: el peptidoglicano, los ácidos teicoicos y la proteína A. El peptidoglicano, posee la cadena de unión cruzada con puentes de pentaglicina, específicos de *S. aureus*. Los ácidos teicoicos son grupos de polímeros que contienen fosfatos. Algunos están unidos al peptidoglicano y son secuencias de ribitol-fosfato, exclusivas de *S. aureus*, mientras que otros están unidos a los lípidos de la membrana citoplásmica y son del tipo glicerol-fosfato, como en

otras especies del género. Formando parte de la pared, *S. aureus* posee proteína A. Por fuera de la pared la mayoría de las cepas de *S. aureus* poseen una fina cápsula polisacáridica. (Sordelli, 2020)

*S. aureus* puede obtener energía tanto por respiración como por fermentación de diferentes hidratos de carbono. Su capacidad de fermentar el manitol se utiliza en el laboratorio de bacteriología para diferenciarlo de otras especies. Al igual que el resto de los estafilococos, es anaerobio facultativo, pero crece mejor en aerobiosis. Puede desarrollar en un amplio rango de temperaturas (óptima entre 30 y 37°C). Crece bien en los medios comunes de laboratorio, formando colonias definidas, lisas y convexas. Muchas cepas producen colonias amarillo-doradas debido a la presencia de pigmentos carotenoides. (Sordelli, 2020)

La intoxicación resulta de la presencia de enterotoxinas en alimentos contaminados, antes de ser ingeridos. Se caracteriza por producir vómitos y diarrea acuosa, usualmente sin fiebre, luego de un corto período de incubación de 2 a 6 horas según la cantidad de toxina ingerida. En muchos casos, la cepa de *S. aureus* productora de enterotoxina se ha aislado de personas encargadas de la preparación de alimentos. Como se dijo anteriormente, *S. aureus* es una bacteria muy resistente a las condiciones ambientales no fisiológicas y puede sobrevivir en ambientes con altas concentraciones salinas. Si el alimento no se refrigera adecuadamente, los estafilococos desarrollan y pueden producir enterotoxina. Aunque el alimento luego sea calentado hasta ebullición, la toxicidad persiste, dado que la enterotoxina resiste los 100°C durante 30 minutos. (Sordelli, 2020)

Los principales alimentos que actúan como vectores inanimados son las cremas en helados y productos de panadería, ensaladas de papas, los alimentos enlatados y carnes procesadas (matambres). Dado que *S. aureus* puede crecer en medios hipersalados, no sorprende encontrar brotes de intoxicación asociados a la ingestión de fiambres. (Sordelli, 2020)

De acuerdo con una hipótesis, los vómitos se atribuyen a la estimulación de las terminales del nervio vago en el estómago. Otra hipótesis atribuye los efectos sistémicos de la enterotoxina estafilocócica a su capacidad de comportarse como superantígeno y estimular a los linfocitos T. La sintomatología de la intoxicación estafilocócica bien podría resultar de una combinación de estos dos modos de acción. (Sordelli, 2020)

## ***Shigella* – Shigelosis**

La shigelosis, también llamada disentería bacilar, es una infección causada por bacterias del género *Shigella* que contiene cuatro subgrupos con diferente capacidad patogénica. (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica - ANMAT)

Es transmitida por la ruta fecal-oral con una baja dosis infectiva, a través de alimentos contaminados o bien por contacto directo con personas infectadas. Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en instituciones (escuelas, clubes, geriátricos, entre otros) y hogares con niños, donde se ve aumentada la probabilidad de contaminación fecal. La mayoría de los casos ocurren en niños menores de 10 años. (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica - ANMAT)

La shigelosis es endémica en climas tropicales y templados, y muestra una fuerte estacionalidad, siendo más común su incidencia en verano que en invierno. Según datos del Ministerio de Salud de la Nación, se constató que durante el período 2010 a 2012, *Shigella spp* fue la principal causante de las diarreas bacterianas que se presentaron en la República Argentina.

El principal modo de control de la shigelosis es la prevención mediante el uso de agua segura, un adecuado sistema de saneamiento, y buenas prácticas de higiene durante la manipulación de alimentos.

*Shigella* es una bacteria altamente enteroinvasiva; su hábitat es el colon y el principal reservorio es el humano, aunque se la ha aislado de primates superiores. Se transmite a través del contacto directo o indirecto de agua y alimentos contaminados con materia fecal de personas infectadas.

El género *Shigella* está formado por bacilos Gram-negativos inmóviles, anaerobios facultativos no esporulados, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Presentan actividad bioquímica reducida con actividad citocromo-oxidasa negativa y fermentación de glucosa sin producción de gas.

El género *Shigella* se puede dividir en cuatro subgrupos y 43 serotipos que se diferencian entre sí por sus características bioquímicas (como fermentación del D-manitol y producción de indol) y estructura antigénica (como el antígeno O de la capa de lipopolisacáridos en la superficie celular bacteriana).

Las diferentes especies de *Shigella* presentan distinta distribución geográfica; *Shigella boydii* predomina en el subcontinente indio, *S. dysenteriae* tipo 1 se asocia a situaciones de emergencia complejas en países en desarrollo, *S. flexneri enteroinvasiva* es responsable de la disentería bacilar endémica en todo el mundo, y la especie más común en países industrializados es *S. sonnei*, cuya enfermedad suele ser menos grave. En Argentina, los subgrupos más frecuentes son *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*.

Las especies de *Shigella* son muy sensibles a fluctuaciones de temperatura y a condiciones ambientales desfavorables. Sin embargo, son tolerantes a pH bajos, por lo que unas pocas bacterias pueden soportar la acidez del estómago y luego colonizar el tracto digestivo. Esta facultad, sumada a que son infectivas a bajas dosis, contribuye a su patogenicidad.

La patogenicidad de *Shigella* está asociada a su habilidad de invadir y colonizar el epitelio intestinal humano mediante factores de virulencia (como IpaB e IpaC). Forma poros a través de la membrana de las células del epitelio intestinal, permitiendo la penetración de la bacteria al citoplasma del enterocito. Luego se multiplican e infectan células adyacentes a través de protrusiones, sin tomar contacto con el medio extracelular, destruyendo las células del huésped.

*Shigella dysenteriae* además produce la toxina Shiga que difunde extracelularmente hasta células blanco-específicas. Posee efectos citotóxicos, inhibiendo la síntesis proteica y llevando a la muerte de células intestinales, células epiteliales del glomérulo y del túbulo renal y las células de la microcirculación del sistema nervioso central; causa de esta manera síndrome urémico hemolítico (SUH) y convulsiones.

La contaminación de los alimentos con *Shigella* puede provenir del contacto directo o indirecto con materia fecal de personas infectadas, a través de aguas contaminadas, plagas (moscas), o por falta de higiene y buenas prácticas del manipulador durante su preparación.

*Shigella* crece en alimentos con bajo pH como frutas y verduras. Sobrevive durante mucho tiempo en alimentos de pH neutro, a temperaturas de heladera, en alimentos cerrados al vacío o bajo atmósferas modificadas, y en el agua. Es sensible a las temperaturas de cocción de los alimentos, pero bajo ciertas condiciones puede sobrevivir en los alimentos por largos períodos si la temperatura se mantiene en 25°C.

Puede sobrevivir, por ejemplo, en la harina y en la leche pasteurizada hasta 170 días, en los huevos las almejas y los camarones por 150 días, en las ostras por 30 días, y en la clara de huevo por 20 días. Sin embargo, en la práctica muy raramente se puede aislar de los alimentos procesados, dado el tiempo transcurrido entre la recolección y el procesado de la muestra. (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica - ANMAT)

Los alimentos comúnmente asociados a la transmisión de la enfermedad son:

- Agua de consumo de fuente no segura, por ejemplo, agua de pozo contaminada por pozos ciegos, o agua de lagos o ríos sobre los que se vierten aguas residuales.
- Verduras y frutas provenientes de huertas donde se utilizan aguas servidas para el riego.

- Comidas que requieren mucha manipulación, que se sirven frías sin proceso de cocción y que ante falta de higiene del elaborador pueden contaminarse: ensaladas con ingredientes varios, vegetales crudos, lácteos y aves.

La infección por *Shigella* afecta a la porción distal del intestino delgado y al intestino grueso. Se caracteriza por diarrea acompañada de fiebre, náuseas y a veces vómitos, cólicos y tenesmo (inflamación del intestino que causa sensación de necesidad de defecar, aunque los intestinos estén vacíos, acompañado de dolor cólico). En los casos característicos, las heces contienen sangre y moco (disentería), como consecuencia de la aparición de úlceras en la mucosa y microabscesos confluentes en las criptas del colon. Las convulsiones pueden ser una complicación importante en niños de corta edad.

Su baja dosis infectiva, entre 10 a 200 células, predispone a una alta frecuencia en el contagio por la ruta fecal-oral cuando los hábitos de higiene no son adecuados y en condiciones de hacinamiento (cárceles, guarderías, hospitales, psiquiátricos, campamentos de refugiados, residencias de ancianos).

Pueden producirse infecciones leves y asintomáticas que suelen autolimitarse en 4 a 7 días, como en el caso de infecciones por *Shigella sonnei*. En cambio, *Shigella dysenteriae* tipo 1 suele ocasionar cuadros graves y complicaciones como perforación intestinal, megacolon tóxico y síndrome urémico hemolítico, con una tasa de letalidad de hasta 20 % en pacientes hospitalizados. Algunas cepas de *Shigella flexneri* pueden causar artropatía reactiva postinfecciosa (antiguamente llamado síndrome de Reiter), en particular en personas con predisposición genética. (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica - ANMAT)

El período de incubaciones generalmente de 1 a 3 días. El período de transmisibilidad comprende desde la fase aguda de la enfermedad y hasta que el microorganismo ya no está

presente en las heces. El estado de portador asintomático en raras ocasiones persiste varios meses, período durante el cual puede transmitir la enfermedad. La inmunidad es específica de serotipo, una vez sufrida la infección no es probable que la persona se infecte con el mismo serotipo de *Shigella* por varios años. (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica - ANMAT)

## ***Clostridium Perfringens***

*Clostridium perfringens* es uno de los patógenos bacterianos más ampliamente distribuidos en el ambiente gracias a su capacidad de formar esporas, y se encuentra comúnmente formando parte de la microflora del intestino de humanos y animales. Esta bacteria puede producir una toxiinfección alimentaria cuando se ingiere un gran número de células de esta bacteria (por encima de  $10^8$ ), debido a la liberación de endotoxinas en el intestino. En personas sanas produce una enfermedad leve y de corta duración, causando principalmente diarrea y dolores abdominales. La toxiinfección por *C. perfringens* es reconocida como una de las Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA) más comunes, responsable de aproximadamente el 20% de los casos anuales de intoxicación por alimentos. (ANMAT)

*Clostridium perfringens* es un bacilo Gram-positivo anaeróbico, relativamente aerotolerante. Cuando la bacteria es expuesta a condiciones adversas, puede formar esporas que persisten en el suelo, agua, sedimentos de áreas sujetas a contaminación fecal de origen animal y/o humano. La esporulación se inicia cuando las bacterias sufren condiciones de stress, lo cual amenaza la supervivencia de las formas vegetativas. Este proceso ocurre también dentro del tracto digestivo de animales y humanos. Se puede inducir la esporulación in vitro a una temperatura óptima de 32-40°C. (ANMAT)

La alta velocidad de división celular de *C. perfringens* (tiempo generacional  $\leq 10$  minutos) le permite alcanzar altas concentraciones en poco tiempo, con una temperatura de crecimiento óptima entre 43-45°C. Mientras que las células vegetativas mueren a 60°C, las esporas de cepas termoresistentes pueden soportar temperaturas de cocción, sobreviviendo a 100°C durante una hora. Las esporas de cepas termolábiles resisten a 100°C durante 10 minutos aproximadamente. (ANMAT)

*Clostridium perfringens* es muy sensible al frío. El enfriamiento de 37°C a 4°C destruye el 96% de los gérmenes. Las formas vegetativas por freezado a -18°C durante 180 días sobreviven solo el 4% y las esporas el 11%. Esta característica es muy importante tenerla en cuenta a la hora del procesamiento y almacenamiento de las muestras de alimentos en el laboratorio cuando se investiga un brote de ETA. (ANMAT)

En ciertas ocasiones, puede actuar como patógeno oportunista y causar enfermedades de importancia en la industria ganadera, como la enterotoxemia del ovino y del caprino y la disentería del cordero, entre otras. En humanos, está asociado a enfermedades como la toxiinfección por alimentos y la enteritis necrótica o pig-bel. (ANMAT)

La virulencia de *C. perfringens* se atribuye a su habilidad de producir un arsenal de toxinas potentes. Estas toxinas le permiten obtener los 13 aminoácidos esenciales que es incapaz de producir. Cuatro de estas toxinas (alfa, beta, épsilon e iota) se usan para clasificar cepas de *C. perfringens* en cinco tipos A, B, C D, y E. (ANMAT)

Sin embargo, la virulencia de *C. perfringens* no sólo se debe a estas cinco toxinas, sino también a un repertorio compuesto, de al menos otras 15 toxinas proteicas que no se utilizan para su clasificación. (ANMAT)

La denominada Enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE) es producida por algunas cepas de tipo A y es de importancia por su implicancia en toxiinfecciones alimentarias. Aunque la CPE no es utilizada en la clasificación de cepas principales de *C. perfringens*, la toxiinfección resultante de esta toxina es la tercera causa más común de intoxicación alimentaria en países industrializados. (ANMAT)

Cuando se ingiere un gran número de células vegetativas y sobreviven las condiciones ácidas del estómago esporulan en el intestino. Si la cepa corresponde a una productora de CPE, la toxina se sintetiza en la célula vegetativa y luego es liberada durante el proceso de lisis junto

con la espora en el intestino, causando daño morfológico y fisiológico en las paredes intestinales. Los poros generados en el epitelio intestinal ocasionan la pérdida de fluidos y electrolitos, lo cual origina la diarrea observada en humanos y otras especies animales. (ANMAT)

Aunque se ha detectado esporulación de *C. perfringens* en carnes, la enterotoxina preformada no es causa de intoxicación alimentaria. Hay hasta el momento un solo brote detectado de ETA por *C. perfringens*, atribuido a la toxina preformada en el alimento. Fue reportado en el año 2000, al C.D.C. en pavo en fetas. La enterotoxina es termolábil, destruyéndose a 60°C en 4 minutos. (ANMAT)

La toxiinfección por *C. perfringens* se desarrolla cuando se ingieren alimentos contaminados con gran cantidad de bacterias vegetativas de cepas de *C. perfringens* tipo A productoras de la toxina CPE (dosis infectiva del orden de 10<sup>8</sup> UFC). Esta toxina altera la membrana celular, formando poros en la pared del intestino, lo cual resulta en un aumento de la permeabilidad celular, se producen cambios en las funciones metabólicas celulares, daño y lisis celular en el intestino. (ANMAT)

Las personas infectadas con *C. perfringens* desarrollan principalmente diarrea acuosa, náuseas y dolores abdominales entre las 6 a 24 horas (típicamente entre 8 y 12 horas) y generalmente no presentan fiebre ni vómitos. La enfermedad no se contagia de persona a persona. Los síntomas generalmente comienzan repentinamente y duran menos de 24 horas. Por lo general no son casos que requieran consulta médica, por tanto, la cantidad de casos y brotes reportados atribuida a este patógeno son subestimados. Los síntomas pueden persistir hasta dos semanas en personas inmunosuprimidas o en niños. Ocasionalmente pueden ocurrir muertes en pacientes de edad avanzada, debido a deshidratación y otras complicaciones. (ANMAT)

El control de *C. perfringens* se basa casi totalmente en los procedimientos de cocción y de enfriamiento. La mayoría de los brotes son el resultado de un enfriamiento lento de los alimentos luego de su cocción, y un mantenimiento prolongado en las temperaturas peligrosas de crecimiento (entre 10°C y 60°C). Por lo tanto, las medidas preventivas principales para prevenir una toxiinfección por *C. perfringens* son:

- Los alimentos deben ser cocinados completamente a una temperatura interna entre 63°C a 74°C y luego mantenidos en una temperatura mayor a 60°C hasta el servicio/ consumo.

- Si el alimento no va a ser consumido inmediatamente, se debe enfriar rápida y adecuadamente siguiendo el Procedimiento de Enfriado Rápido de Alimentos. Debe permanecer el menor tiempo posible en el rango de temperaturas de 60°C a 10°C, y luego ser mantenido a temperaturas inferiores a 5°C.

El recalentamiento de los alimentos debe realizarse a una temperatura mayor a 74°C en su interior inmediatamente antes de su consumo.

Las Buenas Prácticas Agropecuarias contribuyen a reducir la contaminación de los alimentos con tierra y materia fecal animal, minimizando así la carga bacteriana general en la materia prima. La elaboración con Buenas Prácticas de Manufactura, evitando la contaminación cruzada entre alimentos cocidos y crudos o contaminados, y las Buenas Prácticas de Higiene son esenciales para la prevención de éste y otros microorganismos. (ANMAT)

## ***Bacillus Cereus***

*Bacillus cereus* es una bacteria Gram-positiva productora de esporas y formadora de toxinas termoestables ampliamente distribuida en el medio ambiente, que puede ser transmitida al ser humano a través de alimentos contaminados, generándole una toxiinfección alimentaria de dos tipos: por una parte, una intoxicación debido a las propias toxinas y, por otra parte, una infección por la ingesta de células que producen enterotoxinas en el intestino delgado. (elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2015)

Es un patógeno ubicuo en el medio ambiente, que se encuentra en suelos, polvo, aguas y vegetación, por lo que se está presente habitualmente en una gran variedad de materias primas y alimentos de origen agrícola y ganadero: cereales, especias, hierbas aromáticas, hortalizas, frutas, leche, carne, etc. Las concentraciones de *Bacillus cereus* presentes en dichos alimentos son bajas para producir toxiinfecciones alimentarias, sin embargo, su habilidad para formar esporas hace que sobreviva a lo largo del procesado, y una inadecuada conservación excediendo tiempo y temperatura potencia su multiplicación a niveles que producen toxiinfecciones. (elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2015)

Por un lado, las esporas son bastante resistentes, y pueden crecer y multiplicarse en ambientes húmedos, ácidos y alta concentración de sales.

Por otro lado, las toxinas eméticas de *B. cereus* son termoestables, no pudiendo destruirse con tratamientos térmicos estándar. No obstante, las cepas de *B. cereus* no pueden producir sus toxinas por debajo de 10°C o en ausencia de oxígeno.

(elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2015)

*Bacillus cereus* es la especie mayormente responsable de toxiinfecciones alimentarias.

Hay otras especies de *Bacillus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, que se han identificado más raramente como agentes de toxiinfecciones caracterizadas por diarrea y vómito. (elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2015)

*Bacillus cereus* se pueden transmitir a las personas a través del consumo de alimentos contaminados por falta de higiene e inadecuadas prácticas de cocinado y conservación:

- Contaminación cruzada en las fases posteriores de transformación de los alimentos, y en la preparación y conservación de los alimentos en el hogar.

- Personas: los manipuladores de alimentos pueden ser portadores de *Bacillus*, de forma que, al preparar los alimentos, sin tener en cuenta unas buenas prácticas de higiene y conservación, contaminan los alimentos. (elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2015)

Los brotes de *Bacillus cereus* ocurridos en Europa en los últimos años se asocian a una gran variedad de alimentos: platos preparados de carnes, pescados y vegetales (albóndigas, estofados, puddings, etc) y con arroz, pasta y patata, cremas, sopas, leche y derivados lácteos (queso, natillas, flanes, etc.). (elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2015)

*Bacillus cereus* es una causa importante de enfermedades de transmisión alimentaria en las personas, ya que provoca dos tipos de toxiinfecciones alimentarias:

- Intoxicación emética debida a la ingesta de la toxina formada en el alimento caracterizada por náuseas y vómitos. (elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2015)

- Toxiinfección gastrointestinal debida a la ingesta de células y esporas de *B. cereus* que producen enterotoxinas en el intestino delgado, caracterizada por diarrea, náuseas y dolores

abdominales. Además, es importante destacar que un número bajo de esporas puede desencadenar la toxiinfección. (elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2015)

La deshidratación ligada a los síntomas gastrointestinales hace que sea de especial importancia en personas con el sistema inmunitario débil (bebés y niños menores de 5 años, personas mayores de 60 años, enfermos de cáncer, diabéticos, portadores del VIH, pacientes tratados con corticoesteroides, etc.) donde puede desencadenar problemas más graves, como deshidratación, dolor de cabeza, calambres musculares, alteración presión sanguínea y coronaria. (elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2015)

Las empresas alimentarias deben cumplir los criterios de seguridad alimentaria relativos a *Bacillus cereus* en los alimentos de mayor riesgo (preparados para lactantes), establecidos en el Reglamento (CE) 2073/2005, DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y sus posteriores modificaciones. (elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2015)

Los fabricantes de alimentos deben someter a sus productos a temperaturas de esterilización (superior a 105°C), método de control más efectivo contra las esporas de *B. cereus*. Debido a su termo estabilidad, los tratamientos térmicos convencionales (cocción y pasteurización) no son suficientes para su inactivación. No obstante, la termoestabilidad depende del tipo de toxina, así la toxina cereulida es extremadamente resistente al calor y puede sobrevivir a 126°C durante 90 minutos, mientras que la toxina diarreica es sensible al calor y se inactiva a tratamientos a 56°C durante 5 minutos. (elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2015)

El pH bajo (<4,5), la baja actividad de agua (<0,92) y la refrigeración (<4°C) inhiben el crecimiento de *B. cereus*. (elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2015)

Asimismo, es necesario mantener la cadena de frío durante el transporte, almacenamiento y distribución de los alimentos crudos susceptibles de ser contaminados con *B. cereus*. (elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2015)

## ***Clostridium Botulinum***

El botulismo alimentario es una intoxicación neuromuscular grave, con elevado riesgo de letalidad, resultante de la ingestión de una neurotoxina, extremadamente potente, sintetizada por *Clostridium* productores de la neurotoxina botulínica (CPTB) como *C. botulinum* toxinas A-F, *C. baratii* (toxina F), *C. butyricum* (toxina E) presente en alimentos conservados y contaminados con el bacilo. Recientemente Barash y Arnon (2013) han descrito una cepa productora de neurotoxina botulínica (NTBo) tipo B y otra NTBo no neutralizable por ninguna de las antitoxinas botulínicas policlonales monovalentes (A-G), que llamaron H, resultado (o afirmación) que hoy se encuentra en discusión. Hoy son reconocidas dos formas fisiopatogénicas de botulismo:

- Intoxicación (por toxina preformada):
  - o Alimentaria (por ingestión de la toxina producida en el alimento)
  - o Iatrogénica (por uso de la toxina con fines terapéuticos).
  - o Laboral (por manipulación de toxina en laboratorios).
  - o Bélica o terrorista (por uso de la toxina como arma química).
- Toxiinfección (colonización de la bacteria y producción de la toxina in situ):
  - o Toxemia intestinal en el lactante.
  - o Toxemia intestinal del adulto.
  - o En heridas.

El género *Clostridium* comprende bacilos Gram positivos, rectos o ligeramente curvos, con los extremos redondeados, de 3 a 10  $\mu\text{m}$  de largo por 1 a 2  $\mu\text{m}$  de ancho. Se presentan aislados y a veces en pares o en cortas cadenas. Son móviles, anaerobios obligados, formadores

de endosporas y no poseen cápsula. (Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación - Ministerio de Salud de la Nación, 2016)

No son microorganismos exigentes. Mesófilos, el pH óptimo es de 6,6 a 7,2 y crecen en anaerobiosis. En agar sangre muestran beta hemólisis alrededor de las colonias. En medios con yema de huevo se observa la producción de lipasa (excepto el tipo G, actualmente *Clostridium argentinense*). Las colonias varían de 3 a 8 mm de diámetro, con bordes irregulares y centro opaco. No producen indol y la producción de H<sub>2</sub>S es variable.

Las esporas son ovales subterminales, en general deforman el soma bacteriano. Su formación depende de condiciones adecuadas de temperatura, pH, anaerobiosis, nutrientes y otras variables para los diferentes tipos.

El bacilo botulínico desarrolla y produce su toxina en alimentos acuosos, bajo condiciones de anaerobiosis, con un pH mayor de 4,5 y una temperatura superior a los 10°C (tipo A y B).

La toxina botulínica es la neurotoxina responsable del botulismo humano y animal. Es un conjunto de proteínas que constituyen el veneno más poderoso que se conoce para el ser humano. Está formada por una molécula tóxica de 150 kDa complejada por diferentes proteínas, dependiendo del tipo de toxina, no hemaglutinantes-no tóxicas y hemaglutininas, hasta un PM de aproximadamente 900 kDa.

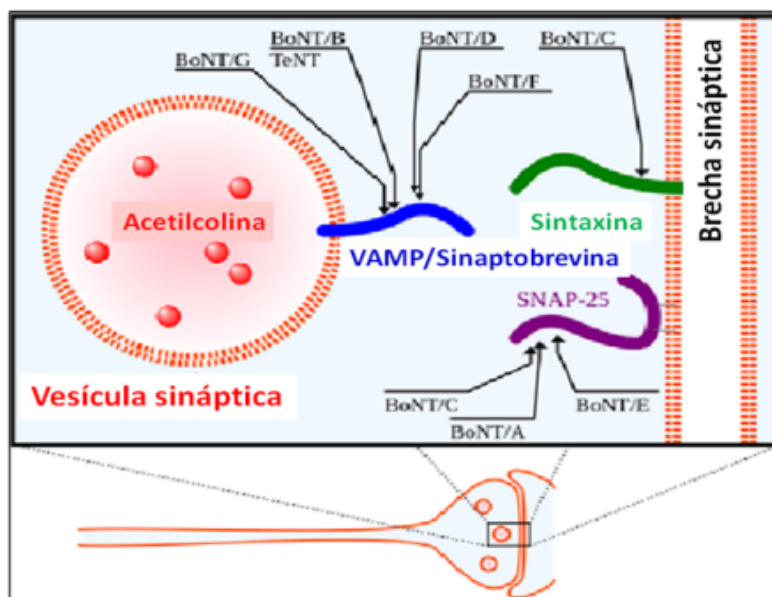
La dosis letal (DL50) de la toxina cristalina tipo A para el ratón es de 30 microgramos (aproximadamente unas 3.000.000 de moléculas), y la dosis letal para el hombre, por vía oral, es del orden de 0,1 a 1,0 microgramo, lo que permite clasificarlo como un agente "extremadamente tóxico".

Esta neurotoxina se fija a nivel pre-sináptico en la placa mioneural, se internaliza en la terminación nerviosa y actúa como Zn-endopeptidasa hidrolizando, dependiendo del serotipo, alguna de las proteínas del complejo SNARE (sintaxina, sinaptobrevina o snap-25), bloqueando

la liberación normal de acetilcolina y conduciendo a una parálisis muscular aguda, de tipo flácida, simétrica y descendente, seguida de muerte por insuficiencia y paro respiratorios, si no media tratamiento alguno. (Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación - Ministerio de Salud de la Nación, 2016)

### Figura 16

#### *Mecanismo de Acción de la Neurotoxina Botulínica*



Nota. Extraído de (Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación - Ministerio de Salud de la Nación, 2016, pág. 14)

BoNT: Neurotoxina botulínica.

TeNT: Neurotoxina tetánica

VAMP (o sinaptobrevina): Proteína de la membrana vesicular

SNAP-25: Proteína 25 asociada al sinaptosoma

SNARE: Acrónimo derivado de "SNAP Receptor"

## Factores que Posibilitan la Aparición de ETAs y cómo Prevenir las.

**Tabla 3**

*Factores que Posibilitan la Aparición de ETA*

Factores que posibilitan la aparición de ETA:
Falta de higiene personal
Manipuladores con alguna patología
Uso de agua no potable
Almacenamiento inadecuado
Incorporación de ingredientes/alimentos crudos o aditivos contaminados en comidas donde no reciban una cocción subsecuente.
Utilización de alimentos no aptos (obtención de alimentos de fuentes inseguras o insalubres). Uso de sobras.
Contaminación cruzada
Contacto de alimentos o preparaciones con productos químicos
Cocción o recalentamiento insuficientes
Conservación a temperatura ambiente
Refrigeración inadecuada o pérdida de la cadena de frío
Descongelación inadecuada
Inadecuada limpieza y/o desinfección de equipos y utensilios
Presencia de insectos o roedores

Nota. Extraído de (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2022)

**Tabla 4**

*Estrategias de prevención de las ETA*

Estrategias de prevención de las ETA
Cocinar bien los alimentos
Consumir los alimentos inmediatamente después de cocinados
Guardar cuidadosamente los alimentos cocidos
Recalentar bien los alimentos
Evitar el contacto entre alimentos crudos y cocidos para evitar la contaminación cruzada
Lavarse la mano a menudo
Mantener la higiene personal
Mantener limpias todas las superficies donde se manipulen alimentos
Mantener los alimentos fuera del alcance de insectos, roedores y otros animales
Utilizar agua potable
Almacenar correctamente las materias primas y productos terminados
La preparación y manipulación de los alimentos son factores clave del desarrollo de las ETA. Por ello es fundamental capacitar a los manipuladores

Nota. Extraído de (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2022)

## **Capítulo III**

### **Envasado en Atmósfera Modificada**

El envasado en atmósfera modificada (MAP) es un procedimiento que consiste en la sustitución del aire del interior del envase por una determinada mezcla de gases antes de su cierre. Una vez que el envase se encuentra cerrado no se necesita ejercer un control adicional sobre la atmósfera en el interior del envase. Sin embargo, la composición de la atmósfera puede cambiar durante el almacenamiento como resultado de los procesos respiratorios del contenido o por disolución de algún tipo de gas en el producto. El envasado al vacío es un procedimiento en el que el aire es eliminado del interior del envase antes de su cierre sin la introducción de ningún tipo de gas. Esta técnica ha sido usada durante muchos años para productos como las carnes curadas y el queso, si bien, usualmente no se considera como una forma de envasado en atmósfera modificada. En el MAP, propiamente dicho, la atmósfera se modifica por uno de estos dos métodos: en el caso de bandejas, el aire se elimina por una bomba de vacío y se introduce una mezcla de gases apropiada previamente al sellado (Figura 17). En el caso de envases flexibles, como bolsas, el aire se desplaza del envase mediante aplicación de un chorro con la mezcla de gas, antes del cierre. (Brennan & Day, 2006, pág. 329)

**Figura 17**

*Tubo Verde 70% Anhídrido Carbónico – 30% Nitrógeno y Tubo Gris 100% Anhídrido Carbónico*

**Figura 18**

*Máquina de Envasadora de Embutación Profunda Multivac R085 – Vista Lateral*



**Figura 19**

*Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista Superior Fondo*



**Figura 20**

*Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista Frente*



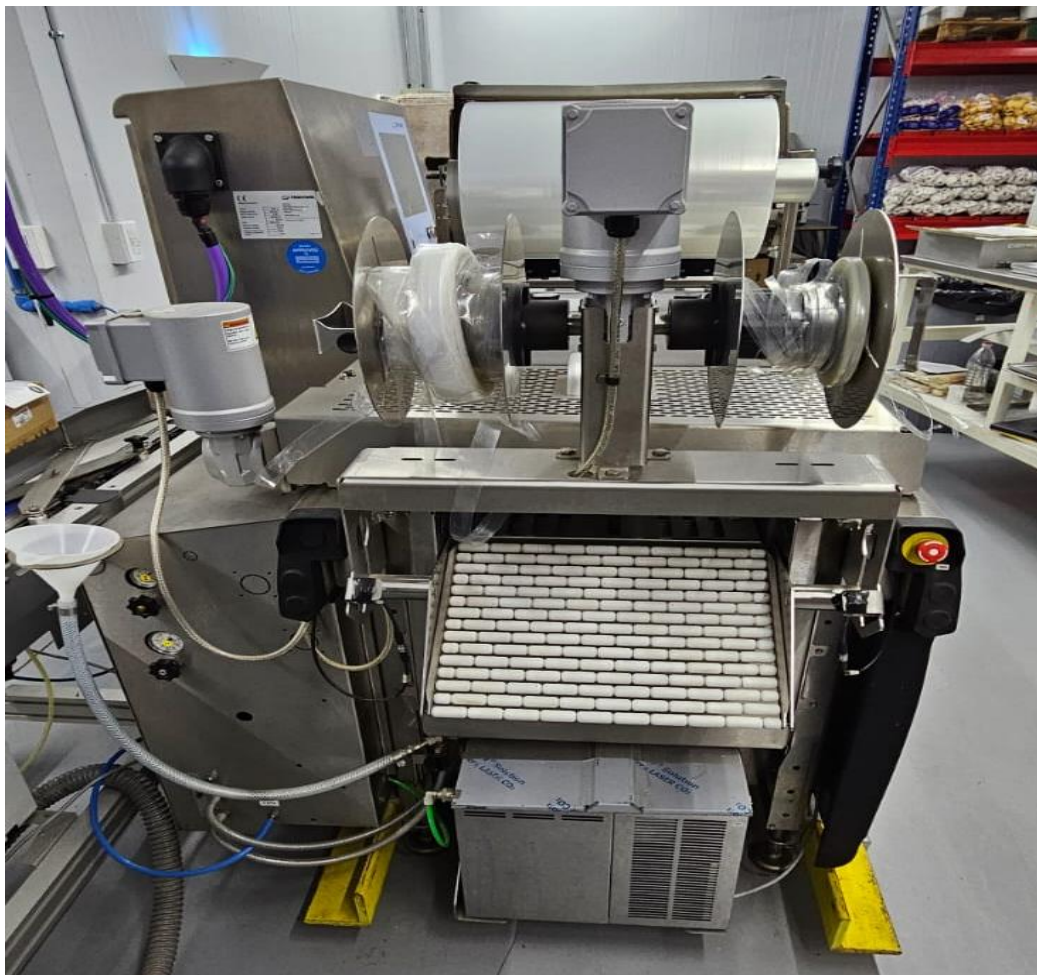
**Figura 21**

*Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista Frente Superior*



**Figura 22**

*Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista Fondo*

**Figura 23**

*Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista Superior Zona Media –  
Carga de Producto para Envasado Previo Sellado y/o Inyección de Gas*



**Figura 24**

*Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista Superior Zona Media –  
Carga de Producto para Envasado Previo Sellado y/o Inyección de Gas*



**Figura 25**

*Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista Superior Zona Media –  
Carga de Producto para Envasado Previo Sellado, Vacío y/o Inyección de Gas*

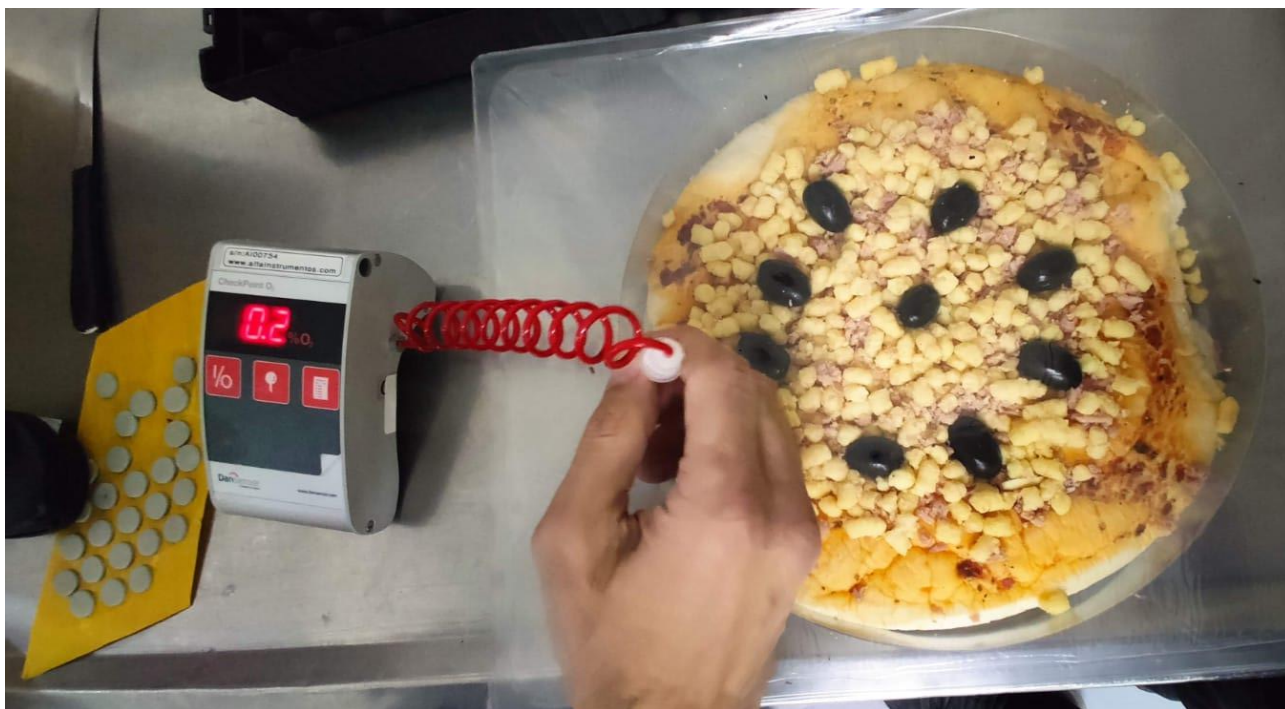
**Figura 26**

*Productos Envasados en Atmósfera Modificada*



**Figura 27**

*Ensayo de Medición Dentro del Envase del Oxígeno Residual, con Oxímetro, Previo Envasado en Atmósfera Modificada*



Para productos hortofrutícolas, puede desarrollarse en el interior del envase una atmósfera modificada como consecuencia de los procesos respiratorios propios del alimento

envasado. Así, la concentración de oxígeno en el interior del envase desciende, mientras aumenta la de dióxido de carbono; la composición que se alcance en el interior dependerá, en gran parte, de la tasa respiratoria del alimento y de la permeabilidad a los gases del material utilizado. (Brennan & Day, 2006, pág. 329)

Los gases que normalmente se utilizan para el envasado comercial en atmósferas modificadas son dióxido de carbono, nitrógeno y oxígeno.

El dióxido de carbono reacciona con el agua en el producto para formar ácido carbónico, el cuál disminuye el pH del alimento. También actúa inhibiendo el crecimiento de ciertos microorganismos, principalmente algunas bacterias aerobias y mohos.

Las bacterias ácido lácticas son resistentes al gas y pueden sustituir, a medida que avanza el almacenamiento, a la flora aerobia alterante en el envasado en atmósfera modificada de la carne. La mayor parte de las levaduras son resistentes a la acción del dióxido de carbono; mientras que la flora anaerobia, incluyendo aquellos microorganismos patógenos, se encuentran poco afectados por el mismo. En consecuencia, este sería un riesgo potencial de productos envasados en atmósfera modificada. Por tanto, se hace necesario un estricto control de temperatura para asegurar la seguridad de los alimentos envasados mediante MAP. Mediante la aplicación de dióxido de carbono en concentraciones del 5-50%, se puede inhibir el crecimiento de mohos y algunas bacterias aerobias gram negativas, como *Pseudomonas* spp. En general, cuanto mayor es la concentración del gas, mayor es su poder inhibitorio y cuanto menor es la temperatura de almacenamiento, más efectiva es la inhibición. Además, los microorganismos en la fase lag (fase de latencia) de crecimiento se ven más afectados. (Brennan & Day, 2006, pág. 330)

El nitrógeno no tiene un efecto directo sobre los microorganismos presentes en los alimentos, si bien, su acción se debe a que actúa como gas desplazante del oxígeno y, en

consecuencia, se puede inhibir la oxidación de las grasas. Como su solubilidad en agua es baja, se usa como material de relleno para prevenir que se colapsen los envases MAP cuando el dióxido de carbono se disuelve en el alimento. También se usa en el envasado de loncheados o alimentos triturados como el queso, que se puede apelmazar en condiciones de vacío.

El oxígeno se utiliza en el envasado de carnes rojas en atmósfera modificada con la finalidad de mantener el color rojo por oxigenación de la mioglobina y en el envasado de pescado blanco, para disminuir el riesgo de botulismo.

Otros gases con acción antimicrobiana, como el monóxido de carbono, que inhibe el crecimiento de muchas bacterias, mohos y levaduras, en concentraciones del 1%, tienen su uso comercial restringido debido a su naturaleza explosiva y a su toxicidad. Sin embargo, el dióxido de azufre se ha usado para inhibir el crecimiento de bacterias y mohos en frutas blandas y zumos de fruta. Recientemente, se ha confirmado la hipersensibilidad de algunas personas a este compuesto.

Los denominados gases nobles, argón, helio, neón y xenón, han sido utilizados en el MAP de algunos alimentos. Sin embargo, además de ser relativamente inertes, no se tiene constancia de los beneficios concretos que podrían aportar a esta tecnología.

Los envases MAP se presentan como bandejas termoformadas con hojas termoselladas o en bolsas. Con excepción de los que se utilizan para envasar productos frescos, se fabrican con materiales de baja permeabilidad a los gases ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ). Se usan laminados con varias combinaciones de poliéster (PET), cloruro de polivinilideno (PVdC), polietileno (PE) y poliamida (PA, nailon). La permeabilidad al oxígeno de estos laminados puede ser hasta de  $15 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ día}$  a una presión de 1 atmósfera (101 kPa). A continuación, se muestran algunos ejemplos de envasado en atmósfera modificada:

— Productos cárnicos: carne roja fresca envasada en una atmósfera de un 80% de oxígeno y un 20% de dióxido de carbono o 70% de oxígeno, 20% de dióxido de carbono y 10% de nitrógeno, con una vida media de 7-12 días a 2+1°C. La carne se coloca sobre una almohadilla absorbente, contenida en una bandeja con una cubierta termosellada. La carne de ave puede envasarse en atmósfera modificada en una mezcla de nitrógeno y dióxido de carbono. Sin embargo, no es práctica habitual por razón de coste. Las carnes cocidas y curadas pueden envasarse en una mezcla de dióxido de carbono y nitrógeno. (Brennan & Day, 2006)

— Pescado: pescado blanco fresco, envasado en una mezcla de 30% de oxígeno, 30% de nitrógeno y 40% de dióxido de carbono, con una vida útil de 10-14 días a una temperatura de 0°C. Estos envases no deben ser expuestos a temperaturas superiores a 5°C, por riesgo de botulismo. Los pescados grasos se envasan con mezclas de dióxido de carbono y nitrógeno. (Brennan & Day, 2006)

— Frutas y verduras: los fenómenos respiratorios permiten, en estos productos, aumentar la cantidad de dióxido de carbono y reducir el contenido de oxígeno. (Brennan & Day, 2006)

Este aumento de dióxido de carbono puede reducir la tasa respiratoria y ayudar a prolongar la vida útil del producto. Sin embargo, si el nivel de oxígeno se reduce por debajo del 2% se puede instaurar un fenómeno de respiración anaeróbica y el producto acaba por alterarse. El efecto del aumento de dióxido de carbono varía de un producto a otro. Algunas frutas y verduras pueden tolerar niveles altos del gas, mientras otras no. Cada fruta o verdura tiene un rango óptimo de gas en el envase, a partir del cual la vida útil es máxima. La selección de las películas para el envasado con una permeabilidad apropiada al vapor de agua y a los gases pueden permitir el desarrollo de esta composición óptima. Las frutas con una tasa respiratoria elevada necesitan ser envueltas en envases perforados; existiendo una amplia variedad de películas microperforadas con este uso. (Brennan & Day, 2006, pág. 331)

—Queso: porciones de queso duro pueden ser envasadas por inyección con un chorro de dióxido de carbono antes de su cierre. El gas será absorbido por el queso creando un vacío. Los quesos envasados de esta forma pueden tener una vida útil de más de 60 días. Para prevenir el colapso del envase, una pequeña cantidad de nitrógeno se insufla con el CO<sub>2</sub>. Los quesos madurados con mohos pueden envasarse con nitrógeno. (Brennan & Day, 2006)

—Productos de panadería y aperitivos: la vida útil de rollos de pan, bollos blandos y pan de pita puede aumentar significativamente por envasado en dióxido de carbono o mezclas de dióxido de carbono/nitrógeno. Las nueces y las patatas mejoran al envasarse con nitrógeno. (Brennan & Day, 2006)

—Pasta: la pasta fresca puede envasarse en atmósfera modificada con dióxido de carbono o nitrógeno. (Brennan & Day, 2006)

—Otros alimentos: pizza, quiche, lasaña y otros alimentos se pueden beneficiar también del envasado en atmósferas modificadas. Es importante tener en cuenta la implicación microbiológica de este tipo de envasado en dichos alimentos; manteniéndolos a bajas temperaturas durante el almacenamiento, la distribución, venta al detalle y en el hogar. (Brennan & Day, 2006, pág. 331)

## **Bioconservación**

En la industria alimentaria siempre se busca una alternativa para la disminución o evitar el uso de conservantes químicos, debido a que la población apunta hacia productos saludables, de origen natural, aunque muchas veces la composición fisicoquímica, microbiológica de base, y los tratamientos en el proceso de elaboración nos obliga como elaboradores a su uso para obtener un producto inocuo y evitar desviaciones en el lapso de vida útil que declaramos, como lo son las causadas por microorganismos alterantes y patógenos causantes de ETA.

A pesar de las tecnologías existentes puestas al servicio de la conservación de alimentos, el control de enfermedades transmitidas por alimentos sigue siendo un problema de gran importancia para la salud (Oliveira y col., 2015). Más aun, existen microorganismos capaces de superar el tratamiento físico o químico aplicado al alimento, lo que ha provocado que, en los últimos años, incrementen nuevamente las investigaciones en el campo de la conservación alimentaria hacia los procesos de fermentación. El control biológico se adapta bien con la tendencia actual de alimentos seguros y naturales y varias bacterias y levaduras se han identificado en este sentido. (Del Valle Rivero, 2018, pág. 28)

La bioconservación permite alargar la vida útil y la inocuidad de los alimentos mediante la utilización de microorganismos reconocidos como seguros por las autoridades y/o de sus metabolitos con el objetivo de inhibir el desarrollo de microorganismos ya sea, alterantes o patógenos en los alimentos. La finalidad es obtener alimentos con óptimas condiciones higiénico-sanitarias y que tengan un menor procesamiento, lo que los consumidores perciben como “más natural” (Sáez Orviz,2016).

Stiles (1996) define biopreservación como la extensión de la vida media e inocuidad de los alimentos mediante el empleo de su microbiota natural o autóctona y/o de sus metabolitos antimicrobianos, sin alterar negativamente sus propiedades organolépticas. Este sistema de

control biológico presenta un número de ventajas comparadas con otros métodos de conservación:

- El uso de microorganismos antagónicos es más seguro en comparación con la aplicación de conservantes químicos, ya que, no se acumulan en los alimentos. La microbiota nativa compite con los microorganismos patógenos y alterantes por el espacio físico, nutrientes y/o la producción de compuestos antagonistas que afecten su viabilidad (Parish, 2003).

- Pueden ser más persistentes en el tiempo que los tratamientos químicos lo que dificulta que los patógenos desarrollen resistencia a los mismos.

- Tienen efecto insignificante sobre el equilibrio ecológico de manera que no destruyen enemigos naturales de las especies indeseables como lo hacen los tratamientos tradicionales.

- Pueden ser compatibles con otros sistemas de control y por lo tanto pueden aplicarse en forma combinada. Es muy importante destacar que los microorganismos utilizados como agentes de control biológico deben poseer una alta actividad antagónica, ser seguros para la salud humana y no tener efectos adversos en la calidad sensorial y nutricional del producto.

- Mediante la adición de cepas en el producto alimenticio y favoreciendo la velocidad de crecimiento, de modo que actúen en competencia y eviten el desarrollo de microorganismos autóctonos potencialmente alterantes o patógenos.

- Mediante la aplicación de las sustancias antimicrobianas purificadas, producidas previamente por bacterias lácticas en un medio de cultivo específico.

- Mediante la adición de un cultivo concentrado de células con características protectoras.

- Mediante el agregado de bacterias lácticas mesófilas, de modo que sirvan como un “sistema de seguridad” cuando se produce una exposición del alimento a un aumento de temperatura no previsto.

## **Bacterias ácido lácticas (BAL) biopreservadoras**

El empleo de bacterias ácido lácticas (BAL) o sus metabolitos son un ejemplo de biopreservación o bioconservación. Este tratamiento se basa en la prolongación de la vida útil de los alimentos por medio de la producción de compuestos antimicrobianos producidos por determinados microorganismos, fundamentalmente BAL, ya sea por adición directa de estas o por medio de la aplicación de sus metabolitos. Se trata de un proceso natural o mediante la aplicación de compuestos naturales, con un enorme potencial de aplicación en gran variedad de productos alimentarios (Vuan Lanusse, 2018).

Además de contribuir en la biopreservación de los alimentos, las BAL mejoran las características sensoriales de los alimentos, como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva (Parra Huertas, 2010).

La acción conservadora de las BAL se debe a la inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y deteriorantes mediante la obtención de varios productos finales de la fermentación. Existen varios componentes antimicrobianos: ácidos tales como láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y productos secundarios generados por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocianato (Shirai et al., 1996).

La acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por las BAL generan una reducción de pH del ambiente produciendo un efecto inhibitorio de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. En ese sentido, la forma no disociada del ácido láctico puede penetrar en la pared celular de la bacteria patógena con mayor facilidad donde el pH más alto del contenido celular promueve la disociación, dando lugar a la liberación de iones hidrógeno y el anión correspondiente. De esta forma ambos iones interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento celular (Vásquez et al., 2009).

Las BAL tienen la capacidad de producir peróxido de hidrógeno a partir del oxígeno presente en el ambiente. Esta sustancia obtenida, genera radicales hidroxilo que causan la peroxidación de los lípidos de la membrana y por consecuencia la acción bactericida sobre gran cantidad de microorganismos patógenos (Ouweland y Vesterlund, 2004).

Las BAL tienen la capacidad de producir CO<sub>2</sub> como producto final de la fermentación heterofermentadora y a menudo se obtiene por descarboxilación de aminoácidos. El CO<sub>2</sub> presenta la capacidad de promover un ambiente anaerobio, reduce el pH y favorece la destrucción de la integridad de la pared celular microbiana (Sanchez Alzuria, 2015).

La producción de diacetilo por las BAL permite la fermentación de citrato y es sintetizado en el metabolismo intermediario del piruvato. La obtención de este compuesto tiene un objetivo tecnológico en la producción de aroma a manteca que le confiere a ciertos productos lácticos cultivados. La acción antimicrobiana del diacetilo se ha demostrado con 200 µg/ml para levaduras y 300 µg/ml para bacterias Gram positivas no lácticas (Ramírez et al., 2011).

Las bacteriocinas son moléculas que tienen estructura de tipo peptídica o proteínas biológicamente activas, que presentan acción bactericida ante receptores específicos de las células. Su composición química es variada y por consecuencia el modo de acción es específico (Vásquez et al., 2009).

Debido a la actividad antibacteriana frente a *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, las bacteriocinas producidas por las BAL han sido intensamente estudiadas (Camacho Sánchez, 2018).

### **Producción de bacteriocinas**

La producción de bacteriocinas generalmente ocurre durante la fase logarítmica tardía o la fase estacionaria temprana, y generalmente está influenciada por el mecanismo de detección

de quórum (mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular) o por cualquier signo de estrés (Martinez et al., 2013). Se diferencian de la mayoría de los antibióticos debido a su constitución proteica molecular que les permite degradarse rápidamente por las proteasas en el tracto digestivo humano (Parada et al., 2007).

Existen numerosas bacteriocinas producidas por las BAL y cada una tiene espectros de inhibición particulares. (Sablon et al., 2000).

Las bacteriocinas producidas por BAL (péptidos antimicrobianos sintetizados en los ribosomas) matan las bacterias en concentraciones mucho más bajas que los péptidos antimicrobianos eucarióticos, probablemente porque interactúan con un receptor específico presente en las células diana (Cotter et al., 2005, Drider et al., 2006).

Las bacteriocinas generalmente son clasificadas con base en sus características bioquímicas y genéticas en:

Clase I.- Lantibióticos: son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos esenciales como lantionina,  $\beta$ -metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo es la nisina.

Clase II.- No lantibióticos: son bacteriocinas de peso molecular variable, que contienen aminoácidos regulares. En este grupo se pueden identificar tres subclases:

Clase IIa: son péptidos activos contra *Listeria* y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.

Clase IIb: son formadores de complejos de poración que consisten en dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antibacteriana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.

Clase IIc: son péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

Clase III: son péptidos grandes mayores de 30 kDa, en esta clase se encuentran las helveticinas J y V, acidofilicina A, lactacinas A y B.

La bacteriocina utilizada generalmente en la industria alimentaria es la nisina. Es sintetizada de forma natural por *Lactococcus lactis subsp lactis* y ya se ha utilizado en más de 50 países como un aditivo antagónico para reducir el uso de aditivos químicos como los conservantes químicos. La nisina ya se ha aplicado a productos alimenticios (por ejemplo, productos lácteos) para inhibir la contaminación por patógenos, pero se limita a los patógenos grampositivos, principalmente *Listeria monocytogenes* (Cosentino et al., 2012).

## **Tabla 5**

*Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas y sus principales características*

Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas y sus principales características			
Especies productoras	Bacteriocina	Espectro de acción	Características
<b>Lactococcus lactis subsp. lactis</b>	Nisina	Bacteria Gram positiva	Lantibiótico clase I; 3,5 kDa; 34 amino ácidos; disponible comercialmente
	Lacticin 3147	Clostridium sp.	Lantibiótico dos componentes clase I; 4,2 kDa; estable al calor, activo bajo ácido y pH fisiológico
Listeria monocytogenes			
Staphylococcus aureus			
Streptococcus dysgalactiae			
Enterococcus faecalis			
Propionibacterium acne			
<b>Lactococcus lactis subsp. cremoris</b>	Lactococina B	Lactobacillus	Bacteriocina clase II; aprox. 5 kDa; estrecho efecto de acción
<b>Lactobacillus acidophilus</b>	Acidocina CH 5	Bacteria Gram positiva	Bacteriocina clase II; forma agregados de alto peso molecular
		Lactobacillus	
	Lactacina F	Lactobacillus fermentum	Bacteriocina clase II; 6,3 kDa; 57 aminoácidos estable al calor a 121°C por 15 min
		Lactobacillus faecalis	
		Lactobacillus delbrueckii	
		Lactobacillus helveticus	
	Lactacina B	Lactobacillus delbrueckii	Bacteriocina clase III; 6,3 kDa; estable al calor; detectado sólo en cultivos mantenidos entre pH 5 y pH 6
		Lactobacillus helveticus	
		Lactobacillus bulgaricus	
<b>Lactobacillus amylovorus</b>	Lactobina A	Lactobacillus acidophilus	Bacteriocina clase II; 4,8 kDa; 50 aminoácidos; estrecho efecto de acción
		Lactobacillus delbrueckii	
		Lactobacillus	
<b>Lactobacillus casei</b>	Lactocina 705	Listeria monocytogenes	Bacteriocina dos componentes clase II (33 aminoácidos cada componente); 3,4 kDa
Lactobacillus plantarum			
<b>Leuconostoc gelidum</b>	Leucocina A	Lactobacillus	Bacteriocina clase II; 3,9 kDa; 37 aminoácidos; estable a bajos valores de pH; incluso después del calentamiento (100°C por 20 min)
		Enterococcus faecalis	
		Listeria monocytogenes	
<b>Leuconostoc mesenteroides</b>	Mesentericina Y105	Enterococcus faecalis	Bacteriocina clase II; 3,8 kDa; 37 aminoácidos residuales; estable al calor (60°C por 120 min a pH 4,5)
		Listeria monocytogenes	
<b>Pediococcus acidolactici</b>	Pedocina F	Bacteria Gram positiva	Bacteriocina clase II; 4,5 kDa; sensible a enzimas proteolíticas; resistente al calor y a solventes orgánicos; activo bajo un amplio rango de pH
	Pedocina PA-1	Listeria monocytogenes	Bacteriocina clase II; 4,6 kDa; 44 aminoácidos
	Pedocina Ach	Bacteria Gram positiva y Gram negativa bajo situación de estrés	Bacteriocina clase II; 4,6 kDa; 44 aminoácidos; amplio espectro de acción
<b>Pediococcus pentosaceus</b>	Pedocina A	Lactobacillus	Bacteriocina clase II; 2,7 kDa; sensible a enzimas proteolíticas y estable al calor (10 min a 100°C)
		Lactococcus	
		Leuconostoc	
		Pediococcus	
		Staphylococcus	
		Enterococcus	
		Listeria	
Clostridium			
<b>Enterococcus faecium</b>	Enterocina A	Listeria monocytogenes	Bacteriocina clase II; 4,8 kDa; 47 aminoácidos residuales; estable al calor
		Pediococcus	
<b>Lactobacillus sake</b>	Lactocina S	Lactobacillus	Bacteriocina clase I; 3,7 kDa; activo entre pH de 4,5 y 7,5
		Leuconostoc	
		Pediococcus	
<b>Lactobacillus curvatus</b>	Curvacina A	Listeria monocytogenes;	Bacteriocina clase II, 4,3 kDa
		Enterococcus faecalis	
<b>Lactobacillus helveticus</b>	Helveticina J	Lactobacillus bulgaricus	Bacteriocina clase III; 37 kDa; estrecho espectro de acción; sensible a enzimas proteolíticas; reducción de actividad luego de los 100°C por 30 min
		Lactobacillus lactis	

Nota\*. Extraído de (Parada, Ricoy Caron, Bianchi P. Medeiros, & Soccol, 2007)

**Capítulo IV**  
**Marco Legal**

## **Código Alimentario Argentino (CAA)**

A continuación, veremos como referencia lo que nos indica el Código Alimentario Argentino en el Cap. 3 (De los Productos Alimenticios), Art. 156 tris sobre los productos que recaen dentro de la clasificación que denotan como preparaciones culinarias y describen, como lo son los sándwiches:

### ***Artículo 156 tris – (Resolución Conjunta SPReI y SAV N° 4 - E/2017)***

“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.

Quedan excluidos de esta definición todos aquellos alimentos contemplados en otras categorías del presente Código.

Se aplicarán los siguientes criterios a los alimentos que se dispensen en establecimientos con o sin cocina tales como restaurantes, comedores de colegios, empresas, hospitales, residencias, medios de transporte, entre otros, como así también a los alimentos producidos por establecimientos que se dedican a la elaboración de comidas preparadas, que se comercialicen para su consumo dentro o fuera del mismo tales como cocinas centrales, y establecimientos minoristas de comidas para llevar.

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.

Las comidas preparadas listas para el consumo deberán responder a las siguientes especificaciones microbiológicas: para las preparadas según los ítems I, II y III corresponde la tabla 1 (tabla 6) y para las preparadas según ítem IV corresponde la tabla 2 (tabla no adjuntada, ya que, no corresponde legalmente a los productos desarrollados a lo largo de ésta tesis).

En situaciones de riesgo epidemiológico que justifiquen una alerta sanitaria, podrán ser realizadas otras determinaciones microbiológicas, en función del problema.

## Tabla 6

Tabla 1 (Según Referencias del Código Alimentario Argentino (CAA))

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

- (1) o su versión más actualizada
- (2) En caso de llevar vegetales crudos no realizar esta determinación
- (3) Incluir sólo en alimentos con carnes
- (4) Incluir sólo en alimentos con papa, amiláceos, cereales
- (5) En alimentos a base de carne picada y/o vegetales crudos
- (6) E. coli productor de toxina shiga de los serogrupos: 0145, 0121, 026, 0111 y 0103.

Se tendrán en cuenta sólo los aislamientos positivos para los genes stx y eae, de los serogrupos mencionados

Además, debemos considerar lo que exige el Código Alimentario Argentino en el Cap. 9, Art. 747 y 749, que a continuación agregamos, ya que, el pan inglés es una materia prima del proceso de elaboración de los sándwiches que debemos considerar:

***Artículo 747 - (Dec. 61, 17.1.77)***

"Queda prohibida la circulación, tenencia y expendio de cualquier tipo o clase de pan, galletas, facturas de panadería y productos de pastelería que:

- a) Sean mal elaborados o no tengan buen aspecto.
- b) No sean frescos o se encuentre imperfectamente cocidos.
- c) Contengan sustancias extrañas a su composición normal.
- d) Se encuentren atacados por enfermedades criptogámicas, parásitos, alterados o averiados.
- e) Se encuentren mal conservados o mantenidos en condiciones antihigiénicas.

f) No se encuentren al abrigo de contaminaciones de cualquier naturaleza (mineral, orgánica o microbiana).

g) (Resolución Conjunta SPRyRS N° 31/2003 y SAGPYA N° 286/2003) Contenga aditivos no permitidos en los productos mencionados o en la harina utilizada para la elaboración de los mismos. En la elaboración del pan y de galletas cuyo contenido de humedad sea superior al 12,0%, queda permitido (sin declaración en el rótulo) el empleo de propionato de sodio y/o propionato de calcio como agente antimoho en las siguientes proporciones:

1) Productos elaborados con harinas blancas, hasta 0,32% del peso de la harina empleada.

2) Productos elaborados con harinas integrales o sus mezclas, así como las mezclas con harina blanca, hasta 0,38% del peso de la harina integral o de las mezclas".

***Artículo 749 - (Dec. 61, 17.1.77) (Res. 153, 9.05.95)***

"Queda permitido en la elaboración de panes de molde, enteros y en rodajas, panes tipo Viena, pizzas, pre-pizzas, tapas de empanadas y productos similares, que se comercializan envasados en origen, el empleo como inhibidor del desarrollo de hongos de una solución alcohólica de ácido sórbico y de ácido cítrico. Los productos deberán ser tratados por vaporización previo a su envasado y presentarán como máximo los siguientes niveles residuales: Ácido sórbico: 200 mg/kg. Alcohol etílico: 0,3% en volumen.

## **Diseño de la Investigación, Metodología, Materiales y Métodos**

Para el análisis in vitro del efecto del envasado en atmósfera modificada de los sándwiches se procedió a realizar el envasado de sándwiches de ambas variedades aplicando sólo atmósfera modificada (70% de anhídrido carbónico y 30% nitrógeno a 850 mbar de presión en el mismo) con 4 muestras de cada uno para realizar el respectivo análisis de vida útil para la cantidad de días estipulados, considerando el punto de partida el mismo día de elaboración como el análisis de base, luego a los 15 días, 21 días y finalmente a los 28 días.

Al observar el desarrollo de bacterias lácticas, las cuales ganan el medio, pero generan el hinchamiento del envase se procedió a emplear el uso de conservantes aplicados como inhibidor bacteriostático y no con la función de bactericida de las bacterias lácticas, ya que, las mismas al ganar el medio y generar bacteriocinas inhiben el desarrollo de bacterias patógenas, sin generar modificaciones de los caracteres organolépticos de los sándwiches.

Por esto mismo se procedió a utilizar tres tratamientos aplicando atmósfera modificada y conservante/s como propionato de calcio, ácido fumárico, y finalmente propionato de calcio en combinación con ácido fumárico, evaluados en el lapso de 28 días, a partir de la elaboración del producto.

Por último, se realizó un análisis in vitro del efecto inhibidor de lisozima en distintas concentraciones envasado en atmósfera modificada y otro con nisina envasado en atmósfera modificada, evaluados en el tiempo, viendo su evolución frente al hinchamiento del envase a 15 días, dejando una muestra como testigo sin la aplicación de ningún aditivo conservante.

Componentes de los sándwiches en pan inglés:

- fiambre cocido de cerdo, queso danbo y mayonesa
- jamón crudo, queso danbo y mayonesa

Cada una de las pruebas realizadas sólo con el envasado en atmósfera modificada como las pruebas con los distintos conservantes y envasados en envases con inyección de gas combinado entre 30% anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>) y 70% nitrógeno (N<sub>2</sub>) se realizó en la planta de elaboración de Virgen del Valle; las evaluaciones sensoriales y microbiológicas, como aislamiento de hongos e identificación de los mismos, detección y recuento de bacterias patógenas y alterantes se realizaron en el Laboratorio de Bromatología – Laboratorio de Salud del Hospital Lencinas y en el laboratorio “Lab-Care”; participando además en las evaluaciones sensoriales personal del centro de elaboración de Virgen del Valle.

### **Análisis Microbiológicos**

Los análisis microbiológicos para determinar la durabilidad de los sándwiches en función a lo solicitado por el Código Alimentario Argentino, se realizaron por etapas para verificar con el paso del tiempo cómo se comportaba microbiológicamente, en primer lugar, se realizaron las determinaciones microbiológicas de los microorganismos citados en la tabla 1 (Tabla 6) del Art. 156 tris del Código Alimentario Argentino (de acuerdo a la forma de preparación de nuestros sándwiches donde no atraviesan un tratamiento térmico se clasifican en las tipo I, y sus correspondientes análisis son los encuadrados en la “tabla 1”(Tabla 6)) y los nombrados como control de calidad interna, el mismo día de la recepción de la muestra o en su defecto al día siguiente de la elaboración del producto, y posteriormente a los 14, 21 y 28 días.

Los siguientes análisis microbiológicos fueron realizados en el Laboratorio Bromatológico del Hospital Lencinas:

**Tabla 7**

## Análisis Microbiológicos a Sándwiches

<b>Determinación</b>	<b>Método</b>
RECUENTO DE AERÓBIOS MESÓFILOS	ISO 4833:2003 BAM-FDA:2001
RECUENTO DE ANAERÓBIOS SULFITO REDUCTORES	ISO 15213:2003
SALMONELLA SPP.	ISO 6579:2002, Co: 2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS:2011
RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS	ISO 21528-2:2004 ICMSF
RECUENTO DE E. COLI	ISO 16649-3:2005 ICMSF (método 1) BAM-FDA:2002 (método 1)
RECUENTO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVA	ISO 6888-3:1999 ICMSF

Nota. 4°C - MAP (CO<sub>2</sub> 70% - N<sub>2</sub> 30%) - 825 mbar a 850 mbar - Laboratorio Bromatológico del Hospital Lencinas

- Caracteres Organolépticos.

Los siguientes análisis microbiológicos fueron realizados en el laboratorio Lab- Care:

**Tabla 8***Análisis Microbiológicos a Sándwiches*

<b>Determinación</b>	<b>Método</b>
RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS	AFNOR (059:1995)
RECUENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS	Anaerobiosis en MRS
INV. LISTERIA MONOCYTOGENES	ISO 11290-2: 1998
RECUENTO DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	ISO 7937
SHIGELLA SPP.	BAM 8a Edic. Cap. 6
RECUENTO DE BACILLUS CEREUS	ISO 7932

Nota. 4°C - Análisis Carga Microbiana Inicial - Laboratorio Lab-Care

**Figura 28***Sándwiches Envasados en Atmósfera Modificada – Vista Superior*

**Figura 29**

*Sándwiches Envasados en Atmósfera Modificada – Vista Lateral*



### Características de la Composición de los Envases

**Tabla 9**

*Composición del Laminado del Fondo de los Envases Usados para Envasado en Atmósfera Modificada*

DESCRIPCIÓN GENERAL	TIPO DE LÁMINAS	LAMINADO		
		LAMINADOS (DE AFUERA HACIA ADENTRO)	MICRONAJE	FUNCIÓN/USOS
Apto en condiciones higiénico-sanitario laminado PET/PEBD pelable con barrera: laminado PET sin pigmentar o blanco o negro con extrudado de (EVA/EVA/EVOH/EVA/polietileno de baja densidad/polibutileno), cara int.	FONDO RIGIDO ALTA BARRERA	APET/EVOH/PE	400 MICRONES	Contener alimento, tipo I (acuoso no ácidos pH > 5), II (acuoso ácidos pH < 5), IIIa, IIIb (acuoso no ácidos y acuoso ácidos que contengan grasas y/o aceites), IV (grasos) o VI (de extracción poco significativa) durante el proceso de conservación a temperatura ambiente o menor.

Nota. PA= Poliamida; EVOH=Etilen-Vinil-Alcohol; PE= Polietileno; APET= Tereftalato de Polietileno Amorfo; PP= Polipropileno

**Tabla 10****Composición del Laminado de la Tapa de los Envases Usados para Envasado en Atmósfera Modificada**

LAMINADO				
DESCRIPCIÓN GENERAL	TIPO DE LÁMINAS	LAMINADOS (DE AFUERA HACIA ADENTRO)	MICRONAJE	FUNCIÓN/USOS
Apto en condiciones higiénico-sanitario coextrudado: film cast de alta barrera para "tapa", conformado por PA (con tratamiento corona) en cara externa, y LLDPE cara en contacto con el alimento, sin pigmentos y sin impresión.	FILM ALTA BARRERA PARA TAPA	PA/EVOH/PE	75 MICRONES	Contener alimento, tipo I (acuosos no ácidos pH > 5), II (acuosos ácidos pH < 5), IIIa, IIIb (acuosos no ácidos y acuosos ácidos que contengan grasas y/o aceites), IV (grasos) o VI (de extracción poco significativa) durante el proceso de conservación a temperatura máxima de 100°C y mínimo -18°C, durante 6 meses.

\*Nota. PA= Poliamida; EVOH=Etilen-Vinil-Alcohol; PE= Polietileno; APET= Tereftalato de Polietileno Amorfo; PP= Polipropileno

**Tabla 11****Composición de la Atmósfera Usada Dentro del Envase para el Envasado en Atmósfera Modificada de Sándwiches**

ENVASE						
ATMÓSFERA	COMPOSICIÓN ATMÓSFERA	PRESIÓN DE GAS	CANTIDAD DE UNIDADES	PESO POR UNIDAD	PESO TOTAL	FORMA Y MEDIDAS
MODIFICADA	30% NITRÓGENO (N <sub>2</sub> ) - 70% ANHÍDRIDO CARBÓNICO (CO <sub>2</sub> )	850 MBAR	POR 6 UNIDADES	120 g	750 g	RECTANGULAR (18,2 cm largo x 13,5 cm ancho x 8 cm profundidad)

Figura 30

Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Jamón Crudo, Mayonesa y Queso Danbo

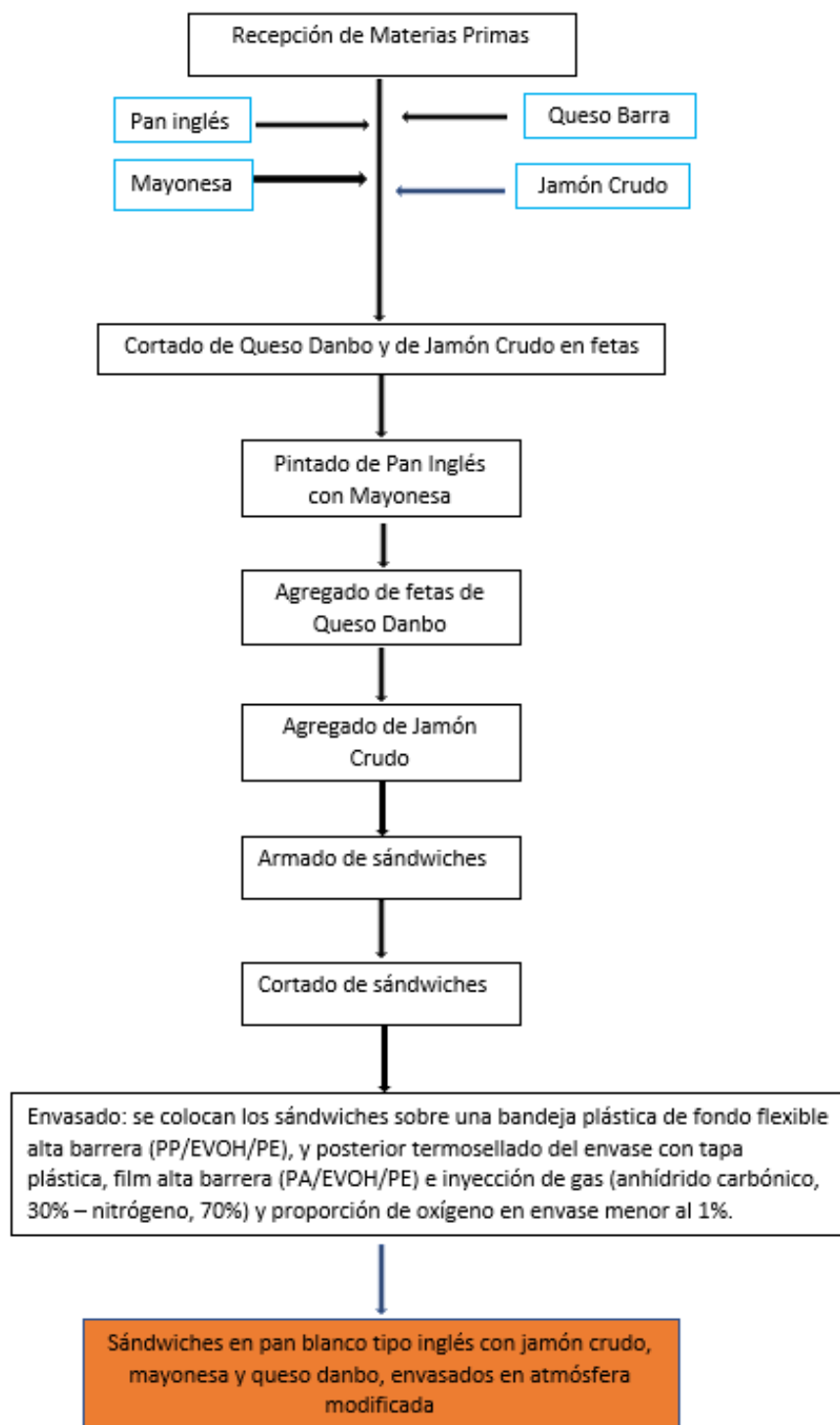
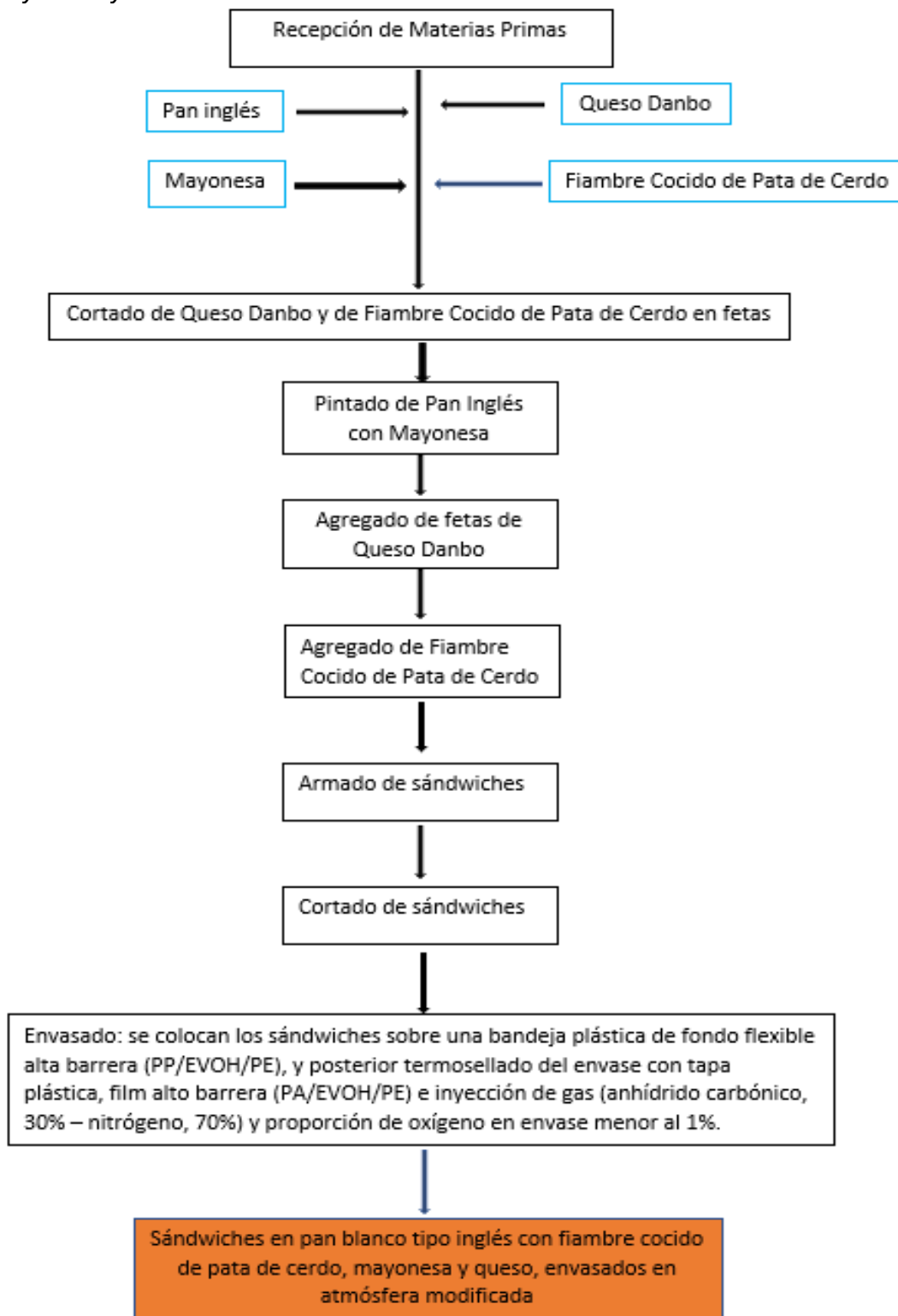


Figura 31

Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Mayonesa y Queso Danbo



## Resultados y Discusión

## Fase I. Análisis nutricionales

A continuación, podemos ver los análisis nutricionales realizados a los sándwiches en estudio, a modo de comprender la composición de su matriz nutricional y la disponibilidad que significa la misma para el desarrollo de microorganismos (tabla 12 y tabla 13).

**Tabla 12**

*Composición Nutricional de los Sándwiches en Pan Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Queso Danbo y Mayonesa*

SÁNDWICHES EN PAN INGLÉS CON JAMÓN COCIDO DE PATA DE CERDO, QUESO DANBO Y MAYONESA		
INFORMACIÓN NUTRICIONAL	PORCIÓN 120g (1 unidad)	
	CANTIDAD POR PORCIÓN	%VD (*)
VALOR ENERGÉTICO	331 Kcal = 1389 kJ	17
CARBOHIDRATOS	37 g	12
AZÚCARES TOTALES	0,9 g	–
PROTEÍNAS	14 g	18
GRASAS TOTALES	14 g	26
GRASAS SATURADAS	4,2 g	19
FIBRA ALIMENTARIA	0,6 g	2
SODIO	523 mg	22
NO APORTA CANTIDADES SIGNIFICATIVAS DE AZÚCARES AÑADIDOS Y GRASAS TRANS		
*% VALORES DIARIOS CON BASE A UNA DIETA DE 2.000 KCAL U 8400 KJ		
SUS VALORES DIARIOS PUEDEN SER MAYORES O MENORES DEPENDIENDO DE SUS NECESIDADES ENERGÉTICAS		

Nota. Análisis nutricional realizado en la Facultad de Ciencias Agrarias

**Tabla 13**

*Composición Nutricional de los Sándwiches en Pan Inglés con Jamón Crudo, Queso Danbo y Mayonesa*

SÁNDWICHES EN PAN INGLÉS CON JAMÓN CRUDO, QUESO DANBO Y MAYONESA		
INFORMACIÓN NUTRICIONAL	PORCIÓN 120g (1 unidad)	
	CANTIDAD POR PORCIÓN	%VD (*)
VALOR ENERGÉTICO	331 Kcal = 1391 kJ	17
CARBOHIDRATOS	30 g	10
AZÚCARES TOTALES	1,0 g	-
PROTEÍNAS	15 g	20
GRASAS TOTALES	17 g	31
GRASAS SATURADAS	8,1 g	37
FIBRA ALIMENTARIA	2,2 g	9
SODIO	1214 mg	51
NO APORTA CANTIDADES SIGNIFICATIVAS DE AZÚCARES AÑADIDOS Y GRASAS TRANS		
*% VALORES DIARIOS CON BASE A UNA DIETA DE 2.000 KCAL U 8400 KJ		
SUS VALORES DIARIOS PUEDEN SER MAYORES O MENORES DEPENDIENDO DE SUS NECESIDADES ENERGÉTICAS		

Nota. Análisis nutricional realizado en la Facultad de Ciencias Agrarias

Pero éstas matrices es un conjunto de ingredientes que se encuentran en la misma en distintas proporciones como se expone (tabla 14 y tabla 15).

**Tabla 14**

*Porcentaje de los Ingredientes que Conforman los Sándwiches en Pan Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Queso Danbo y Mayonesa*

Sándwiches en pan inglés con fiambre cocido de pata de cerdo, queso danbo y mayonesa			
Insumos	Cantidad	Porcentaje	Peso Total
Pan inglés	40 g	33,33%	120 g
Fiambre cocido de pata de cerdo	30 g	25%	
Queso danbo	25 g	20,83%	
Mayonesa	25 g	20,83%	

**Tabla 15**

*Porcentaje de los Ingredientes que Conforman los Sándwiches en Pan Inglés con Jamón Crudo, Queso Danbo y Mayonesa*

Sándwiches en pan inglés con jamón crudo, queso danbo y mayonesa			
Insumos	Cantidad	Porcentaje	Peso Total
Pan inglés	40 g	33,33%	120 g
Jamón crudo	30 g	25%	
Queso danbo	25 g	20,83%	
Mayonesa	25 g	20,83%	

## Fase II. Aislamiento e identificación de hongos propios del pan de miga.

Los productos panificados son altamente perecederos y presentan cambios en el sabor, pérdida de humedad y endurecimiento. Además, son afectados a nivel microbiológico por hongos y bacterias; y a menor escala por levaduras (Salgado-Nava y Jiménez-Munguía 2012). Los productos panificados se consideran comercialmente estériles una vez salidos del horneado debido al efecto de las altas temperaturas en la inactivación y eliminación de microorganismos, sin embargo, su posterior manipulación permite la recontaminación por hongos, comúnmente, del género *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.* (Moore et al. 2007). La proliferación de éstos afecta las características sensoriales, pero además se da la producción de una toxina por parte del *Aspergillus* (aflatoxina); la cual es nociva para la salud humana ya que es considerada como un cancerígeno potencial (Miranda Castro et al. 2012).

Es por este motivo que decidimos realizar la caracterización in vitro de los microorganismos presentes en el pan inglés y la proporción de conservantes que se encuentran en el mismo.

**Tabla 16**

### *Caracterización In Vitro de los Microorganismos Presentes en el Pan Inglés*

Pan Inglés de Descarte				
Análisis Microbiológicos	Caracterización de microorganismos (crecieron 12 colonias)			Recuento de <i>Bacillus cereus</i> UFC/g
	<i>Leuconostoc Citreum</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Staphylococcus</i>	
Porcentaje	50%	41,70%	8,30%	ND
Referencias	ND/(-)= NO DETECTADO A=AUSENCIA D/(+)=DETECTADO DNPC=DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR			

Nota. Análisis realizado en Laboratorio Lab-Care

### ***Caracterización de microbiotas en pan de sándwich con olor desagradable.***

### ***Wickerhamomyces anomalus (Pichia anómala)***

*Pichia anomala* es una especie de hongo ascomiceto y teleomórfico del género *Pichia*. Se utiliza como preventivo (agente de biocontrol) para hongos indeseables o moho, sin embargo, puede estropear los alimentos en grandes cantidades. Se utiliza en la elaboración de vino (Departamento de Viticultura y Enología - Universidad de California, 2016), granos almacenados herméticos (previniendo las aflatoxinas de *Aspergillus flavus*), manzanas y vides. *P. anomala* ha sido reclasificada como *Wickerhamomyces anomalus*. (Fredlund, Passoth, Sauer, Johan, & Blank, 2004)

Distinguida de algunas otras especies de *Pichia* por su alta osmotolerancia, *Wickerhamomyces anomalus* fermenta sacarosa y asimila la rafinosa. No exhibe efecto crabtree (el efecto Crabtree describe el fenómeno a través del cual la levadura *Saccharomyces cerevisiae* produce alcohol (etanol) en condiciones aerobias y con una gran concentración de glucosa externa en lugar de producir biomasa mediante el ciclo de Krebs, proceso que ocurre mayoritariamente en todas las levaduras) sino más bien efecto Pasteur (El efecto Pasteur es un efecto de inhibición de la fermentación alcohólica debido a la participación de oxígeno (O<sub>2</sub>)). (Departamento de Viticultura y Enología - Universidad de California, 2016)

Los productos obtenidos son etanol bajo anaerobiosis, acetato bajo crecimiento respiratorio y respirofermentativo. Acetato de etilo de glucosa bajo limitación de oxígeno, también otros volátiles pequeños, por ejemplo: propanoato de etilo, etanol fenilo y acetato de 2-feniletilo; glicerol; bajo estrés osmótico y limitación de oxígeno: arabinitol y trehalosa. (Departamento de Viticultura y Enología - Universidad de California, 2016)

### ***Leuconostoc citreum***

*Leuconostoc* spp. son obligatoriamente LAB heterofermentativas y metabolizan la glucosa a través de la vía de la fosfocetolosa. Producen 1 mol de lactato, etanol y CO<sub>2</sub> como productos finales del metabolismo de 1 mol de glucosa. El principal ácido láctico producido es del isómero D. (Instituto Valenciano de Microbiología, 2018)

*Leuconostoc* es un coco no móvil, no formador de esporas, generalmente se presenta en pares o cadenas. Su metabolismo heterofermentativo utiliza una combinación de las vías de pentosa fosfato y fosfocetolasa para la absorción de azúcar. Dado que pueden producir ácido láctico y diacetilo, *Leuconostoc* spp. se utilizan en la fabricación de algunos alimentos fermentados. Por lo tanto, generalmente están presentes en cultivos iniciadores mesófilos de tipo L y tipo DL. En el kéfir, el yogur y el queso, el diacetilo da el sabor y aroma mantecoso. Algunos ejemplos incluyen *L. mesenteroides* (*subsp. cremoris* y *dextranicum*), *L. lactis* y *L. citreum*. (Instituto Valenciano de Microbiología, 2018)

*Leuconostoc citreum*, un tipo de bacteria probiótica de grado alimenticio, juega un papel importante en la fermentación de alimentos y los probióticos intestinales. La especie *Leuconostoc citreum* a menudo se aísla de fermentaciones de granos y vegetales como masa madre, chucrut y kimchi. (Instituto Valenciano de Microbiología, 2018)

### ***Staphylococcus epidermidis***

*S. epidermidis*, es un coco Gram positivo, coagulasa negativa, que durante muchos años fue considerado parte del microbiota normal de piel y conjuntiva; se ha relacionado su patogenicidad con la capacidad de producir biofilmes. (Clínica Universidad de Navarra, 2023)

El biofilm es un polisacárido extracelular que promueve la adhesión célula-célula. La formación de biofilm se realiza en dos fases: primero, la bacteria se adhiere a la superficie inanimada y en un segundo paso la unión célula-célula y su acumulación en multicapas depende

de la habilidad de las células para formar la adhesina intercelular polisacárida (PIA). El biofilm representa sociedades microbianas con sus propias defensas y sistemas de comunicación, confiere a las bacterias protección a diferentes agentes antimicrobianos. (Clínica Universidad de Navarra, 2023)

### ***Conservantes Presentes en Pan Tipo Inglés***

Como podemos observar (Tabla 17) las proporciones de conservantes como el sorbato de potasio y benzoato de sodio que contiene el pan inglés no son las ideales frente a hongos, levaduras y bacterias. Sin embargo, si contiene una buena proporción de propionato de calcio.

**Tabla 17**

*Proporción de Conservantes Presentes en Pan Inglés*

<b>Pan Inglés</b>			
<b>Análisis Físicoquímico</b>	<b>Método HPLC</b>		
	<b>Sorbato de Potasio</b>	<b>Benzoato de Sodio</b>	<b>Propionato de Calcio</b>
<b>Detección de Conservantes</b>	7,5 ppm	30 ppm	0,31 g%g
<b>Referencias ND/(-)= NO DETECTADO A=AUSENCIA D/(+)=DETECTADO DNPC=DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR</b>			

Nota. Análisis realizado en Laboratorio Lab-Care

### **Fase III. Análisis de vida útil sin conservantes, sólo con inyección en envase de atmósfera modificada. Evaluación Sensorial.**

Análisis Microbiológicos realizados en Laboratorio Bromatológico – Laboratorio de Salud Pública del Hospital Lencinas:

En fin, de determinar la vida útil de los sándwiches:

- Pan inglés con fiambre cocido de pata de cerdo, queso danbo, y mayonesa.
- Pan inglés con jamón crudo, queso danbo, y mayonesa.

Se realizaron los análisis microbiológicos indicados por legislación en el Art. 156 tris del Código Alimentario Argentino, y otros análisis de control interno para evaluar calidad de los mismos como son el:

- Recuento de hongos y levaduras.
- Recuento de bacterias lácticas.
- Recuento de anaerobios sulfito reductores.
- Recuento de aerobios mesófilos.
- Caracteres organolépticos.

Veremos a continuación los resultados:

#### **Tabla 18**

*Análisis Microbiológicos Sándwiches en Pan Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Queso Danbo y Mayonesa*

Sándwiches en pan inglés con jamón cocido de pata de cerdo, queso danbo y mayonesa							
Análisis Microbiológicos	Recuento de Anaerobios Sulfito Reductores UFC/g	Recuento de aerobios mesófilos UFC/g	Salmonella spp. Salmonella/25g	Recuento de Enterobacterias UFC/g	Recuento de E. Coli NMP/g	Recuento de Estafilococos coagulasa positiva NMP/g	Caracteres Organolépticos
Día 1	<10	1,1.10 <sup>6</sup>	ND	<10	<0,3	<3	Normales
Día 15	<10	3,1.10 <sup>5</sup>	ND	<10	<0,3	<3	Normales
Día 21	<10	3,0.10 <sup>6</sup>	ND	<10	<0,3	<3	Normales
Día 28	<10	6,0.10 <sup>5</sup>	ND	<10	<0,3	<3	Se observa en los bordes del sándwich pérdida de humedad
Referencias		ND/(-)= NO DETECTADO A=AUSENCIA D/(+)=DETECTADO DNPC=DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR					

Nota. 4°C - MAP (CO<sub>2</sub> 70% - N<sub>2</sub> 30%) - 825 mbar a 850 mbar - Laboratorio Bromatológico del Hospital Lencinas

**Tabla 19**

*Análisis Microbiológicos Sándwiches en Pan Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Queso Danbo y Mayonesa*

Sándwiches en pan inglés con jamón cocido de pata de cerdo, queso danbo y mayonesa						
Análisis Microbiológicos	Recuento de mohos y levaduras UFC/g	Recuento de Bacterias Ácido Lácticas UFC/g	Listeria monocytogenes Listeria/25g	Recuento de Clostridium perfringens UFC/g	Shigella spp. UFC/25g	Recuento de Bacillus cereus UFC/g
Día 1	60	4,8.10 <sup>3</sup>	ND	<10	ND	<100
Día 15	330	2,1.10 <sup>7</sup>	ND	<10	ND	<100
Día 21	150	8,9.10 <sup>7</sup>	ND	<10	ND	<100
Día 28	1,3.10 <sup>3</sup>	9,4.10 <sup>7</sup>				
Referencias		ND/(-)= NO DETECTADO A=AUSENCIA D/(+)=DETECTADO DNPC=DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR				

Nota. 4°C - MAP (CO<sub>2</sub> 70% - N<sub>2</sub> 30%) – 825 mbar a 850 mbar - Laboratorio Lab-Care

**Tabla 20**

*Análisis Microbiológicos Sándwiches en Pan Inglés con Jamón Crudo, Queso Danbo y Mayonesa*

Sándwiches en pan inglés con jamón crudo, queso danbo y mayonesa							
Análisis Microbiológicos	Recuento de Anaerobios Sulfito Reductores UFC/g	Recuento de aerobios mesófilos UFC/g	Salmonella spp. Salmonella/25g	Recuento de Enterobacterias UFC/g	Recuento de E.Coli NMP/g	Recuento de Estafilococos coagulasa positiva NMP/g	Caracteres Organolépticos
Día 1	< 10	5,0.10 <sup>5</sup>	ND	< 10	< 0,3	< 3	Normales
Día 15	< 10	3,2.10 <sup>5</sup>	ND	< 10	< 0,3	< 3	Normales
Día 21	< 10	1,7.10 <sup>6</sup>	ND	< 10	< 0,3	< 3	Normales
Día 28	< 10	6,0.10 <sup>5</sup>	ND	< 10	< 0,3	< 3	Se observa en los bordes del sándwich pérdida de humedad
Referencias ND/(-)= NO DETECTADO A=AUSENCIA D/(+)=DETECTADO DNPC=DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR							

Nota. 4°C - MAP (CO2 70% - N2 30%) - 825 mbar a 850 mbar - Laboratorio Bromatológico del Hospital

Lencinas

### Tabla 21

#### Análisis Microbiológicos Sándwiches en Pan Inglés con Jamón Crudo, Queso Danbo y Mayonesa

Sándwiches en pan inglés con jamón crudo, queso danbo y mayonesa						
Análisis Microbiológicos	Recuento de mohos y levaduras UFC/g	Recuento de Bacterias Ácido Lácticas UFC/g	Listeria monocytogenes Listeria/25g	Recuento de Clostridium perfringens UFC/g	Shigella spp. UFC/25g	Recuento de Bacillus cereus UFC/g
Día 1	70	5,9.10 <sup>3</sup>	ND	< 10	ND	< 100
Día 15	320	2,4.10 <sup>6</sup>	ND	< 10	ND	< 100
Día 21	70	1,0.10 <sup>7</sup>	ND	< 10	ND	< 100
Día 28	109	9,8.10 <sup>4</sup>				
Referencias ND/(-)= NO DETECTADO A=AUSENCIA D/(+)=DETECTADO DNPC=DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR						

Nota. 4°C - MAP (CO2 70% - N2 30%) – 825 mbar a 850 mbar - Laboratorio Lab-Care

Los análisis microbiológicos exigidos cumplen aún a los 28 días con el Art. 156 tris del Código Alimentario Argentino.

En base a los análisis vemos que la carga microbiana de bacterias lácticas (no patógenas), de base en el producto, es elevado y el ambiente anaeróbico favorece su desarrollo, junto con la acidez y pH óptimo como vemos a continuación:

**Tabla 22**

*Análisis Físicoquímicos Sándwiches en Pan Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Queso Danbo y Mayonesa*

Sándwiches en pan inglés con fiambre cocido de pata de cerdo, queso danbo y mayonesa			
Análisis Físicoquímicos	Método	Unidad	Resultado
pH	ISO 1842	-	6,04
Acidez	Tit. Na(OH)/AOAC 940.28	g%g ác. cítrico	0,37

Nota. 4°C - pH inicial - acidez inicial - Laboratorio Lab-Care

Esto permite interponerse al desarrollo de hongos y levaduras, junto a la proporción mínima de oxígeno en el envase luego de realizarse la inyección de la combinación de gases nitrógeno y anhídrido carbónico (proporción 70% - 30 %), en una cantidad en el envase hasta alcanzar una presión dentro del mismo de 800 – 825 mbar, lo cual crea una atmósfera modificada donde la proporción de oxígeno es menor al 1%, el mismo es indispensable para el desarrollo de hongos y levaduras (principalmente para su multiplicación), y todo microorganismo aeróbico.

Sin embargo el aspecto de un producto envasado con una elevada carga microbiana de bacterias lácticas puede representar un problema de tipo comercial, por las fermentaciones que pueden generar en anaerobiosis (homofermentativas y heterofermentativas), y los gases que liberan, provocando junto con el gas propio de la inyección realizada de atmósfera modificada, que se hinche el envase, lo cual da mal aspecto comercialmente, lo que se suele asociar a un producto en descomposición aquellos envases hinchados (Figura 32), pero como vemos en los análisis realizados aún a los 28 días de envasado, no presentó ningún tipo de alteración en sus caracteres organolépticos. Sólo presentó a los 28 días una pérdida de humedad en los bordes del pan.

**Figura 32**

*Envases Hinchados con Sándwiches en Pan Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Queso Danbo, y Mayonesa, con una Elevada Carga Microbiana de Bacterias Lácticas*



En base a la problemática que representa el aspecto de un envase hinchado, es que se debe recurrir a algún aditivo de tipo conservante permitido, que inhiba el crecimiento de las bacterias lácticas al punto de no superar el nivel de  $1 \times 10^5$  (UFC/g), ya que, la cantidad de base que se encuentra en el producto es de entre  $1 \times 10^4$  (UFC/g) y  $1 \times 10^5$  (UFC/g), verificado por análisis tanto como en el producto, como en dos de los ingredientes, que por sus características y composición favorecen su desarrollo en su matriz, estos son el fiambre cocido de pata de cerdo con mayonesa y el queso danbo con mayonesa, a continuación se exhiben los análisis microbiológicos que lo comprueba:

### **Tabla 23**

*Análisis de Recuento de Bacterias Lácticas en Fetas de Fiambre Cocido de Pata de Cerdo*

Fetas de jamón cocido		
Análisis Microbiológico	Recuento de Bacterias Ácido Lácticas UFC/g	Recuento de mohos y levaduras UFC/g
Sin aditivos - Día 1	3,0.10 <sup>4</sup>	< 10
Referencias ND/(-)= NO DETECTADO A=AUSENCIA D/(+)=DETECTADO DNPC=DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR		

Nota. 4°C - Análisis Carga Microbiana Inicial de Bacterias Lácticas - Laboratorio Lab-Care

#### Tabla 24

#### *Análisis de Recuento de Bacterias Lácticas en Fetas de Queso Danbo*

Fetas de queso danbo		
Análisis Microbiológico	Recuento de Bacterias Ácido Lácticas UFC/g	Recuento de mohos y levaduras UFC/g
Sin aditivos - Día 1	1,0.10 <sup>4</sup>	< 10
Referencias ND/(-)= NO DETECTADO A=AUSENCIA D/(+)=DETECTADO DNPC=DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR		

Nota. 4°C - Análisis Carga Microbiana Inicial de Bacterias Lácticas - Laboratorio Lab-Care

#### **Fase IV. Análisis in vitro del efecto de inhibición de los distintos conservantes y sus combinaciones en la vida de anaquel. Evaluación Sensorial.**

Como vemos el desafío está en mantener el producto hasta los 28 días de conservación sin superar el desarrollo de bacterias lácticas  $1 \times 10^5$  (UFC/g). Es por eso que los aditivos por los que se optaron para realizar las pruebas y que cumplan la función de bacteriostático, bacteriolítico o bactericida (principalmente las dos primeras funciones se prefieren) de las bacterias lácticas fueron los siguientes:

- Ácido fumárico.
- Propionato de Calcio.
- Nisina.
- Lisozima.

Cabe destacar que el agregado de los aditivos se realizó en la mayonesa, ya que, es la fase dispersa que está en contacto con todo el producto, siendo una emulsión, desde el punto de vista físico-químico, del tipo aceite en agua (O/W = oil in water). Posteriormente realizando un batido intenso de la misma favoreciendo la homogeneización de los aditivos en la misma. A continuación, veremos la descripción de los ensayos, las concentraciones de los aditivos en los sándwiches y sus respectivos diagramas de flujo para su elaboración:

#### **Tabla 25**

*Ensayos y Proporción de los Aditivos Ensayados por Unidad de Sándwich*

<b>ENSAYOS</b>	<b>ADITIVO</b>	<b>CANTIDAD EN 120g (peso sándwich)</b>
Ensayo 1	Ácido Fumárico (AF)	50 mg
Ensayo 2	Propionato de Calcio (PC)	82,5 mg
Ensayo 3	Ácido Fumárico y Propionato de Calcio (combinación)	50 mg (AF) y 82,5 mg (PC)
Ensayo 4	Lisozima	12,5 mg
Ensayo 5	Lisozima	25 mg
Ensayo 6	Lisozima	50 mg
Ensayo 7	Nisina	2 mg
Ensayo 8	Sin Aditivo	-

Figura 33

Ensayo 1 (Ácido Fumárico) - Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Mayonesa y Queso Danbo

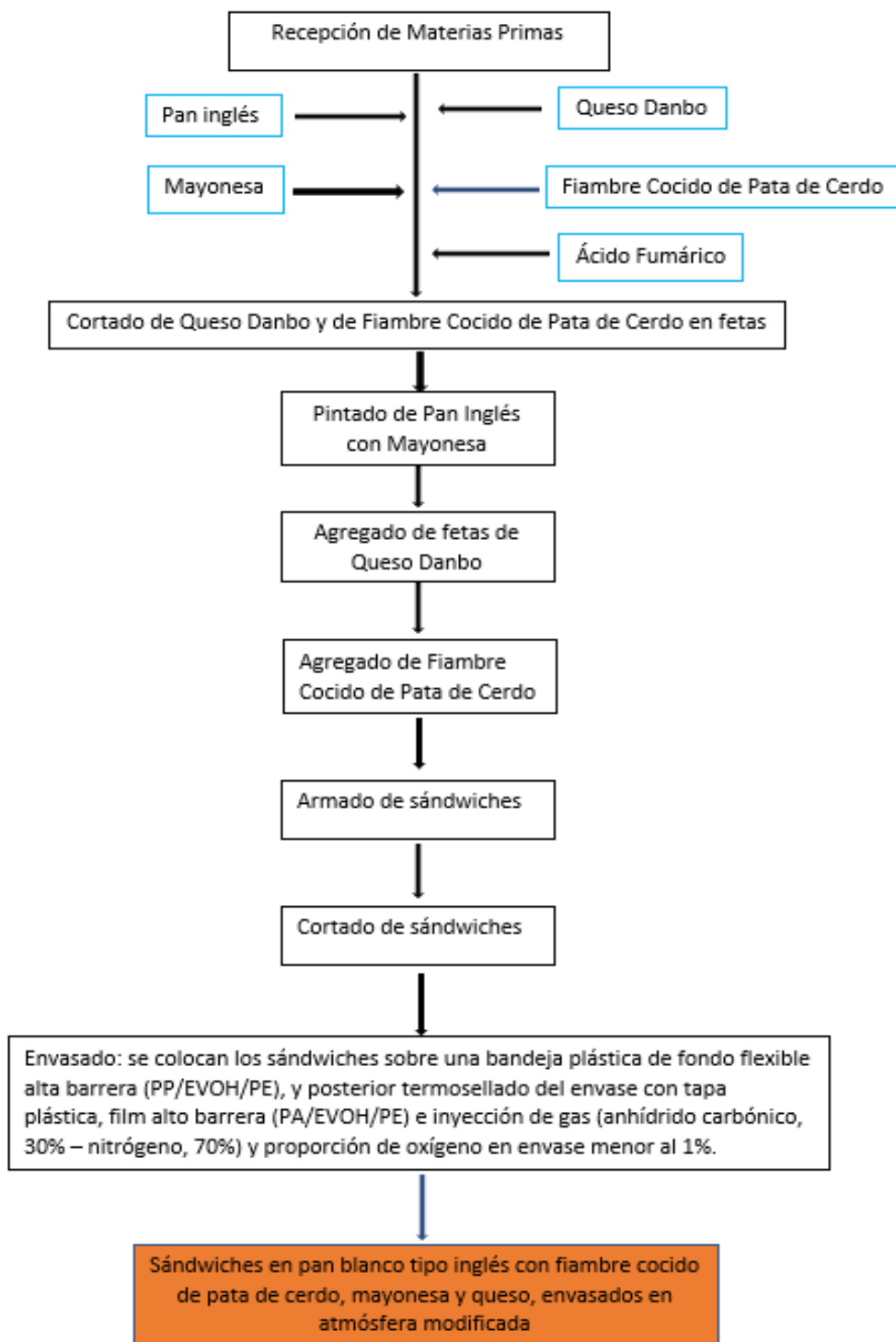


Figura 34

Ensayo 2 (Propionato de Calcio) - Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Mayonesa y Queso Danbo

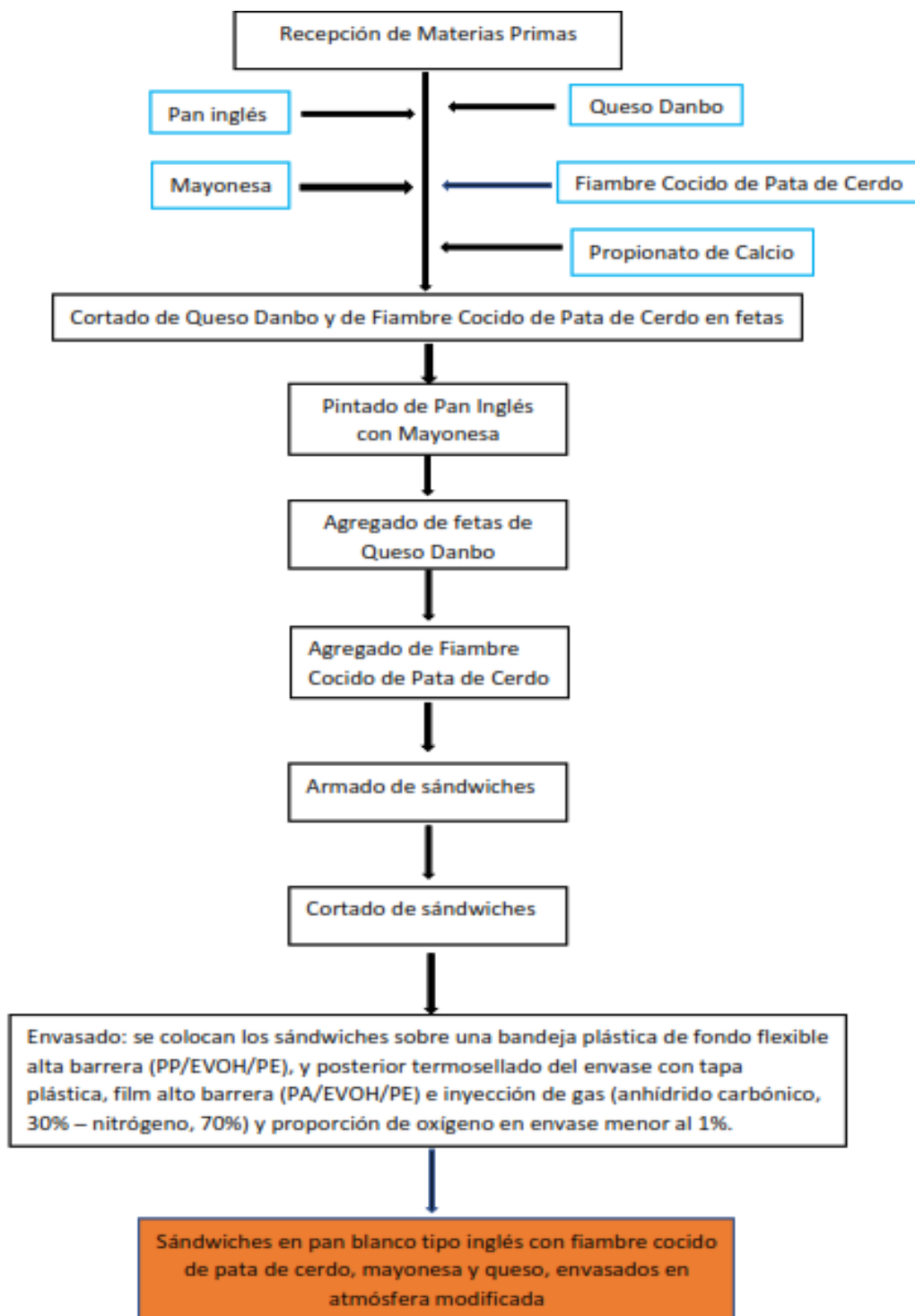


Figura 35

Ensayo 3 (Ácido Fumárico y Propionato de Calcio) - Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Mayonesa y Queso Danbo

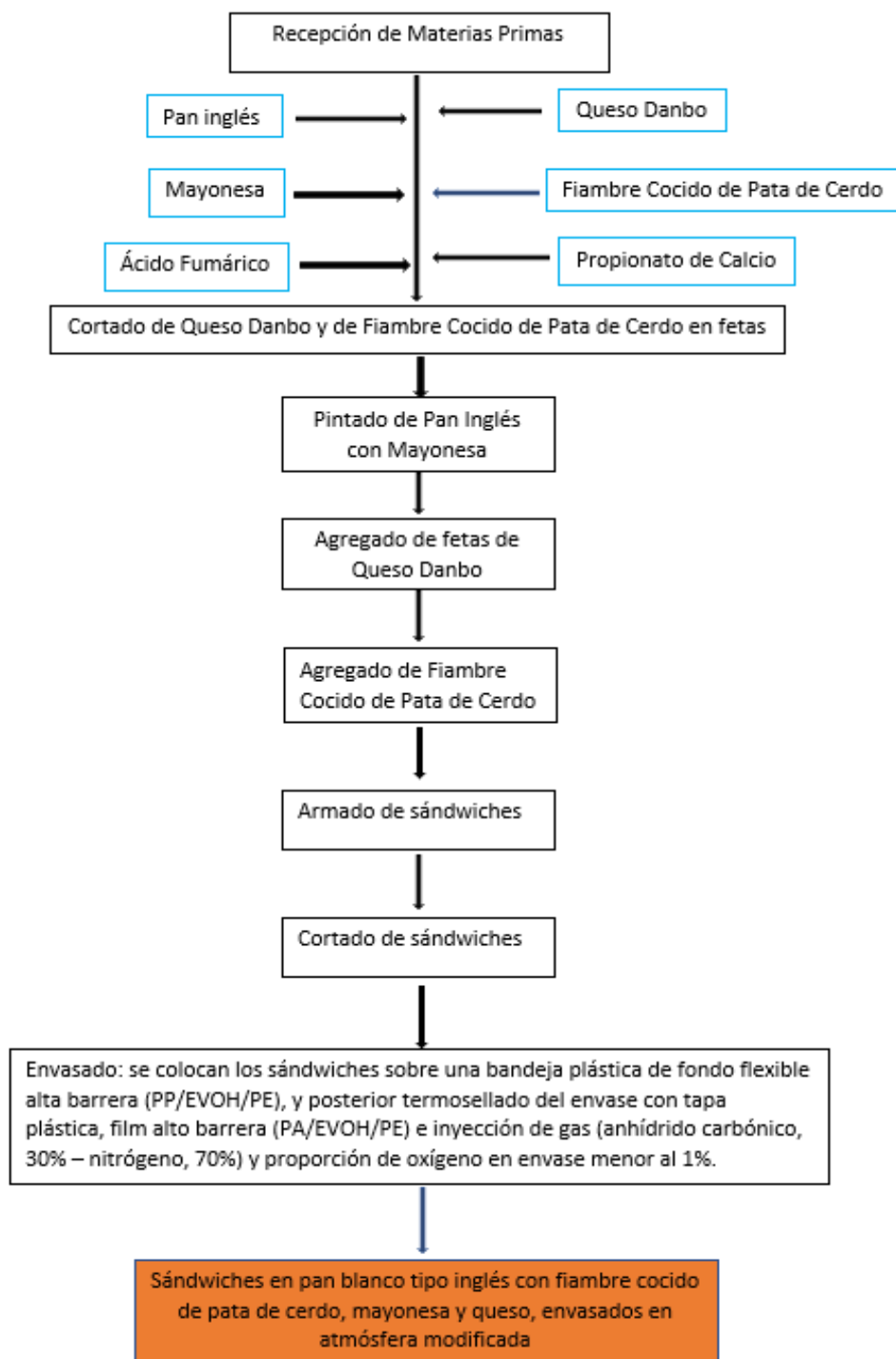


Figura 36

Ensayo 4, 5 y 6 (Lisozima) - Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Mayonesa y Queso Danbo

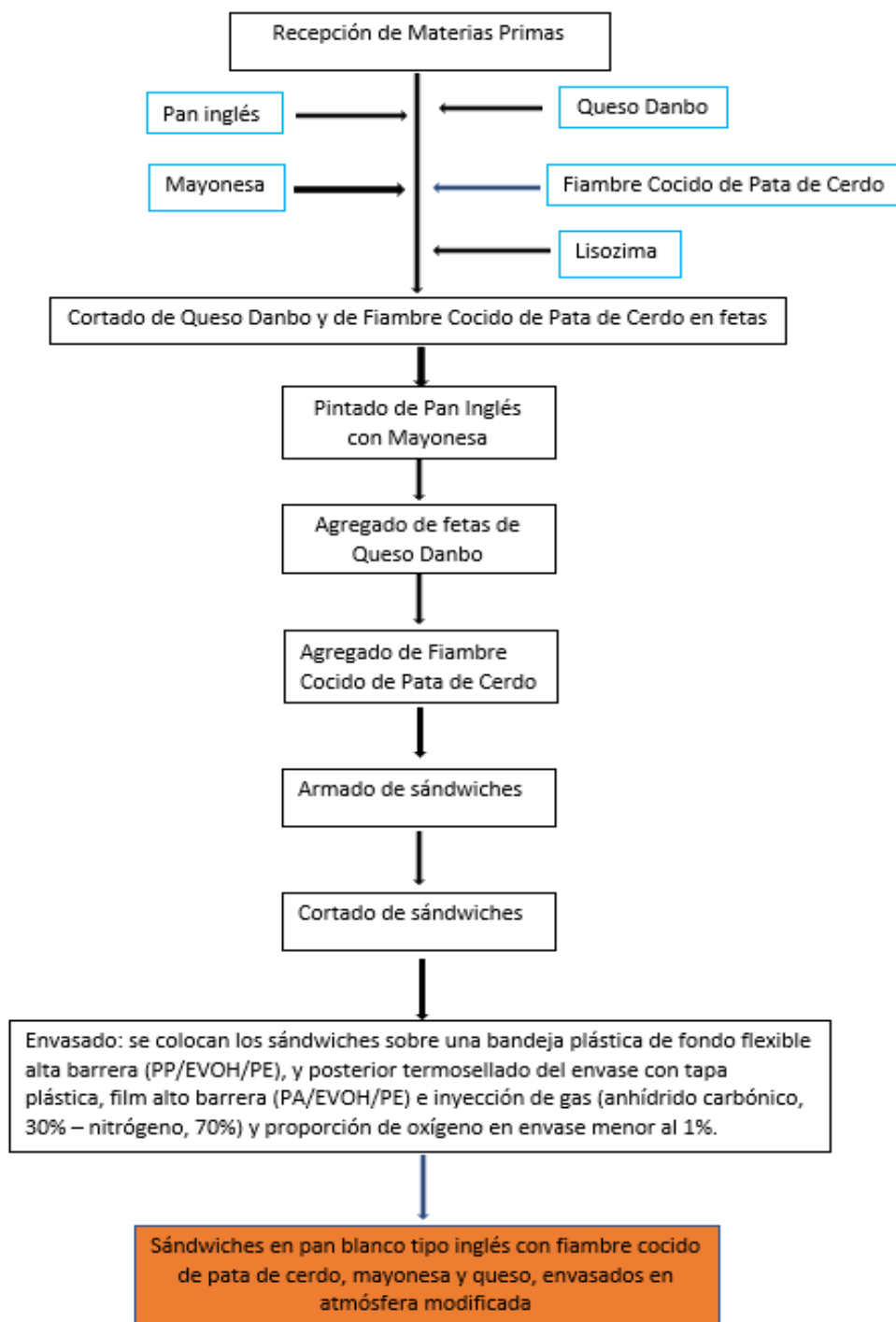
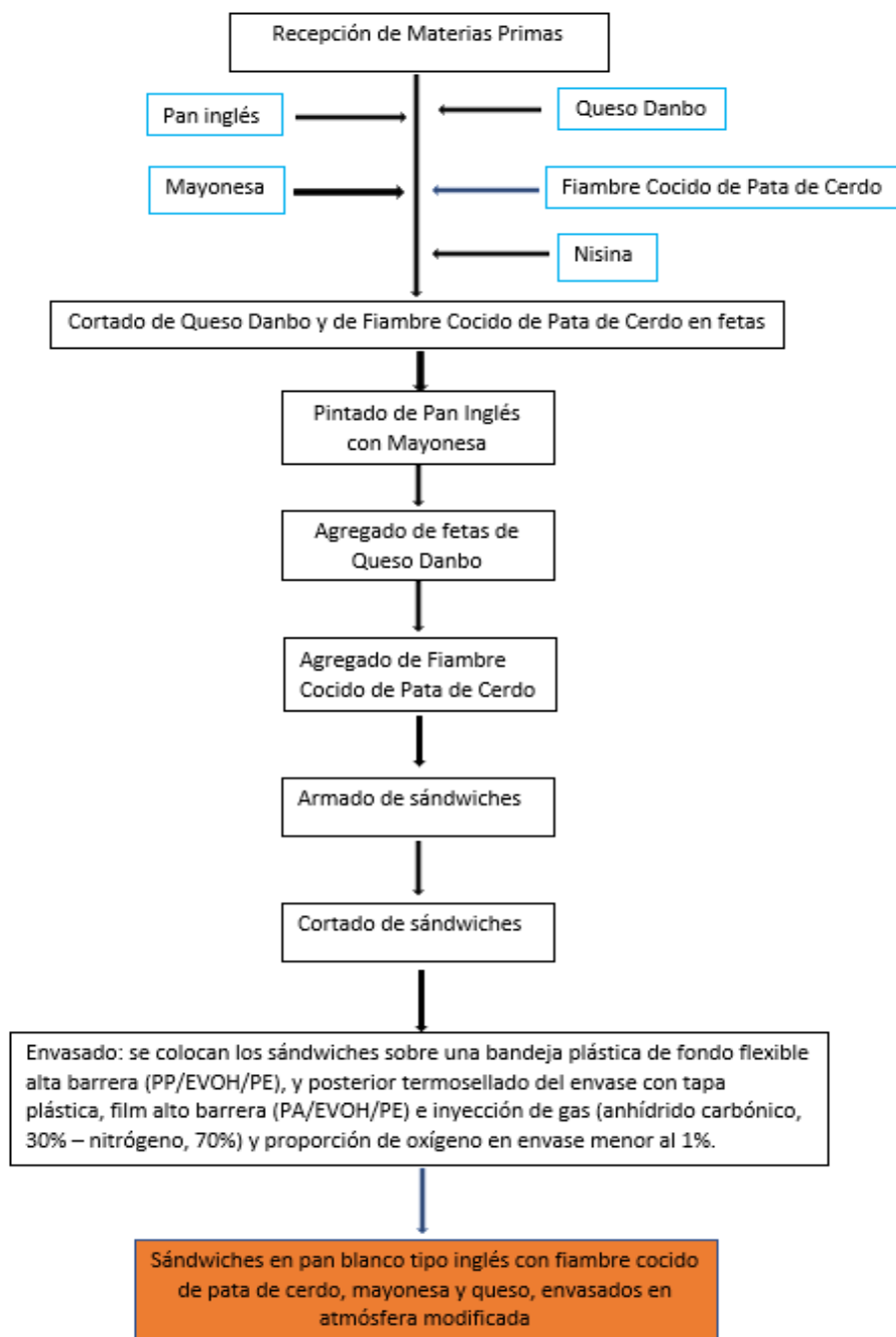


Figura 37

Ensayo 7 (Nisina) - Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Mayonesa y Queso Danbo



Realizados los análisis in vitro para cada tipo de aditivo es que podemos determinar que el aditivo que mejor resultado presentó frenando el desarrollo de las bacterias lácticas (bacteriostático) considerando la carga elevada en su punto de partida (elaboración) que es en promedio de  $1.10^4$  (UFC/g), es la nisina.

**Tabla 26**

*Resultados de los Análisis In Vitro Según Aditivo a 28 Días*

Sándwiches en pan inglés con fiambre cocido de pata de cerdo, queso danbo y mayonesa	
Análisis Microbiológico	Recuento de Bacterias Ácido Lácticas UFC/g
Ácido Fumárico + Propionato de Calcio - Día 28 (ensayo 3)	$9,5.10^6$
Propionato de Calcio - Día 28 (ensayo 2)	$5,6.10^6$
Ácido Fumárico - Día 28 (ensayo 1)	$4,9.10^7$
Referencias ND/(-)= NO DETECTADO A=AUSENCIA D/(+)=DETECTADO DNPC=DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR	

Nota. 4°C - MAP (CO2 70% - N2 30%) - 825 mbar a 850 mbar - Laboratorio Lab-Care

**Tabla 27**

*Resultados de los Análisis In Vitro Según Aditivo a 15 Días*

Sándwiches en pan inglés con fiambre cocido de pata de cerdo, queso danbo y mayonesa (15 días)						
Análisis	Microbiológico	Físicoquímicos				
	Recuento de Bacterias Ácido Lácticas UFC/g	Olor	Color	Sabor	Textura	Interpretación Sensorial
Sin aditivos (ensayo 8)	$3,0.10^6$	No Característico	Característico	Característico	No Característico	Envase hinchado, olor a jamón más intenso, sabor a manteca y el pan con mayor humedad.
Nisina (ensayo 7)	$1,3.10^5$	Característico	Característico	Característico	Característico	No se observaron defectos a comentar.
Lisozima (ensayo 4)	$4,5.10^2$	Característico	Característico	Característico	No Característico	Pan con mayor humedad y pegajoso. Envase levemente más hinchado que original.
Lisozima (ensayo 5)	$2,1.10^6$	No Característico	Característico	Característico	No Característico	Pan con mayor humedad y con sabor a jamón intenso.
Lisozima (ensayo 6)	$5,6.10^5$	No Característico	No Característico	No Característico	No Característico	Pan con mayor humedad, sabor y olor más intenso y picante, leve oscurecimiento de las fetas de embutido y del pan.

Nota. 4°C - MAP (CO2 70% - N2 30%) - 825 mbar a 850 mbar - Laboratorio Lab-Care

Exponemos el margen económico que representa el uso de aditivos y el aumento del costo, que es mínimo, frente al inmenso beneficio que representa su uso en la siguiente tabla:

**Tabla 28**

*Costo Sobre Producto del Uso de Aditivos que Mejor Resultado Presentaron*

ENSAYOS	ADITIVO	CANTIDAD EN 120g (peso sándwich)	Proporción expresada por Kg de producto	COSTO/Kg ADITIVO CONSERVANTE	COSTO/UNIDAD	COSTO/Kg PRODUCTO
Ensayo 2	Propionato de Calcio (PC)	82,5 mg	0,7g/Kg	\$ 3.012,05	\$230,25 (\$0,25)	\$1919,1 (\$2,1)
Ensayo 7	Nisina	2 mg	16,67mg/Kg	\$ 66.338,25	\$230,13 (\$0,13)	\$1918,11 (\$1,11)
Ensayo 8	Sin Aditivo	-	-	-	\$ 230	\$ 1.917

## Conclusión

Frente a la composición nutricional, no es limitante para el desarrollo de microorganismos sino por el contrario es una matriz rica en nutrientes, lo cual, favorece su crecimiento, multiplicación y desarrollo sobre dicha matriz.

Las características fisicoquímicas de los productos también le brindan las condiciones necesarias para el desarrollo de todo tipo de microorganismo, ya que, el pH de los sándwiches es de 6,04 y la acidez 0,37 g%g expresado en ácido cítrico, en cuanto a la actividad de agua (aw) es elevada.

Como podemos observar dentro de las materias primas que componen nuestros sándwiches se encuentran dentro del rango óptimo de actividad de agua para el desarrollo de microorganismos capaces de generar ETA (más de 0,85 Aw).

Es uno de los principales factores en la conservación de alimentos, conocer el efecto de la temperatura en la vida (multiplicación y muerte) de las bacterias es de primordial importancia para la higiene y seguridad de los alimentos, ya que, en función del producto, hay que elegir la temperatura adecuada. (Sandoval González, 2011)

Sin embargo, estos productos no se deben congelar, ya que, la mayonesa es una emulsión del tipo aceite en agua, al congelarse se rompe esta emulsión, se genera una separación de fases que arruina la presentación del producto, la calidad y sus caracteres organolépticos. Una situación similar se presenta con el fiambre cocido de pata de cerdo, que es un embutido con una elevada actividad de agua y al congelarse, se desnaturalizan las proteínas que lo conforman, liberando el agua que retenían, generando una sinéresis. Además, se produce el oscurecimiento del mismo, por la ruptura celular generada por los cristales de hielo debido a un congelamiento lento.

Los sándwiches son productos que comúnmente no conllevan en su proceso de elaboración un tratamiento térmico, por lo que, no disponemos de un tratamiento que disminuya

la carga microbiana de base en este tipo de alimentos tras el proceso de manipulación. Esto nos lleva a respaldarnos en mantener los sándwiches en el lapso de vida útil del producto a una temperatura de conservación de entre 1°C y 4°C, en las buenas prácticas de manufactura (BPM) y un estricto control de las mismas, evitando todo tipo de desviaciones en su cumplimiento.

El envasado en atmósfera modificada y la alta carga microbiana de bacterias lácticas en las materias primas como lo son el fiambre cocido de pata de cerdo y el queso danbo, nos proveen una protección contra el desarrollo de microorganismos patógenos, ya que, como explicamos en temas anteriores el desarrollo de BAL se ve favorecido en anaerobiosis y su carga elevada de base junto a la buena disponibilidad de nutrientes, actividad de agua elevada, baja acidez y pH cercano al neutro le brindan las condiciones óptimas para su crecimiento, multiplicación y desarrollo, creando a su vez, bacteriocinas en la fase de crecimiento y multiplicación exponencial que inhiben a otros microorganismos, entre ellos a los patógenos, lo que les permite ganar el medio.

En la investigación se realizó el análisis in vitro de los microorganismos presentes en el pan inglés de descarte para su caracterización y conocer cuáles son los responsables de su deterioro. Se detectaron 12 colonias de las cuales el 41,7 % corresponden a *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anómala*), el 50% a *Leuconostoc citreum* y finalmente el 8,3% a *Staphylococcus epidermidis*.

En las condiciones de envasado en atmósfera modificada el único microorganismo de los nombrados anteriormente que se ve favorecido para su desarrollo, es *Leuconostoc citreum*, debido a que la mayoría de los hongos y levaduras en su fase inicial de crecimiento, multiplicación y desarrollo necesitan una proporción al menos del 1% de oxígeno, que el envasado en atmósfera modificada le priva (menor a 0,3% de oxígeno en envase medido por oxímetro). La carga microbiana de *Staphylococcus epidermis* es baja, frente a las BAL presentes en el producto que al ganar el medio las inhiben.

Como medida de prevención a un desarrollo excesivo de las BAL, es que se sugiere para evitar envases hinchados por su carácter fermentativo en anaerobiosis, el uso de bacteriostáticos de las mismas, como la nisina que exhibió muy buenos resultados en los análisis in vitro realizados en esta investigación acompañada de propionato de calcio en proporciones no mayores de 0,25 g%g de producto para inhibir el desarrollo de hongos y levaduras que puedan llegar a competir con las BAL por el medio (matriz de los sándwiches).

Como podemos ver en la tabla 28, el costo frente al uso de estos aditivos es mínimo, ya que, se utilizan pequeñas proporciones de propionato de calcio y de nisina, que exhiben un efecto bacteriostático para impedir el crecimiento y desarrollo superior a  $1 \times 10^5$  (UFC/g) de bacterias lácticas, a partir del cual se ve reflejado en el producto el hinchamiento del envase pero que al mismo tiempo mantenga una flora adecuada de bacterias lácticas que gane el medio con efecto bioconservador, inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos. Esto se logró hasta una vida útil de 15 días con una concentración de nisina de 16,6mg/Kg de producto (2 mg de nisina por cada 120g que pesa un sándwich), donde los caracteres organolépticos del producto se mantuvieron intactos.

Dejamos abierto a futuras investigaciones el uso de las BAL como agentes de biocontrol en los alimentos y/o el uso de bacteriocinas como inhibidores de microorganismos patógenos, así como la caracterización de las BAL y bacteriocinas presentes en la matriz de los sándwiches envasados en atmósfera modificada.

## Índice de Figuras

Figura 1 Estructura Química de la Nisina .....	18
Figura 2 Crecimiento de <i>Lactobacillus Fructivorans</i> a pH 6,5 (a) y 3,5 (b) sin el Biopreservador (o) y en Presencia de 2.000 ppm de Nisina .....	22
Figura 3 Estudio del Modelo que Muestra el Mecanismo Dual de Actuación de la Nisina de <i>Lactococcus Lactis</i> .....	23
Figura 4 Estructura de la Lisozima de Huevo .....	27
Figura 5 Estructuras Repetitivas del Peptidoglucano de la Pared Celular de Bacterias. Se Muestra el Sitio de Corte de la Lisozima.....	28
Figura 6 Formación de Protoplastos: en una Solución Diluida, la Rotura de la Pared Libera el Protoplasto que Inmediatamente se Lisa al ser muy Débil la Membrana Citoplasmática .....	29
Figura 7 Comparación de la Estructura de Paredes Celulares de Bacterias Gram – Positiva (Izquierda) y Gram – Negativa (Derecha).....	29
Figura 8 Actividad Relativa Residual de la Lisozima de <i>Tivela stultorum</i> en Función del pH .....	35
Figura 9 Estructura Química del Propionato de Calcio .....	40
Figura 10 Envoltura de Gram Positivo .....	46
Figura 11 Envoltura de Gram Negativo.....	48
Figura 12 Comparación de las Envolturas Celulares Bacterianas.....	49
Figura 13 Cuadro comparativo Bacteria Gram Positiva y Bacteria Gram Negativa .....	50

Figura 14 Esquema General de la Vía de Embden-Meyerhoff-Parmás.....	55
Figura 15 Aminoácidos Descarboxilados por las BAL y sus Correspondientes	
Aminas Biógenas .....	58
Figura 16 Mecanismo de Acción de la Neurotoxina Botulínica .....	86
Figura 17 Tubo Verde 70% Anhídrido Carbónico – 30% Nitrógeno y Tubo Gris	
100% Anhídrido Carbónico.....	91
Figura 18 Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista	
Lateral .....	91
Figura 19 Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista	
Superior Fondo.....	92
Figura 20 Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista	
Frente.....	93
Figura 21 Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista	
Frente Superior .....	94
Figura 22 Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista	
Fondo.....	95
Figura 23 Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista	
Superior Zona Media – Carga de Producto para Envasado Previo Sellado y/o Inyección	
de Gas.....	95
Figura 24 Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 –	
Vista Superior Zona Media – Carga de Producto para Envasado Previo	

Sellado y/o Inyección de Gas .....	96
Figura 25 Máquina de Envasadora de Embutición Profunda Multivac R085 – Vista Superior Zona Media – Carga de Producto para Envasado Previo Sellado, Vacío y/o Inyección de Gas .....	97
Figura 26 Productos Envasados en Atmósfera Modificada.....	97
Figura 27 Ensayo de Medición Dentro del Envase del Oxígeno Residual, con Oxímetro, Previo Envasado en Atmósfera Modificada .....	98
Figura 28 Sándwiches Envasados en Atmósfera Modificada – Vista Superior.....	119
Figura 29 Sándwiches Envasados en Atmósfera Modificada – Vista Lateral .....	120
Figura 30 Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Jamón Crudo, Mayonesa y Queso Danbo .....	122
Figura 31 Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Mayonesa y Queso Danbo.....	123
Figura 32 Envases Hinchados con Sándwiches en Pan Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Queso Danbo, y Mayonesa, con una Elevada Carga Microbiana de Bacterias Lácticas .....	134
Figura 33 Ensayo 1 (Ácido Fumárico) - Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Mayonesa y Queso Danbo .....	139
Figura 34 Ensayo 2 (Propionato de Calcio) - Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Mayonesa y Queso Danbo.....	140

Figura 35 Ensayo 3 (Ácido Fumárico y Propionato de Calcio) - Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Mayonesa y Queso Danbo .....	141
Figura 36 Ensayo 4, 5 y 6 (Lisozima) - Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Mayonesa y Queso Danbo .....	142
Figura 37 Ensayo 7 (Nisina) - Diagrama de Flujo de Sándwich en Pan Tipo Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Mayonesa y Queso Danbo .....	143

## Índice de Tablas

Tabla 1 Características de la Lisozima de la Almeja <i>Tivela stultorum</i> .....	35
Tabla 2 Diferencias Entre las Bacterias Gram (+) y Gram (-).....	51
Tabla 3 Factores que Posibilitan la Aparición de ETA .....	87
Tabla 4 Estrategias de prevención de las ETA .....	87
Tabla 5 Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas y sus principales características .....	108
Tabla 6 Tabla 1 (Según Referencias del Código Alimentario Argentino (CAA)) .....	112
Tabla 7 Análisis Microbiológicos a Sándwiches.....	118
Tabla 8 Análisis Microbiológicos a Sándwiches.....	119
Tabla 9 Composición del Laminado del Fondo de los Envases Usados para Envasado en Atmósfera Modificada .....	120
Tabla 10 Composición del Laminado de la Tapa de los Envases Usados para Envasado en Atmósfera Modificada.....	121
Tabla 11 Composición de la Atmósfera Usada Dentro del Envase para el Envasado en Atmósfera Modificada de Sándwiches .....	121
Tabla 12 Composición Nutricional de los Sándwiches en Pan Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Queso Danbo y Mayonesa.....	125
Tabla 13 Composición Nutricional de los Sándwiches en Pan Inglés con Jamón Crudo, Queso Danbo y Mayonesa.....	125
Tabla 14 Porcentaje de los Ingredientes que Conforman los Sándwiches en Pan Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Queso Danbo y Mayonesa.....	126

Tabla 15 Porcentaje de los Ingredientes que Conforman los Sándwiches en Pan Inglés con Jamón Crudo, Queso Danbo y Mayonesa .....	126
Tabla 16 Caracterización In Vitro de los Microorganismos Presentes en el Pan Inglés .....	127
Tabla 17 Proporción de Conservantes Presentes en Pan Inglés .....	130
Tabla 18 Análisis Microbiológicos Sándwiches en Pan Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Queso Danbo y Mayonesa.....	131
Tabla 19 Análisis Microbiológicos Sándwiches en Pan Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Queso Danbo y Mayonesa.....	132
Tabla 20 Análisis Microbiológicos Sándwiches en Pan Inglés con Jamón Crudo, Queso Danbo y Mayonesa .....	132
Tabla 21 Análisis Microbiológicos Sándwiches en Pan Inglés con Jamón Crudo, Queso Danbo y Mayonesa .....	133
Tabla 22 Análisis Físicoquímicos Sándwiches en Pan Inglés con Fiambre Cocido de Pata de Cerdo, Queso Danbo y Mayonesa.....	134
Tabla 23 Análisis de Recuento de Bacterias Lácticas en Fetas de Fiambre Cocido de Pata de Cerdo .....	135
Tabla 24 Análisis de Recuento de Bacterias Lácticas en Fetas de Queso Danbo .....	136
Tabla 25 Ensayos y Proporción de los Aditivos Ensayados por Unidad de Sándwich.....	137
Tabla 26 Resultados de los Análisis In Vitro Según Aditivo a 28 Días .....	144

Tabla 27 Resultados de los Análisis In Vitro Según Aditivo a 15 Días .....	144
Tabla 28 Costo Sobre Producto del Uso de Aditivos que Mejor Resultado Presentaron.....	145

## Referencias Bibliográficas

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica - ANMAT. (s.f.).

Shigelosis. Obtenido de

[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat\\_ficha\\_tecnica\\_shigelosis.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_ficha_tecnica_shigelosis.pdf)

ANMAT. (s.f.). ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS - TOXIINFECCIÓN POR

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS. Obtenido de [http://salud.jujuy.gob.ar/wp-](http://salud.jujuy.gob.ar/wp-content/uploads/sites/14/2020/09/FT_Clostridium_perfringens.pdf)

[content/uploads/sites/14/2020/09/FT\\_Clostridium\\_perfringens.pdf](http://salud.jujuy.gob.ar/wp-content/uploads/sites/14/2020/09/FT_Clostridium_perfringens.pdf)

Brennan, J. G., & Day, B. P. (2006). *MANUAL DEL PROCESADO DE LOS ALIMENTOS*. (J. G.

Brennan, Ed.) WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; ACRIBIA, SA.

Carrillo, W. (2013). *Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad* (Vol. 14). Madrid,

España. Obtenido de

[https://www.revistasan.org.ar/pdf\\_files/trabajos/vol\\_14/num\\_4/RSAN\\_14\\_4\\_314.pdf](https://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_14/num_4/RSAN_14_4_314.pdf)

Clínica Universidad de Navarra. (2023). Staphylococcus epidermidis. Obtenido de

<https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/staphylococcus-epidermidis>

Dale Brock, T., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2005). *Brock biology of*

*microorganisms*.

Del Valle Rivero, L. (2018). *SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS PARA*

*SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN*

*VEGETAL MÍNIMAMENTE PROCESADOS*.

Departamento de Viticultura y Enología - Universidad de California. (2016). *UC DAVIS -*

*Viticulture & Enology*. Obtenido de

[https://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/pichia\\_anomala.ht](https://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/pichia_anomala.html)

[ml](https://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/pichia_anomala.html)

Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación - Ministerio de Salud de la Nación. (2016). GUÍA DE PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DEL BOTULISMO ALIMENTARIO. Obtenido de <https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2020-10/26-2016-guia-botulismo-alimentario.pdf>

elika - Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (05 de 02 de 2015). Bacillus Cereus. Obtenido de [https://seguridadalimentaria.elika.eus/wp-content/uploads/2018/01/8Bacillus\\_act2015.pdf](https://seguridadalimentaria.elika.eus/wp-content/uploads/2018/01/8Bacillus_act2015.pdf)

Facultad de Ingeniería - Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. (s.f.). Obtenido de [https://www.fio.unicen.edu.ar/usuario/gmanrique/images/Apunte\\_Actividad\\_de\\_agua.pdf](https://www.fio.unicen.edu.ar/usuario/gmanrique/images/Apunte_Actividad_de_agua.pdf)

Fredlund, E., Passoth, V., Sauer, U., Johan, S., & Blank, L. M. (2004). Regulación dependiente de oxígeno y glucosa del metabolismo central del carbono en *Pichia anomala*. *ASM Journals - Applied and Environmental Microbiology*. Obtenido de <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.70.10.5905-5911.2004>

Ghuysen, J. M., & Hakenbeck, R. (1994). *Bacterial Cell Wall*.

Instituto Valenciano de Microbiología. (07 de 12 de 2018). *Leuconostoc spp.*- *Leuconostoc citreum* y otras especies. Importancia en la industria alimentaria: Aislamiento en cultivo; Diagnóstico molecular (PCR). Obtenido de <https://www.ivami.com/es/microbiologia-de-alimentos/638-leuconostoc-spp-leuconostoc-citreum-y-otras-especies-importancia-en-la-industria-alimentaria-aislamiento-en-cultivo-diagnostico-molecular-pcr>

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. (2022). ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAs).

- Morales Rodriguez, N. Y. (2018). Diferenciando Bacterias Gram Positivo (+) y Gram Negativo (-) Mediante Tinción de Gram. (C. Iztacala-UNAM., Ed.) *Unidades de Apoyo para el Aprendizaje*. Obtenido de <https://uapa.cuaieed.unam.mx/sites/default/files/minisite/static/35e41b8a-429d-4a41-a6e9-2e2c6a4e58b7/contenido/index.html>
- Morata, A. (12 de 12 de 2021). El uso del ácido fumárico como inhibidor microbiológico. *Acenología*. Obtenido de [https://www.acenologia.com/congresoace\\_2021\\_antonio\\_morata/](https://www.acenologia.com/congresoace_2021_antonio_morata/)
- Morata, A., Bañuelos, M. A., Loira, I., Villegas, A., González, C., & Lepe Suárez, J. A. (29 de 06 de 2020). Empleo de ácido fumárico y quitosano para inhibir la fermentación maloláctica. *Acenología*. Obtenido de [https://www.acenologia.com/fml\\_fumarico\\_quitosano\\_cienc176\\_0620/](https://www.acenologia.com/fml_fumarico_quitosano_cienc176_0620/)
- Ortega Montenegro, R. E., & Viana, M. T. (Noviembre de 1999). PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y BACTERIOLÓGICAS DE LA LISOZIMA DE LA ALMEJA *Tivela stultorum*. México. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48026203>
- Parada, J. L., Ricoy Caron, C., Bianchi P. Medeiros, A., & Soccol, C. R. (09 de 03 de 2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. Obtenido de <https://www.scielo.br/j/babt/a/htZvm5MQCwK7BzjLsM7TqVg/#>
- pochteca. (s.f.). Obtenido de <https://chile.pochteca.net/propionato-de-calcio-inhibe-hongos-y-bacterias-en-alimentos/>
- quimicaindustrial.cl. (s.f.). Obtenido de <https://quimicaindustrial.cl/producto/propionato-de-calcio/>

Ruiz, M. J. (2019). *Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con actividad inhibitoria de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos.*

Sandoval González, M. (06 de 05 de 2011). *Gastronomía, Hotelería y Turismo*. Obtenido de LA ACTIVIDAD DEL AGUA EN LOS ALIMENTOS:  
<http://mauricioghtchile.blogspot.com/2011/05/la-actividad-del-agua-en-los-alimentos.html>

Sordelli, D. O. (2020). Obtenido de <https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/2020-07/T3A%20Texto%20Clase%203%20-%20Staphylococcus-Sordelli%202020.pdf>

Soto, V. I. (2015). DETERMINACIÓN DE LA FORMULACIÓN DE SORBATO DE POTASIO, PROPIONATO DE CALCIO Y EXTRACTO DE TORONJA CON MAYOR SINERGISMO EN EL INCREMENTO DE LA VIDA DE ANAQUEL DE UN PAN DE MOLDE. Guatemala. Obtenido de  
<https://repositorio.uvg.edu.gt/xmlui/bitstream/handle/123456789/4047/TESIS.pdf?sequence=1>

Wikimedia Foundation, Inc. (01 de 10 de 2023). *Wikipedia*. Obtenido de  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Wickerhamomyces\\_anomalus](https://en.wikipedia.org/wiki/Wickerhamomyces_anomalus)

Wikipedia. (21 de 11 de 2007). Obtenido de  
[https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Calcium\\_propanoate.png](https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Calcium_propanoate.png)

Wikipedia. (s.f.). *Bacteria grampositiva*. Obtenido de  
[https://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria\\_grampositiva](https://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria_grampositiva)

## Anexo I



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO  
CONTROL DE ENVASES  
NUTRICIÓN NORMAL Y PATOLÓGICA



### COMPOSICIÓN CENTESIMAL TRIPLE EN PAN BLANCO DE JAMÓN COCIDO Y QUESO

Muestra presentada por: **RACH S.A.**

Fecha: **14 de octubre de 2022**

	CANTIDAD	UNIDADES
Hidratos de Carbono	30,82	g
Azúcares totales*	0,73	g
Azúcares añadidos	0,00	g
Proteínas	11,46	g
Grasas totales	11,84	g
Grasas saturadas	3,50	g
Grasas trans	0,04	g
Cenizas	2,26	g
Humedad	43,15	g
Fibra alimentaria	0,47	g
Sodio	436	mg
Valor energético	276 / 1158	kcal/kJ

\*Por cálculo

<b>INFORMACIÓN NUTRICIONAL</b>		
<b>Porción 120 g (1 unidad)</b>		
	Cantidad por porción	%VD (*)
Valor energético	331 kcal = 1389 kJ	17
Carbohidratos	37 g	12
Azúcares totales*	0,9 g	---
Proteínas	14 g	18
Grasas totales	14 g	26
Grasas saturadas	4,2 g	19
Fibra alimentaria	0,6 g	2
Sodio	523 mg	22
No aporta cantidades significativas de azúcares añadidos y grasas trans		
*% Valores Diarios con base a una dieta de 2.000 kcal u 8.400 kJ. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energéticas		

*Ing. Oca Emilia Ramondo*  
Nutrición Normal y Patológica



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO  
CONTROL DE ENVASES  
NUTRICIÓN NORMAL Y PATOLÓGICA



## COMPOSICIÓN CENTESIMAL TRIPLE EN PAN NEGRO DE JAMÓN CRUDO Y QUESO

Muestra presentada por: **RACH S.A.**

Fecha: **29 de agosto de 2022**

	CANTIDAD	UNIDADES
Hidratos de Carbono	25,01	g
Azúcares totales	0,85	g
Azúcares añadidos	0,00	g
Proteínas	12,49	g
Grasas totales	13,99	g
Grasas saturadas	6,75	g
Grasas trans	0,15	g
Cenizas	2,46	g
Humedad	44,25	g
Fibra alimentaria	1,80	g
Sodio	1012	mg
Valor energético	276 / 1159	kcal/kJ

\*Por cálculo. Se deja aclarado que a este producto no se le agrega azúcar, ni ningún edulcorante. Los azúcares totales provienen de los ingredientes.

<b>INFORMACIÓN NUTRICIONAL</b>		
<b>Porción 120 g (1 unidad)</b>		
	Cantidad por porción	%VD (*)
Valor energético	331 kcal = 1391 kJ	17
Carbohidratos	30 g	10
Azúcares totales	1,0 g	---
Proteínas	15 g	20
Grasas totales	17 g	31
Grasas saturadas	8,1 g	37
Fibra alimentaria	2,2 g	9
Sodio	1214 mg	51
No aporta cantidades significativas de azúcares añadidos, grasas trans		
* % Valores Diarios con base a una dieta de 2.000 kcal u 8.400kJ. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energéticas		



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com  
Tel: +54 (261) 424 22 33  
Balcarce 1020, Godoy Cruz,  
Mendoza, Argentina (5501)

**INFORME DE RESULTADOS**      **Protocolo N°: 48887**

jueves, 8 de junio de 2023			
<b>Cliente:</b>	<b>RACH S.A.</b>		
<b>Sede:</b>	Fábrica	<b>Dirección:</b>	
<b>Contacto:</b>	Rinaldi, Axel Iván	<b>Cargo:</b> Bromatólogo	<b>Tel.:</b> 2613010378

**Muestra:** *Triple de jamón cocido de pata de cerdo y queso - Elaborado 05/06/2023*

<b>Remitida por:</b>	Rinaldi, Axel Iván	<b>F. recepción:</b>	5/6/2023
<b>Marca:</b>	Lote:	<b>F. Elab.:</b>	F. Vto.:
<b>Tomada por:</b>		<b>Fecha TM</b>	5/6/2023 <b>Hora TM:</b>
<b>Cond. Transporte:</b>		<b>T. Recep:</b>	°C <b>Cant.:</b> 300,00 g
<b>Nota adicional:</b>			

**Resultados**

<b>Análisis Físicoquímicos</b>	<b>Método</b>	<b>Unidad</b>	<b>Resultado</b>
pH	ISO 1842	-	<b>6,04</b>
Acidez	Tit. Na(OH)/AOAC 940.28	g%g ác.cítrico	<b>0,37</b>

**Referencias**    ND/(-)= NO DETECTADO    A= AUSENCIA    D/(+)= DETECTADO    DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR  
Las opiniones e interpretaciones que pudiesen existir en el presente informe están fuera del alcance de la acreditación del OAA.

**MENDOZA**  
**GOBIERNO**



Ministerio de Salud,  
Desarrollo Social y Deportes  
Departamento de Higiene de los Alimentos  
Laboratorio Bromatológico

**PRUEBA DE ESTABILIDAD**

MUESTRA DE	SANDWICH DE QUESO, JAMON COCIDO, MAYONESA EN PAN BLANCO
PROCEDENTE DE	RACH S.A.
DOMICILIO	LATERAL SUR N° 160 SAN FRANCISCO DEL MONTE - GODOY CRUZ - MENDOZA
TIPO DE ENVASE	BANDEJA TERMOSELLADA EN ATMOSFERA MODIFICADA
FECHA DE RECEPCIÓN	16/08/22
EXPEDIENTE N°	EX -2022-05667208-DHA
ANALISIS N °	4007 (A)

DETERMINACIONES	RESULTADOS				CRITERIOS DE ACEPTACION
	FECHA ANALISIS 17/08	FECHA ANALISIS 31/08	FECHA ANALISIS 06/09	FECHA ANALISIS 15/09	
Recuento de anaerobios sulfito reductores ufc/g	< 10	< 10	< 10	< 10	No contemplado C.A.A.
Recuento de aerobios mesófilos ufc/g	$1,1 \times 10^6$	$3,1 \times 10^5$	$> 3 \times 10^6$	$6 \times 10^5$	No contemplado C.A.A.
Salmonella spp. en 25g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	n=5 c=0 Ausencia en 25 g
Recuento de Enterobacterias (UFC/g)	< 10	< 10	< 10	< 10	n=5 c=2 m=10 <sup>3</sup> M=10 <sup>4</sup>
Recuento de E. coli (NMP/g)	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	n=5 c=0 m<3
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (NMP/g)	< 3	< 3	< 3	< 3	n=5 c=1 m=10 <sup>2</sup> M=10 <sup>3</sup>
Caracteres organolépticos	Normales	Normales	Normales	Se observa en los bordes del sandwich perdida de humedad	Normales

De lo que antecede, se deduce que las muestras analizadas: **CUMPLE CON LOS CRITERIOS ESTABLECIDOS**, en el Código Alimentario Argentino Art. N° 156 tris – (Resolución Conjunta SPRel y SAV N° 4 - E/2017).-

**MENDOZA**  
**GOBIERNO**



Ministerio de Salud,  
Desarrollo Social y Deportes  
Departamento de Higiene de los Alimentos  
Laboratorio Bromatológico

**PRUEBA DE ESTABILIDAD**

MUESTRA DE	SANDWICH DE QUESO, JAMON CRUDO, MAYONESA EN PAN NEGRO
PROCEDENTE DE	RACH S.A.
DOMICILIO	LATERAL SUR N° 160 SAN FRANCISCO DEL MONTE - GODOY CRUZ - MENDOZA
TIPO DE ENVASE	BANDEJA TERMOSELLADA EN ATMOSFERA MODIFICADA
FECHA DE RECEPCIÓN	16/08/22
EXPEDIENTE N°	EX -2022-05667208-DHA
ANALISIS N °	4007 (B)

DETERMINACIONES	RESULTADOS				CRITERIOS DE ACEPTACION
	FECHA ANALISIS 17/08	FECHA ANALISIS 31/08	FECHA ANALISIS 06/09	FECHA ANALISIS 15/09	
Recuento de anaerobios sulfito reductores ufc/g	< 10	< 10	< 10	< 10	No contemplado C.A.A.
Recuento de aerobios mesófilos ufc/g	$5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$6 \times 10^5$	No contemplado C.A.A.
Salmonella spp. en 25g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	n=5 c=0 Ausencia en 25 g
Recuento de Enterobacterias (UFC/g)	< 10	< 10	< 10	< 10	n=5 c=2 m=10 <sup>3</sup> M=10 <sup>4</sup>
Recuento de E. coli (NMP/g)	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	n=5 c=0 m<3
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (NMP/g)	< 3	< 3	< 3	< 3	n=5 c=1 m=10 <sup>2</sup> M=10 <sup>3</sup>
Caracteres organolépticos	Normales	Normales	Normales	Se observa en los bordes del sandwich perdida de humedad	Normales

De lo que antecede, se deduce que las muestras analizadas: **CUMPLE CON LOS CRITERIOS ESTABLECIDOS**, en el Código Alimentario Argentino Art. N° 156 tris – (Resolución Conjunta SPRel y SAV N° 4 - E/2017).



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,

Mendoza, Argentina (5501)

INFORME DE RESULTADOS

Protocolo N°: 46643

lunes, 24 de octubre de 2022

**Cliente:** RACH S.A.

Sede: Fábrica

Dirección:

Contacto: Rinaldi, Axel Iván

Cargo: Bromatólogo

Tel.: 2613010378

**Muestra:** Pan de miga - Descarte

Remitida por: Rinaldi, Axel Iván

F. recepción: 13/10/2022

Marca:

Lote:

F. Elab.:

F. Vto.:

Tomada por: Cliente

Fecha TM: 13/10/2022 Hora TM:

Cond. Transporte:

T. Recep: °C Cant.: 200,00 g

**Resultados**

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Inv. de <i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932:01/1994	UFC/g	ND
Caracterización de microorganismos	Microgen® GN-ID 27	-	Realizado
Análisis Físicoquímicos	Método	Unidad	Resultado
Sorbato de Potasio	HPLC	ppm	5,6
Benzoato de sodio	HPLC	ppm	30
Propionato de Calcio	HPLC	g%g	0,31

Referencias ND(-)= NO DETECTADO A= AUSENCIA P(+)= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR

**Interpretación**

Se las 12 colonias que crecieron en el medio de cultivo se indentificó que el 50% pertenecía a *Leuconostoc citreum*, el 41,7% a *Wickerhamomyces anomalus* y el 8,3% a *Staphylococcus*



  
PABLO M. FRANCICA  
Mag. Ingeniero Industrial  
Director



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,  
Mendoza, Argentina (5501)

**INFORME DE RESULTADOS**

**Protocolo N°: 46642**

martes, 18 de octubre de 2022

**Cliente:** RACH S.A.

Sede: Fábrica

Dirección:

Contacto: Rinaldi, Axel Iván

Cargo: Bromatólogo

Tel.: 2613010378

**Muestra:** *Pan de miga*

Remitida por: Rinaldi, Axel Iván

F. recepción: 13/10/2022

Marca: Lote:

F.Elab.: F.Vto.:

Tomada por: Cliente

Fecha TM: 13/10/2022 Hora TM:

Cond. Transporte:

T. Recep: °C Cant.: 200,00 g

Nota adicional:

**Resultados**

Análisis Físicoquímicos	Método	Unidad	Resultado
Sorbato de Potasio	HPLC	ppm	<b>7,5</b>
Benzoato de sodio	HPLC	ppm	<b>30</b>
Propionato de Calcio	HPLC	g%g	<b>0,31</b>

Referencias ND/(-)= NO DETECTADO A= AUSENCIA D/(+)= DETECTADO DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR  
Las opiniones e interpretaciones que pudiesen existir en el presente informe están fuera del alcance de la acreditación del OAA.



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,  
Mendoza, Argentina (5501)

INFORME DE RESULTADOS

Protocolo N°: 46121

lunes, 22 de agosto de 2022

Cliente: RACH S.A.

Sede Fábrica

Dirección:

Contacto: Rinaldi, Axel Iván

Cargo: Bromatólogo

Tel.: 2613010378

Muestra: Sandwich de jamón cocido, queso, mayonesa y pan blanco 16-08-2022

Remitida por: Rinaldi, Axel Iván

F. recepción: 16/8/2022

Marca:

Lote:

F. Elab.:

F. Vto.:

Tomada por: Calidad

Fecha TM: 16/8/2022 Hora TM:

Cond. Transporte:

T. Recep: °C Cant. 720,00 g

Nota adicional:

Resultados

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de mohos y levaduras		UFC/g	60
Rec. de bacterias lácticas		UFC/g	4,8x10 <sup>3</sup>
Inv. <i>Listeria monocytogenes</i>		Listeria/25g	ND
Recuento de <i>Clostridium perfringens</i>		UFC/g	< 10
<i>Shigella spp.</i>		UFC/25g	ND
Recuento de <i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932	UFC/g	< 100

Referencias ND(-)= NO DETECTADO A= AUSENCIA D(+)= DETECTADO DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR

Las opiniones e interpretaciones que pudiesen existir en el presente informe están fuera del alcance de la acreditación del OAA.

  
LIC. BROM. MARIO R. FRANCICA  
DIRECTOR TÉCNICO LAB-CARE  
MATRÍCULA PROFESIONAL N° 007





WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,

Mendoza, Argentina (5501)

## INFORME DE RESULTADOS

Protocolo N°: 46122

lunes, 5 de septiembre de 2022

Cliente: RACH S.A.

Sede: Fábrica Dirección:

Contacto: Rinaldi, Axel Iván Cargo: Bromatólogo Tel.: 2613010378

**Muestra: Sandwich de jamón cocido, queso, mayonesa y pan blanco 30-08-2022**

Remitida por: Rinaldi, Axel Iván

F. recepción: 16/8/2022

Marca: Lote:

F. Elab.: F. Vto.:

Tomada por: Calidad

Fecha TM: 16/8/2022 Hora TM:

Cond. Transporte:

T. Recep: °C Cant.: 720,00 g

Nota adicional:

### Resultados

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de mohos y levaduras	AFNOR (059:1995)	UFC/g	330
Rec. de bacterias lácticas	Anaerobiosis en MRS	UFC/g	2,1·10 <sup>7</sup>
Inv. <i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2:1998	Listeria/25g	ND
Recuento de <i>Clostridium perfringens</i>	ISO 7937	UFC/g	< 10
<i>Shigella spp.</i>	BAM 8ª Edic. Cap. 6	UFC/25g	ND
Recuento de <i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932 (Enero 1994)	UFC/g	< 100

Referencias ND= NO DETECTADO A= AUSENCIA P= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR

**PABLO M. FRANCICA**  
 Mag. Ingeniero Industrial  
 Director



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,  
Mendoza, Argentina (5501)

## INFORME DE RESULTADOS

Protocolo N°: 46123

viernes, 9 de septiembre de 2022

**Cliente:** RACH S.A.

**Sede:** Fábrica Dirección:

**Contacto:** Rinaldi, Axel Iván Cargo: Bromatólogo Tel.: 2613010378

**Muestra:** Sandwich de jamón cocido, queso, mayonesa y pan blanco 06-09-2022

**Remitida por:** Rinaldi, Axel Iván

**F. recepción:** 16/8/2022

**Marca:** Lote:

**F. Elab.:** F. Vto.:

**Tomada por:** Calidad

**Fecha TM:** 16/8/2022 **Hora TM:**

**Cond. Transporte:**

**T. Recep:** °C **Cant.:** 720,00 g

**Nota adicional**

### Resultados

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de mohos y levaduras	AFNOR (059:1995)	UFC/g	150
Rec. de bacterias lácticas	Anaerobiosis en MRS	UFC/g	8,9·10 <sup>^7</sup>
Recuento de Clostridium perfringens	ISO 7937	UFC/g	< 10
Inv. <i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2:1998	Listeria/25g	ND
<i>Shigella</i> spp.	BAM 8ª Edic. Cap. 6	UFC/25g	ND
Recuento de <i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932 (Enero 1994)	UFC/g	< 100

**Referencias** ND= NO DETECTADO A= AUSENCIA P= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR

ABLO M. FRANCICA  
Mag. Ingeniero Industrial  
Director



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,

Mendoza, Argentina (5501)

## INFORME DE RESULTADOS

Protocolo N°: 46384

jueves, 15 de septiembre de 2022

**Cliente:** RACH S.A.

**Sede:** Fábrica **Dirección:**

**Contacto:** Rinaldi, Axel Iván **Cargo:** Bromatólogo **Tel.:** 2613010378

**Muestra:** Sandwich de jamón cocido, queso, mayonesa y pan blanco 12-09-2022

**Remitida por:** Rinaldi, Axel Iván

**F. recepción:** 12/9/2022

**Marca:** **Lote:**

**F. Elab.:** 46 Jce **F. Vto.:**

**Tomada por:** Calidad

**Fecha TM:** 12/9/2022 **Hora TM:**

**Cond. Transporte:**

**T. Recep:** °C **Cant.:** 720,00 g

**Nota adicional**

### Resultados

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de mohos y levaduras	AFNOR (059:1995)	UFC/g	1,3·10 <sup>3</sup>
Rec. de bacterias lácticas	Anaerobiosis en MRS	UFC/g	9,4·10 <sup>7</sup>

**Referencias** ND= NO DETECTADO A= AUSENCIA P= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR

**PABLO M. FRANCICA**  
 Mag. Ingeniero Industrial  
 Director



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,

Mendoza, Argentina (5501)

INFORME DE RESULTADOS

Protocolo N°: 46118

lunes, 22 de agosto de 2022

**Cliente:** RACH S.A.

Sede Fábrica

Dirección:

Contacto: Rinaldi, Axel Iván

Cargo: Bromatólogo

Tel.: 2613010378

**Muestra:** Sandwich de jamón crudo, queso, mayonesa y pan negro 16-08-2022

Remitida por: Rinaldi, Axel Iván

F. recepción: 16/8/2022

Marca:

Lote:

F. Elab.:

F. Vto.:

Tomada por: Calidad

Fecha TM: 16/8/2022 Hora TM:

Cond. Transporte:

T. Recep: °C Cant. 720,00 g

Nota adicional:

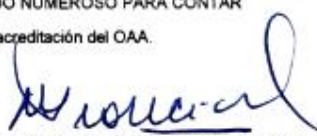
**Resultados**

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de mohos y levaduras		UFC/g	70
Rec. de bacterias lácticas		UFC/g	5,9x10 <sup>3</sup>
Inv. <i>Listeria monocytogenes</i>		Listeria/25g	ND
Recuento de <i>Clostridium perfringens</i>		UFC/g	< 10
<i>Shigella spp.</i>		UFC/25g	ND
Recuento de <i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932	UFC/g	< 100

**Referencias** ND/(-)= NO DETECTADO A= AUSENCIA D/(+)= DETECTADO DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR

Las opiniones e interpretaciones que pudiesen existir en el presente informe están fuera del alcance de la acreditación del OAA.



  
 LIC. BROM. MARIO R. FRANCICA  
 DIRECTOR TÉCNICO LAB-CARE  
 MATRÍCULA PROFESIONAL N° 607



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,

Mendoza, Argentina (5501)

## INFORME DE RESULTADOS

Protocolo N°: 46119

lunes, 5 de septiembre de 2022

**Cliente:** RACH S.A.

**Sede:** Fábrica Dirección:

**Contacto:** Rinaldi, Axel Iván Cargo: Bromatólogo Tel.: 2613010378

**Muestra:** Sandwich de jamón crudo, queso, mayonesa y pan negro 30-08-2022

**Remitida por:** Rinaldi, Axel Iván

**F. recepción:** 16/8/2022

**Marca:** Lote:

**F. Elab.:** F. Vto.:

**Tomada por:** Calidad

**Fecha TM:** 16/8/2022 **Hora TM:**

**Cond. Transporte:**

**T. Recep:** °C **Cant.:** 720,00 g

**Nota adicional**

### Resultados

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de mohos y levaduras	AFNOR (059:1995)	UFC/g	320
Rec. de bacterias lácticas	Anaerobiosis en MRS	UFC/g	2,4·10 <sup>6</sup>
Inv. <i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2:1998	Listeria/25g	ND
Recuento de <i>Clostridium perfringens</i>	ISO 7937	UFC/g	< 10
<i>Shigella spp.</i>	BAM 8ª Edic. Cap. 6	UFC/25g	ND
Recuento de <i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932 (Enero 1994)	UFC/g	< 100

**Referencias** ND= NO DETECTADO A= AUSENCIA P= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR



  
PABLO M. FRANCICA  
Mag. Ingeniero Industrial  
Director



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,

Mendoza, Argentina (5501)

## INFORME DE RESULTADOS

Protocolo N°: 46120

viernes, 9 de septiembre de 2022

**Cliente:** RACH S.A.

**Sede:** Fábrica Dirección:

**Contacto:** Rinaldi, Axel Iván Cargo: Bromatólogo Tel.: 2613010378

**Muestra:** Sandwich de jamón crudo, queso, mayonesa y pan negro 06-09-2022

**Remitida por:** Rinaldi, Axel Iván

**F. recepción:** 16/8/2022

**Marca:** Lote:

**F. Elab.:** F.Vto.:

**Tomada por:** Calidad

**Fecha TM:** 16/8/2022 **Hora TM:**

**Cond. Transporte:**

**T. Recep:** °C **Cant.:** 720,00 g

**Nota adicional**

## Resultados

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de mohos y levaduras	AFNOR (059:1995)	UFC/g	70
Rec. de bacterias lácticas	Anaerobiosis en MRS	UFC/g	1,0-10 <sup>7</sup>
Inv. <i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2:1998	Listeria/25g	ND
Recuento de <i>Clostridium perfringens</i>	ISO 7937	UFC/g	< 10
<i>Shigella spp.</i>	BAM 8ª Edic. Cap. 6	UFC/25g	ND
Recuento de <i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932 (Enero 1994)	UFC/g	< 100

**Referencias** ND= NO DETECTADO A= AUSENCIA P= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR



  
**PABLO M. FRANCICA**  
 Mag. Ingeniero Industrial  
 Director



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,

Mendoza, Argentina (5501)

INFORME DE RESULTADOS

Protocolo N°: 46383

jueves, 15 de septiembre de 2022

Cliente: RACH S.A.

Sede: Fábrica Dirección:

Contacto: Rinaldi, Axel Iván Cargo: Bromatólogo Tel.: 2613010378

Muestra: Sandwich de jamón crudo, queso, mayonesa y pan negro 12-09-2022

Remitida por: Rinaldi, Axel Iván

F. recepción: 12/9/2022

Marca: Lote:

F. Elab.: 16/05 F. Vto.:

Tomada por: Calidad

Fecha TM: 12/9/2022 Hora TM:

Cond. Transporte:

T. Recep: °C Cant.: 720,00 g

Nota adicional

Resultados

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de mohos y levaduras	AFNOR (059:1995)	UFC/g	109
Rec. de bacterias lácticas	Anaerobiosis en MRS	UFC/g	9,8·10 <sup>4</sup>

Referencias ND= NO DETECTADO A= AUSENCIA P= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR



PABLO M. FRANCICA  
Mag. Ingeniero Industrial  
Director



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,

Mendoza, Argentina (5501)

**INFORME DE RESULTADOS**

**Protocolo N°: 46640**

lunes, 17 de octubre de 2022

**Cliente:** RACH S.A.

Sede: Fábrica

Dirección:

Contacto: Rinaldi, Axel Iván

Cargo: Bromatólogo

Tel.: 2613010378

**Muestra:** *Fetas de queso*

Remitida por: Rinaldi, Axel Iván

F. recepción: 12/10/2022

Marca: Lote:

F.Elab.: F.Vto.:

Tomada por: Cliente

Fecha TM: 12/10/2022 Hora TM:

Cond. Transporte:

T. Recep: °C Cant.: 100,00 g

Nota adicional:

**Resultados**

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de mohos y levaduras	AFNOR (059:1995)	UFC/g	< 10
Rec. de bacterias lácticas	Anaerobiosis en MRS	UFC/g	1,0·10 <sup>4</sup>

**Referencias** ND(-)= NO DETECTADO A= AUSENCIA D/(+)= DETECTADO DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR

Las opiniones e interpretaciones que pudiesen existir en el presente informe están fuera del alcance de la acreditación del OAA.



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,  
Mendoza, Argentina (5501)

INFORME DE RESULTADOS

Protocolo N°: 46641

			lunes, 17 de octubre de 2022		
<b>Cliente:</b>	<b>RACH S.A.</b>				
Sede:	Fábrica	Dirección:			
Contacto:	Rinaldi, Axel Iván	Cargo:	Bromatólogo	Tel.:	2613010378

**Muestra:** *Fetas de jamón*

Remitida por:	Rinaldi, Axel Iván	F. recepción:	12/10/2022		
Marca:	Lote:	F. Elab.:	F. Vto.:		
Tomada por:	Cliente	Fecha TM:	12/10/2022	Hora TM:	
Cond. Transporte:		T. Recep:	°C	Cant.:	100,00 g
Nota adicional:					

**Resultados**

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de mohos y levaduras	AFNOR (059:1995)	UFC/g	< 10
Rec. de bacterias lácticas	Anaerobiosis en MRS	UFC/g	3,0·10 <sup>4</sup>

**Referencias** ND/(-)= NO DETECTADO A= AUSENCIA D/(+)= DETECTADO DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR  
Las opiniones e interpretaciones que pudiesen existir en el presente informe están fuera del alcance de la acreditación del OAA.



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,

Mendoza, Argentina (5501)

INFORME DE RESULTADOS

Protocolo N°: 46823

viernes, 11 de noviembre de 2022

Cliente: RACH S.A.

Sede: Fábrica Dirección:

Contacto: Rinaldi, Axel Iván Cargo: Bromatólogo Tel.: 2613010378

Muestra: Sandwich de jamón y queso - elaborado 11/10/2022 - Propiónico

Remitida por: Rinaldi, Axel Iván

F. recepción: 8/11/2022

Marca: Lote:

F.Elab.: F.Vto.:

Tomada por: Cliente

Fecha TM: 11/10/2022 Hora TM:

Cond. Transporte:

T. Recep: °C Cant.: 6,00 -

Nota adicional:

Resultados

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Rec. de bacterias lácticas	Anaerobiosis en MRS	UFC/g	5,6-10 <sup>6</sup>

Referencias ND= NO DETECTADO A= AUSENCIA P= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR



  
PABLO M. FRANCICA  
Mag. Ingeniero Industrial  
Director



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,  
Mendoza, Argentina (5501)

## INFORME DE RESULTADOS

Protocolo N°: 46824

viernes, 11 de noviembre de 2022

Cliente: RACH S.A.

Sede: Fábrica Dirección:

Contacto: Rinaldi, Axel Iván Cargo: Bromatólogo Tel.: 2613010378

**Muestra: Sandwich de jamón y queso - elaborado 11/10/2022 - Fumárico**

Remitida por: Rinaldi, Axel Iván

F. recepción: 8/11/2022

Marca: Lote:

F. Elab.: F. Vto.:

Tomada por: Cliente

Fecha TM: 11/10/2022 Hora TM:

Cond. Transporte:

T. Recep: °C Cant.: 6,00 -


Nota adicional:

## Resultados

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Rec. de bacterias lácticas	Anaerobiosis en MRS	UFC/g	4,9-10 <sup>7</sup>

Referencias ND= NO DETECTADO A= AUSENCIA P= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR



  
PABLO M. FRANCICA  
Mag. Ingeniero Industrial  
Director



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,

Mendoza, Argentina (5501)

## INFORME DE RESULTADOS

Protocolo N°: 46825

viernes, 11 de noviembre de 2022

**Cliente:** RACH S.A.  
**Sede:** Fábrica **Dirección:**  
**Contacto:** Rinaldi, Axel Iván **Cargo:** Bromatólogo **Tel.:** 2613010378

**Muestra:** Sandwich de jamón y queso - elaborado 11/10/2022 - Combinado

**Remitida por:** Rinaldi, Axel Iván **F. recepción:** 8/11/2022  
**Marca:** **Lote:** **F. Elab.:** **F. Vto.:**  
**Tomada por:** Cliente **Fecha TM:** 11/10/2022 **Hora TM:**  
**Cond. Transporte:** **T. Recep:** °C **Cant.:** 6,00 -  
**Nota adicional:**

### Resultados

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Rec. de bacterias lácticas	Anaerobiosis en MRS	UFC/g	9,5·10 <sup>6</sup>

**Referencias** ND= NO DETECTADO A= AUSENCIA P= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR



**PABLO M. FRANCICA**  
 Mag. Ingeniero Industrial  
 Director

**INFORME DE RESULTADOS**      **Protocolo N°: 49117**

martes, 18 de julio de 2023

**Cliente:** RACH S.A.**Sede:** Fábrica**Dirección:** Lateral Acceso Sur n° 160, Godoy Cruz, Mendoza**Contacto:** Rinaldi, Axel Iván**Cargo:** Bromatólogo**Tel.:** 2613010378
**Muestra:** *Sandwinch de fiambre cocido de cerdo, queso Danbo y mayonesa - Sin Aditivos - F. Elaboración; 27-6-2023 - MAP (CO2 70% - N2 30%) - 825-850 mbar - 15 días 4°C*
**Remitida por:** Rinaldi, Axel Iván**F. recepción:** 27/6/2023**Marca:****Lote:****F.Elab.:****F.Vto.:****Tomada por:** Cliente**Fecha TM:** 27/6/2023**Hora TM:****Cond. Transporte:****T. Recep:** °C**Cant.:** 0,50 Kg
**Resultados**

<b>Análisis Microbiológicos</b>	<b>Método</b>	<b>Unidad</b>	<b>Resultado</b>
Recuento de bacterias ácido lácticas	ISO 15214:1998	UFC/g	3,0-10 <sup>6</sup>
<b>Análisis Físicoquímicos</b>	<b>Método</b>	<b>Unidad</b>	<b>Resultado</b>
Olor	Sensorial	-	No Caract.
Color	Sensorial	-	Caract.
Sabor	Sensorial	-	Caract.
Textura	Sensorial	-	No Caract.

**Referencias** ND(-)= NO DETECTADO A= AUSENCIA P(+)= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR

**Interpretación**

Envase hinchado, olor a jamón más intenso, sabor a manteca y el pan con mayor humedad.


  
 PABLO M. FRANCICA  
 Ing. Ingeniero Industrial  
 Director



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,

Mendoza, Argentina (5501)

**INFORME DE RESULTADOS**      **Protocolo N°: 49118**

martes, 18 de julio de 2023

**Cliente:** RACH S.A.

**Sede:** Fábrica

**Dirección:** Lateral Acceso Sur n° 160, Godoy Cruz, Mendoza

**Contacto:** Rinaldi, Axel Iván

**Cargo:** Bromatólogo

**Tel.:** 2613010378

**Muestra:** *Sandwinch de fiambre cocido de cerdo, queso Danbo y mayonesa - Nisina 0,1 g/kg - F. Elaboración; 27-6-2023 - MAP (CO2 70% - N2 30%) - 825-850 mbar - 15 días 4°C*

**Remitida por:** Rinaldi, Axel Iván

**F. recepción:** 27/6/2023

**Marca:**

**Lote:**

**F. Elab.:**

**F. Vto.:**

**Tomada por:** Cliente

**Fecha TM:** 27/6/2023    **Hora TM:**

**Cond. Transporte:**

**T. Recep:** °C    **Cant.:** 0,50 Kg

**Resultados**

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de bacterias ácido lácticas	ISO 15214:1998	UFC/g	1,3·10 <sup>5</sup>

Análisis Físicoquímicos	Método	Unidad	Resultado
Olor	Sensorial	-	Carcat.
Color	Sensorial	-	Carcat.
Sabor	Sensorial	-	Carcat.
Textura	Sensorial	-	Carcat.

**Referencias**    ND/(-)= NO DETECTADO    A= AUSENCIA    P/(+)= PRESENCIA    DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR

**Interpretación**

No se observaron defectos a comentar.



PABLO M. FRANCICA  
Mag. Ingeniero Industrial  
Director



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,

Mendoza, Argentina (5501)

INFORME DE RESULTADOS Protocolo N°: 49119

martes, 18 de julio de 2023

**Cliente:** RACH S.A.

Sede: Fábrica

Dirección: Lateral Acceso Sur n° 160, Godoy Cruz, Mendoza

Contacto: Rinaldi, Axel Iván

Cargo: Bromatólogo

Tel.: 2613010378

**Muestra:** Sandwich de fiambre cocido de cerdo, queso Danbo y mayonesa - Liozima 0,5 g/kg - F. Elaboración; 27-6-2023 - MAP (CO2 70% - N2 30%) - 825-850 mbar - 15 días 4°C

Remitida por: Rinaldi, Axel Iván

F. recepción: 27/6/2023

Marca: Lote:

F. Elab.: F. Vto.:

Tomada por: Cliente

Fecha TM: 27/6/2023 Hora TM:

Cond Transporte:

T. Recep: °C Cant.: 0,50 Kg

**Resultados**

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de bacterias ácido lácticas	ISO 15214:1998	UFC/g	4,5-10 <sup>2</sup>
Análisis Físicoquímicos	Método	Unidad	Resultado
Olor	Sensorial	-	Caract.
Color	Sensorial	-	Caract.
Sabor	Sensorial	-	Caract.
Textura	Sensorial	-	No Caract.

Referencias NDI(-)= NO DETECTADO A= AUSENCIA P/(+)= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR

**Interpretación**

Pan con mayor humedad y pegasoso. Envase levemente más hinchado que el original.



PABLO M. FRANCICA  
Mag. Ingeniero Industrial  
Director

**INFORME DE RESULTADOS**      **Protocolo N°: 49120**

martes, 18 de julio de 2023

**Cliente:** RACH S.A.

Sede: Fábrica

Dirección: Lateral Acceso Sur n° 160, Godoy Cruz, Mendoza

Contacto: Rinaldi, Axel Iván

Cargo: Bromatólogo

Tel.: 2613010378

**Muestra:** *Sandwinch de fiambre cocido de cerdo, queso Danbo y mayonesa - Lisozima 1,0 g/kg - F. Elaboración; 27-6-2023 - MAP (CO2 70% - N2 30%) - 825-850 mbar - 15 días 4°C*

Remitida por: Rinaldi, Axel Iván

F. recepción: 27/6/2023

Marca:

Lote:

F. Elab.:

F. Vto.:

Tomada por: Cliente

Fecha TM: 27/6/2023 Hora TM:

Cond. Transporte:

T. Recep: °C Cant: 0,50 Kg

**Resultados**

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de bacterias ácido lácticas	ISO 15214:1998	UFC/g	2,1·10 <sup>6</sup>
Análisis Físicoquímicos	Método	Unidad	Resultado
Olor	Sensorial	-	No Caract.
Color	Sensorial	-	Caract.
Sabor	Sensorial	-	Caract.
Textura	Sensorial	-	No Caract.

Referencias ND/(-)= NO DETECTADO A= AUSENCIA P/(+)= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR

**Interpretación**

Pan con mayor humedad y con sabor a jamón intenso.



WWW.LABCARECONSULTORA.COM

info@labcareconsultora.com

Tel: +54 (261) 424 22 33

Balcarce 1020, Godoy Cruz,

Mendoza, Argentina (5501)

INFORME DE RESULTADOS Protocolo N°: 49121

martes, 18 de julio de 2023

Cliente: RACH S.A.

Sede: Fábrica

Dirección: Lateral Acceso Sur n° 160, Godoy Cruz, Mendoza

Contacto: Rinaldi, Axel Iván

Cargo: Bromatólogo

Tel.: 2613010378

**Muestra:** *Sandwinch de fiambre cocido de cerdo, queso Danbo y mayonesa - Lisozima 2,0 g/kg - F. Elaboración; 27-6-2023 - MAP (CO2 70% - N2 30%) - 825-850 mbar - 15 días 4°C*

Remitida por: Rinaldi, Axel Iván

F. recepción: 27/6/2023

Marca:

Lote:

F. Elab.:

F. Vto.:

Tomada por: Cliente

Fecha TM:

27/6/2023

Hora TM:

Cond. Transporte:

T. Recep:

°C

Cant:

0,50 Kg

### Resultados

Análisis Microbiológicos	Método	Unidad	Resultado
Recuento de bacterias ácido lácticas	ISO 15214:1998	UFC/g	5,6·10 <sup>5</sup>
Análisis Fisicoquímicos	Método	Unidad	Resultado
Olor	Sensorial	-	No Caract.
Color	Sensorial	-	No Caract.
Sabor	Sensorial	-	No Caract.
Textura	Sensorial	-	No Caract.

Referencias ND(-)= NO DETECTADO A= AUSENCIA P(+)= PRESENCIA DNPC= DEMASIADO NUMEROSO PARA CONTAR

### Interpretación

Pan con mayor humedad, sabor y olor más intenso y picante, y leve oscurecimiento de las fetas de embutido y del pan.



PABLO M. FRANCICA  
Mag. Ingeniero Industrial  
Director