

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**EVALUACION DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LECHE
SABORIZADAS COMERCIALIZADAS EN LOS PRINCIPALES
SUPERMERCADOS DEL DISTRITO DOS DE LA ZONA
METROPOLITANA DE SAN SALVADOR**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
SAUL GUSTAVO BARRERA ORELLANA
FREDY ANTONIO VELASQUEZ VELASQUEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

JUNIO DE 2011

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTINEZ DE DIAZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE GESTION AMBIENTAL: CALIDAD AMBIENTAL

MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS, MICROBIOLOGIA

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

DOCENTE DIRECTORA

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

AGRADECIMIENTOS

A DIOS TODO PODEROSO Y A NUESTRA MADRE MARIA, por habernos regalado sabiduría y guiarnos en el desarrollo de nuestros estudios.

A NUESTRA DOCENTE DIRECTOR:

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz, por orientarnos con paciencia y comprensión durante la realización de nuestro trabajo.

A LA COORDINADORA GENERAL Y ASESORES DE AREA:

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo, MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velazquez, MSc. Amy Elieth Moran Rodríguez. Por sus observaciones y recomendaciones las cuales ayudaron a la realización del trabajo de investigación.

A todas las personas que directa o indirectamente colaboraron en la realización de nuestro trabajo de graduación.

DEDICATORIA

DIOS:

Por las bendiciones recibidas a lo largo de toda mi vida y por ser la luz, la fuerza, esperanza que me impulsa y me ayuda a superar todos los obstáculos.

LA SANTISIMA VIRGEN MARIA:

Por ser mi protección y mi refugio en los momentos más difíciles.

MIS PADRES: Reyes Barrera Herrera.

Guadalupe de las Mercedes Orellana de Barrera.

Porque con su amor, sacrificio y ejemplo me ayudaron a ser la persona que soy, motivándome a no rendirme nunca.

MIS HERMANOS: Reyes Edgardo Barrera Orellana.

Ángel Emilio Barrera Orellana.

Por apoyarme y darme fuerzas para no rendirme.

A mi compañero FREDY por toda su dedicación y esmero para poder llevar a cabo este nuevo triunfo

MIS AMIGOS Y AMIGAS:

Por ayudarme y aconsejarme en los momentos de duda.

Saúl Gustavo Barrera Orellana.

DEDICATORIA

A Dios Padre, Dios Hijo y Espíritu Santo, por darme fortaleza, salud, y vida para perseverar hasta el culmen de mi carrera profesional.

A mi madre, Rosa Evelia Velásquez, por sus consejos y su apoyo constante en toda mi vida, que me han ayudado para seguir el camino correcto y culminar con éxito mi carrera.

A mis hermanos, Luis y Noel, por estar siempre en los momentos más necesitados.

A mis hermanas, América, Delia, Mireya, Heydi y Clarivel, por ser una fuente de inspiración en cada momento de mi vida.

A mis demás familiares y amigos, por ayudarme en los momentos de duda.

A mi compañero Saúl, por su confianza y esmero para lograr nuestros objetivos

Fredy Antonio Velásquez Velásquez.

INDICE

	Página
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xviii
Capítulo II	
2.0 Objetivos	21
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	23
3.1 Generalidades de la leche	23
3.1.1. Propiedades físicas	23
3.1.2. Propiedades químicas	24
3.2 Contaminación de la leche	24
3.2.1 En la granja	24
3.2.2 Durante su transporte	26
3.3. Alteración de la leche	26
3.3.1. Producción de gas	27
3.3.2. Viscosidad	28
3.3.3. Modificación del sabor	29
3.3.4. Modificación del color	30

3.3.5. Alteración de la leche a diferentes temperaturas	31
3.4. Leches pasteurizadas y ultrapasteurizadas	32
3.4.1. Proceso de pasteurización de la leche	32
3.4.2. Alteración de la leche pasteurizada	33
3.4.3. Protección de la leche pasteurizada frente a la recontaminación	35
3.4.4. Ultra pasteurización	36
3.4.5 Proceso de ultra pasteurización (UHT)	36
3.5. Leche saborizada	37
3.5.1. Características	37
3.5.2. Requisitos microbiológicos	38
3.5.3. Sabores de la leche saborizada	39
3.5.4. Clasificación según características fisicoquímicas	40
3.6. Proceso de elaboración de leche fresca y saborizada	41
3.6.1. Descripción del proceso	41
3.7. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)	43
3.7.1. Intoxicación alimentaria por <i>Staphylococcus aureus</i>	45
3.7.1.1. Características del género	45
3.7.1.2. Enfermedad producida	46
3.7.1.3. Alimentos implicados	47
3.7.1.4. Sintomatología y diagnóstico	47
3.7.2. Salmonelosis	48
3.7.2.1. Características del género	48
3.7.2.2. Enfermedad producida	49

3.7.1.3. Alimentos implicados	50
3.7.1.4. Sintomatología y diagnóstico	50
3.7.3. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena	51
3.7.2.1. Características del género	51
3.7.2.2. Enfermedad producida	52
3.7.3.4. Diagnóstico	53
Capítulo IV	
4.0 Diseño metodológico	55
4.1 Tipo de estudio	55
4.1.1 Transversal	55
4.1.2 Experimental	55
4.1.3 Prospectivo	55
4.2 Investigación bibliográfica	55
4.3 Investigación de campo, universo y muestra	56
4.3.1 Universo	56
4.3.2 Muestra	56
4.3.3 Muestreo	56
4.3.4 Cálculos estadísticos para la determinación del número total de muestras	57
4.3.5 Datos obtenidos a partir de la prueba piloto	57
4.4 Parte Experimental	59
4.4.1. Procedimiento para el muestreo	59

4.4.2. Identificación de la muestra	61
4.4.3. Procedimiento para la preparación de la muestra	61
4.4.4. Preparación de las diluciones	62
4.4.5. Recuento en placa de <i>Staphylococcus aureus</i>	63
4.4.6. Recuento de <i>Escherichia coli</i> (NMP/mL)	64
4.4.7. Determinación de <i>Salmonella spp</i>	64
Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	67
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	76
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	79
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

Anexos N°

1. Mapa de la zona metropolitana de San Salvador
2. Leches saborizadas comercializadas en los supermercados del área metropolitana de San Salvador
3. Lista de chequeo para productos lácteos
4. Requisitos Microbiológicos según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 para leches saborizadas
5. Diagrama de flujo de proceso de elaboración de las leches frescas y saborizadas
6. Preparación de diluciones, recuento y aislamiento de ***Staphylococcus aureus***
7. Prueba presuntiva para coliformes totales, determinación de ***Escherichia coli***
8. Determinación de ***Salmonella spp***
9. Material y equipo
10. Medios de cultivo y reactivos
11. Fotografías tomadas durante el desarrollo de la investigación.
12. Carta dirigida a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

INDICE DE TABLAS

Tabla Nº	Página
1. Requisitos químicos	38
2. Requisitos microbiológicos	38
3. Listado de supermercados del área metropolitana de San Salvador	59
4. Listado de Supermercados muestreados	60
5. Variedad comercial de leches saborizadas	61
6. Número de lote, código, fecha de vencimiento, temperatura de almacenamiento y número asignado para el análisis de cada muestra	67
7. Resultados obtenidos durante la inspección del almacenamiento de las leches saborizadas (chocolate) en las salas de venta de los supermercados muestreados	69
8. Resultados obtenidos durante la inspección del almacenamiento de las leches saborizadas (fresa) de los supermercados muestreados	69
9. Resultados de las determinaciones realizadas a las marcas de leches saborizadas (chocolate y fresa)	71

10. Porcentajes de marcas de leches saborizadas que cumplen
el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08

73

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Página
1.	Gráfico de las marcas de leches saborizadas que cumplen con la especificación según indica el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.	73

RESUMEN

El presente trabajo de graduación tiene por objeto determinar la calidad microbiológica de las leches saborizadas de chocolate y fresa en cuatro diferentes marcas que se comercializan en los principales supermercados de la zona metropolitana de San Salvador. Para esto, se seleccionaron las muestras por medio de métodos estadísticos, cuatro muestras de cada sabor por cada una de las 4 diferentes marcas de leches saborizadas haciendo un total de 24 muestras a analizar. En el desarrollo experimental, se le asignó una letra para identificar a cada una de las marcas: Marca "A", "B", "C" y "D". Posteriormente las muestras fueron trasladadas en condiciones adecuadas de refrigeración hacia el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). Además se realizó una inspección en los supermercados donde se muestreo utilizando una lista de chequeo (ver anexo N°3), para identificar las condiciones en las que se encuentran las leches saborizadas en los centro de venta. La investigación se realizó durante el período de agosto de 2010 a junio de 2011.

A las muestras de leches saborizadas, previamente tratadas, se les determinó: ***Salmonella spp, Escherichia coli y Staphylococcus aureus***, empleando para ello los métodos de ensayo y análisis establecidos en Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Los resultados obtenidos, se agruparon por muestras de cada marca, en todas las determinaciones para ***Salmonella spp, Escherichia coli y Staphylococcus aureus*** se obtuvieron resultados

negativos los cuales se dieron a conocer al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (**Ver anexo 12**).

Al comparar todos los resultados de cada muestra con lo que especifica el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 “Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos” para comprobar la calidad microbiológica de las leches saborizadas analizadas se concluyó que todas las marcas analizadas se consideran aptas para el consumo humano debido a que cumplen con las especificaciones exigidas por dicho reglamento.

Finalmente se obtuvo una investigación que constituye un aporte para todos aquellos involucrados en la calidad microbiológica de las leches saborizadas: los productores, los centros de venta (supermercados), las autoridades sanitarias y las personas que consumen este nutritivo alimento, que deben informarse adecuadamente para poder exigir que lo que se consume sea un alimento inocuo.

CAPITULO I
INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

La leche saborizada es un producto de consumo obtenida por la adición de saborizantes y la aplicación de un tratamiento térmico que consiste en destruir mediante el empleo apropiado del calor, la totalidad de la flora patógena y la casi totalidad de la flora banal que pudiese estar presente en la leche cruda y su posterior envasado, en la cual podrían permanecer viables microorganismos procedentes del centro de producción primario o de la planta de proceso.

Por ser un medio compuesto por diversas sustancias nutritivas, la hace un alimento altamente perecedero, por lo cual debe ser producida en condiciones higiénicas óptimas, cumpliendo con los parámetros microbiológicos establecidos por las entidades gubernamentales. (10)

Por lo mencionado anteriormente se consideró de importancia determinar la calidad microbiológica del producto lácteo en el mercado.

Durante el desarrollo de la presente investigación se determinó la calidad microbiológica de cuatro marcas de leche saborizadas (ver anexo N° 2) que se comercializan en los principales supermercados del distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador (ver tabla N° 3). El muestreo se realizó en las principales cadenas comerciales las cuales se seleccionaron a través de un muestreo estadístico. (1)

A las muestras seleccionadas se les determinó la ausencia o presencia de microorganismos patógenos como: ***Salmonella spp***, ***Escherichia coli*** y

Staphylococcus aureus; empleando los métodos de ensayo y análisis establecidos en Standard Methods. Los resultados obtenidos se compararon con el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 para leches pasteurizadas con sabor, dichos resultados además se dieron a conocer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) **(Ver anexo 12)**.

El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en el período de agosto de 2010 a junio de 2011.

CAPITULO II

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General:

Evaluar la calidad microbiológica de leches saborizadas comercializadas en los principales supermercados del distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador.

2.2. Objetivos Específicos:

- 2.2.1. Verificar las condiciones de almacenamiento de las diferentes leches saborizadas por marca en los lugares de venta a través de una lista de chequeo.
- 2.2.2. Determinar la presencia/ausencia de microorganismos patógenos ***Salmonella spp***, ***Escherichia coli*** y ***Staphylococcus aureus*** en las muestras seleccionadas.
- 2.2.3. Comparar de acuerdo a los resultados microbiológicos si las leches saborizadas por marca son aptas para el consumo humano según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.
- 2.2.4. Dar a conocer a las autoridades del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) los resultados obtenidos de la determinación de la calidad microbiológica de las leches saborizadas por marca comercializadas.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Generalidades de la leche

Leche cruda de vaca: Es el producto íntegro, no alterado ni adulterado, de la secreción de las glándulas mamarias de las hembras del ganado bovino obtenida por el ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de vacas sanas y libre de calostro; que no ha sido sometida a ningún tratamiento a excepción del filtrado y/o enfriamiento, y está exento de color, olor, sabor y consistencia anormales. (4)

3.1.1 Propiedades Físicas. (21)

La leche de vaca tiene una densidad media de 1,032 g/ml. Es una mezcla compleja y heterogénea compuesta por un sistema coloidal de tres fases:

- Solución: los minerales así como los hidratos de carbono se encuentran disueltos en el agua.
- Suspensión: las sustancias proteicas se encuentran con el agua en suspensión.
- Emulsión: la grasa en agua se presenta como emulsión.

Contiene una proporción importante de agua (cerca del 87%). El resto constituye el extracto seco que representa 130 gramos (g), y en el que hay de 35g a 45g de materia grasa. Otros componentes principales son los glúcidos

lactosa, las proteínas y los lípidos, componentes orgánicos (glúcidos, lípidos, proteínas, vitaminas), y los componentes minerales (Ca, Na, K, Mg, Cl). La leche contiene diferentes grupos de nutrientes. Las sustancias orgánicas (glúcidos, lípidos, proteínas) están presentes en cantidades más o menos iguales y constituyen la principal fuente de energía. Estos nutrientes se reparten en elementos constructores, las proteínas, y en compuestos energéticos, los glúcidos y los lípidos. (21)

3.1.2 Propiedades Químicas

El pH de la leche es ligeramente ácido (pH comprendido entre 6,6 y 6,8). Otra propiedad química importante es la acidez, o cantidad de ácido láctico, que suele ser aproximadamente entre un rango de 0,15-0,16% presente en la leche. Las sustancias proteicas de la leche son las más importantes en el aspecto químico. Se clasifican en dos grupos: proteínas (la caseína se presenta en 80% del total proteínica, mientras que las proteínas del suero lo hacen en un 20%), y las enzimas. (21)

3.2 Contaminación de la Leche.

3.2.1 En la granja.

Durante la operación normal del ordeño la leche está expuesta a la contaminación por microorganismos del propio animal, sobre todo por los existentes en la parte externa de la ubre y zonas próximas a la misma; bacterias

encontradas en el estiércol, en el suelo y en el agua, pueden llegar a la leche a partir de esta fuente de contaminación.

Probablemente, las dos fuentes de contaminación más importantes sean los utensilios que se emplean en el ordeño y las superficies que contactan con la leche, entre los que se incluyen los cubos o las máquinas de ordeño, según sea la forma de ordeño, los coladores, los recipientes en los que se recoge la leche o las tuberías por las que circula, y el refrigerador de la leche. Si estos no se limpian, desinfectan, y secan convenientemente, es posible que las bacterias se multipliquen abundantemente en los restos de leche y después contaminen la leche que entra en contacto con las citadas superficies. Entre estas bacterias se incluyen los estreptococos lácticos, las bacterias coliformes, los bacilos psicrótrofos gram negativos, y las bacterias termodúricas, por ejemplo, los micrococos, los enterococos, los bacilos, y las brevibacterias. Por lo general, estas bacterias crecen bien en la leche y, por consiguiente, comprometen su calidad de conservación. (3)

Otras posibles fuentes de contaminación son las manos y brazos del ordeñador y de los obreros que trabajan en la granja de vacas lecheras, el aire del establo o el de la sala de ordeño, y las moscas.

Normalmente, estas fuentes de contaminación aportarían muy pocas bacterias, aunque podrían constituir una fuente de microorganismos patógenos o de microorganismos capaces de alterar la leche. La calidad del agua procedente de

la red de abastecimiento de la granja que se emplea en la sala de ordeño para las operaciones de limpieza, aclarado, etc., influirá algo en la calidad de la leche. (11)

3.2.2 Durante su Transporte y Elaboración.

Otras fuentes de contaminación después de haber salido la leche de la granja incluyen el camión cisterna, los tubos que se emplean para trasvasar la leche, los utensilios para la recogida de muestras, y el equipo de la central lechera. También aquí las fuentes de contaminación más importantes son las superficies con las cuales contacta la leche. Es posible que las tuberías de conducción de leche, los cubos, los tanques, las bombas, las desnatadoras, las clarificadoras, las homogeneizadoras, los refrigeradores, los filtros, los agitadores, y las embotelladoras actúen como fuentes de bacterias. La cantidad o nivel de contaminación procedente de cualquiera de estas fuentes depende de los procedimientos de limpieza y desinfección empleados. (3)

3.3 Alteración de la Leche

La leche es un excelente medio de cultivo para una gran cantidad de microorganismos, por su elevado contenido de agua, por su pH próximo a la neutralidad, y por contener una gran cantidad de nutrientes que utilizan los microorganismos. Debido a la tendencia a emplear temperaturas de pasteurización cada día más elevadas, con mayor frecuencia la flora microbiana

que altera la leche pasteurizada está constituida por bacilos termorresistentes esporógenos que pueden ser psicrótrofos.

Cuando la leche se acidifica se suele considerar alterada, sobre todo si cuaja. Los signos de la formación de ácido son primeramente un sabor ácido y después la coagulación de la leche para dar lugar a un coágulo sólido parecido a la gelatina, de consistencia más débil, que libera un suero transparente. La fermentación láctica es más probable que tenga lugar en la leche fresca que se mantiene a temperatura ambiente.

La pasteurización de la leche destruye las bacterias con mayor actividad acidificante, aunque es posible que permita que sobrevivan las bacterias lácticas termoresistentes (por ej., los *Enterococos*, *Streptococcus thermophilus* y los *Lactobacilos*), los cuales pueden dar origen a una fermentación láctica si la temperatura a la que se almacena la leche es lo suficientemente elevada.

Las bacterias coliformes producen pequeñas cantidades de ácido láctico y grandes cantidades de productos volátiles, como por ejemplo hidrógeno, dióxido de carbono, ácido acético, ácido fórmico, alcohol, etc. (3)

3.3.1 Producción de gas

Los principales microorganismos productores de gas son las bacterias coliformes, las especies del género *Clostridium*, las especies de *Bacillus* productoras de gas, que producen a la vez hidrógeno y dióxido de carbono, así

como las levaduras, las bacterias propiónicas, y las bacterias lácticas heterofermentativas que únicamente producen dióxido de carbono.

La producción de gas en la leche se pone de manifiesto por la aparición de espuma en la superficie si la leche es líquida y está súper saturada de gas, por la existencia de burbujas de gas atrapadas en la cuajada o formando surcos en la misma.

Tanto la posibilidad de que en la leche se produzca gas como el tipo de microorganismos que lo producen, dependen no sólo de los tratamientos previos a los que se halla sometido la leche, sino también de la temperatura a la que se conserve.

Por lo tanto, en la leche que ha sido sometida a calentamiento a las temperaturas que se emplean para pasteurizarla, o a temperaturas superiores, las principales bacterias productoras de gas serán destruidas, las esporas de las especies de los géneros ***Clostridium*** y ***Bacillus*** sobrevivirán, y es posible que tenga lugar la producción de gas por parte de especies esporógenas. (3)

3.3.2 Viscosidad.

La viscosidad de origen bacteriano es producida por la sustancia mucosa de la cápsula de las bacterias, generalmente gomas o mucinas, y normalmente se suele presentar en la leche que se conserva a temperaturas bajas.

Hay dos tipos principales de viscosidad de origen bacteriano:

- Viscosidad en la parte superior de la leche: es originada con mayor frecuencia por ***Alcaligenes viscolactis***, microorganismo procedente principalmente del agua o del suelo que es capaz de crecer bastante bien a temperaturas próximas a 10°C.
- Viscosidad en toda la masa líquida de la leche: es producida por cualquiera de las especies de bacterias: ***Escherichia coli cloacae***, y rara vez ***Escherichia coli***.

Puesto que las bacterias que producen la viscosidad de la leche proceden del agua, del estiércol, de los utensilios, y de los piensos, la reducción o la supresión de la contaminación debida a estas fuentes contribuyen a evitar la aparición de la viscosidad. La conveniente pasteurización de la leche destruye con facilidad la mayoría de las especies de bacterias citadas. (3)

3.3.3 Modificaciones de sabor.

La leche recién ordeñada tiene un sabor débil, ligero, y se modifica con facilidad. Entre algunos sabores anormales producidos por microorganismos tenemos:

- Sabor agrio o ácido: La acidez neta es producida por ***Streptococcus lactis*** y por otras bacterias lácticas; y la acidez penetrante, es producía por las bacterias coliformes, las especies de ***Clostridium*** y otros microorganismos los

cuales producen importantes cantidades de ácidos grasos volátiles (fórmico, acético, o butírico).

- Sabores amargos: El sabor amargo suele ser debido a la proteólisis, aunque también puede ser debido a la lipólisis e incluso a la fermentación de la lactosa. Algunos microorganismos que generan sabor amargo a la leche son ciertas cepas de bacterias coliformes y de levaduras esporógenas. Algunos cocos producen a la leche un sabor muy amargo.
- Sabor azúcar quemado: Producen este sabor, que recuerda el de la leche cocida o sobrecalentada, ciertas cepas de ***Streptococcus lactis* var. *Maltigenes***.
- Otros varios sabores: sabor parecido al de los nabos, producido por ***Escherichia coli*** y ***Pseudomonas fluorescens***; un sabor a malta, producido por los micrococos amarillos de la ubre; el sabor a frutas, debido a ***Pseudomonas fragi***. (3)

3.3.4 Modificaciones del color

El color de la leche puede ser debido a que en su superficie crecen formando espuma o un anillo de bacterias y mohos que elaboran pigmentos, o el color puede afectar a toda la masa de la leche.

- Leche azul: Cuando se encuentra en la leche en cultivo puro, ***Pseudomonas syncyanea*** le comunica un color que varía de gris-azulado a parduzco, pero cuando crece en la misma junto con una bacteria productora de ácido, como es por ejemplo ***Streptococcus lactis***, le comunica una coloración azul intensa.
- Leche amarilla: ***Pseudomonas synxantha*** puede producir una coloración amarilla en la capa de nata de la leche, coincidente con la lipólisis y con la proteólisis.
- Leche parda: El color pardo de la leche puede ser consecuencia del crecimiento de ***Pseudomonas putrefaciens*** o ser debida a la oxidación enzimática de la tirosina por ***Pseudomona fluorescens***.⁽³⁾

3.3.5 Alteración de la leche a diferentes temperaturas

A una temperatura dada de almacenamiento la mayoría de las muestras de leche fresca experimentan una serie de modificaciones típicas producidas por una sucesión de microorganismos. A temperaturas de refrigeración, es posible que la proteólisis sea iniciada por bacterias psicrótrofas, como son las especies de ***Pseudomonas***, y es posible que a continuación aparezcan los mohos. A temperaturas ambientales, lo más probable es que la leche experimente una fermentación ácida, primeramente por estreptococos lácticos y bacterias coliformes y, posteriormente, como consecuencia del crecimiento de los

lactobacilos ácido tolerantes. A continuación, los mohos o las levaduras que crecen en película en la superficie de la leche disminuyen su acidez, permitiendo que se produzca más ácido. Finalmente, cuando ha sido destruido la mayor parte del ácido, las bacterias proteolíticas o bacterias de la putrefacción completan la descomposición.

La pasteurización, de la manera que se emplea a escala comercial, destruye las levaduras, los mohos, casi todas las bacterias psicrótrofas, los coliformes, y las bacterias que producen ácido con rapidez, como por ejemplo *Streptococcus lactis*. (3)

3.4 Leche Pasteurizada y Ultrapasteurizada.

3.4.1 Proceso de Pasteurización de la leche

Es un tratamiento de calor moderado que elimina las bacterias patógenas que pudieran estar presentes. Para efectuar la pasteurización, la leche puede calentarse hasta 62°C (145°F) y mantenerse a esa temperatura por 50 minutos, o bien calentarse a 72°C (161°F) y conservarse así por 15 minutos. Este último produce menos daño al sabor. Como resultado de la pasteurización se destruye un gran número de bacterias, además de las patógenas, aunque algunas no patógenas permanecen en la leche. Por esta razón, la leche se enfría inmediatamente después de la pasteurización hasta 10°C (50°F) o de preferencia más bajo, para evitar el rápido crecimiento y multiplicación de las

bacterias que permanecen. La enzima fosfatasa sirve como indicador interno por el que se conoce lo adecuado de la pasteurización. Esta prueba es tan sensible que si se añade un 0.1 por ciento de leche bronca a la leche pasteurizada se puede detectar, como también puede detectarse el hecho que la temperatura de pasteurización estuviera un grado Fahrenheit más bajo. La enzima lipasa se inactiva por la pasteurización, lo que evita que la leche homogenizada se haga rancia. (5) (15)

3.4.2 Alteración de Leche pasteurizada

La microflora alterante de la leche pasteurizada es de dos tipos:

- Los microorganismos contaminantes que llegan a la leche después del tratamiento térmico: son fundamentalmente Gram negativos con forma de bastoncito y son capaces de colonizar las superficies en contacto con la leche, incluyendo el acero inoxidable. Los análisis que son realizados inmediatamente después del tratamiento, indican que los microorganismos del género **Enterobacteriaceae**, incluyendo a **Serrana**, **Enterobacter**, **Citrobacter**, son los que se suelen encontrar en mayor número. Estas bacterias proceden del ambiente y probablemente tienen su origen en el agua y, excepto **Escherichia coli**, no tienen papel como organismos indicadores.
- Las bacterias termorresistentes que han sobrevivido al calentamiento en el proceso de la pasteurización: son de dos tipos, géneros formadores de

endosporas y géneros cuyas formas vegetativas son muy resistentes al calor. Los primeros son los más importantes y las endosporas que se aíslan en la leche pasteurizada, reflejan el número y tipo de las que se encontraban en la leche cruda. Las especies de *Bacillus* son muy frecuentes y numerosas.

Los microorganismos alterantes más importantes son los que llegan a la leche como contaminantes después del tratamiento. (11)

Una vez que la leche se pasteuriza y se cierra herméticamente el envase de cartón en el que se ha introducido, la flora microbiana existente en la misma se estabiliza, a no ser que el envase de cartón pierda su integridad. Por consiguiente, la temperatura de almacenamiento determinará cuál será el microorganismo predominante y la rapidez con que se alterará la leche en cada uno de los envases de cartón. De igual modo, si la temperatura de almacenamiento permanece fija, tanto el número como el tipo de microorganismos inicialmente existentes en la leche después de su pasteurización influyen en la velocidad con que se altera.

Teniendo en cuenta la extraordinaria refrigeración a que se somete en la actualidad la leche (tanto la fresca como la pasteurizada) y la continua tendencia a emplear temperaturas de pasteurización cada vez más elevadas, es lógico esperar que los microorganismos psicrótrofos muy termorresistentes constituyan un problema en la leche pasteurizada. Los problemas que se presentan en la actualidad en la leche pasteurizada están relacionados con los bacilos psicrótrofos esporógenos. (3)

3.4.3 Protección de la leche pasteurizada frente a la recontaminación

La prevención de la contaminación no es un proceso tecnológico como la pasteurización o la homogeneización, pero tiene una gran importancia en la producción de una leche pasteurizada con garantías de seguridad y con una vida en almacenamiento satisfactoria. Las piezas individuales del equipo, como los intercambiadores de calor de placas, están diseñadas y construidas de forma que las posibilidades de que el producto pasteurizado se contamine por la leche cruda o por otras fuentes, sean mínimas, pero es necesario tener en cuenta el potencial contaminante de la planta completa y sus operaciones. La leche circula por la planta hasta su envase final a través de conducciones cerradas y tanques y no deben realizarse operaciones manuales. Si a pesar de todas las precauciones, se produjera la contaminación de la leche pasteurizada, las consecuencias pueden ser muy graves para la salud pública y para la conservabilidad del producto.

Es muy importante garantizar que no se produce contacto en ningún momento entre el equipo de la leche cruda, las conducciones, el equipo y las conducciones de la leche pasteurizada y que los sistemas de limpieza in situ (CIP) están también totalmente separados. La seguridad de la planta debería revisarse después de cualquier cambio en la disposición del equipo y en el funcionamiento de las tuberías. (11)

3.4.4 Ultrapasteurización

La ultrapasteurización, también conocida por las siglas UHT (*Ultra High Temperature*) y UAT (Ultra Alta Temperatura), es un proceso térmico para obtener esterilidad comercial en alimentos como la leche, sin cambiar sus propiedades nutricionales y cambiando su sabor ligeramente.

3.4.5 Proceso de Ultrapasteurización (UHT)

Consiste en exponer la leche durante un corto lapso (de 2 a 4 segundos) a una temperatura que oscila entre 135 y 140 °C y seguido de un rápido enfriamiento, no superior a 32°C. Esto se hace de una forma continua y en recinto cerrado que garantiza que el producto no se contamine mediante el envasado aséptico. Este proceso aporta a la leche un suave sabor a cocido debido a una suave caramelización de la lactosa (azúcar de la leche).

La alta temperatura reduce el tiempo del proceso, y de esta manera se reduce también la pérdida de nutrientes. El producto UHT más común es la leche, pero el proceso también puede ser aplicado a zumos de frutas, cremas, yogures, vino, sopas y guisos. La leche UHT ha tenido un gran éxito en Europa, donde 7 de cada 10 europeos la beben.

Su mayor fabricante es Parmalat. En el mercado norteamericano se intentó introducir la leche UHT, pero los consumidores desconfían de productos lácteos almacenados a temperatura ambiente y han sido mucho más reacios a

comprarla. La leche UHT tiene una vida típica de seis a nueve meses, antes de que se abra. (23)

3.5 Leches Saborizadas.

Las Leches con sabor son leches azucaradas o bebidas hechas con leche, azúcar, colorantes artificiales y sabores naturales. Las leches con sabor a menudo son pasteurizadas utilizando ultra alta temperatura (UHT), tratamiento, que le da una mayor vida útil que la leche normal. Se añaden saborizantes para hacerla más apetecible, sobre todo a los niños. Puede ser vendido como un polvo que se añade a la leche normal, como Nesquik o comprar pre-mezclado junto a otros productos lácteos. (20)

3.5.1 Características

- Características generales

La leche con sabor pasteurizada debe estar limpia, libre de materias extrañas, sabores y olores objetables. Se puede adicionar con vitaminas A y D y otros nutrientes.

- Parámetros Químicos

En la Tabla N°1 se presentan las especificaciones de los requisitos que debe cumplir la leche saborizada.

Tabla N° 1. Requisitos Químicos.

Características	Entera	Semidescremada	Descremada
Contenido de grasa láctea, % m/m	3,0 mínimo	>0,15 y <3,0	< 0,15
Proteína (N x 6.38), % m/m	3,0 mínimo	3,0 mínimo	3,0 mínimo

- Almacenamiento y Transporte.

Para su almacenamiento en bodega, transporte, y lugar de venta, la leche pasteurizada o ultrapasteurizada debe estar a una temperatura de 4,4 °C y envasada en recipientes perfectamente limpios e higienizados y de cierre adecuado para prevenir la contaminación del producto. Durante el periodo de comercialización se debe mantener la cadena fría y buenas prácticas de manejo del producto. (4)

3.5.2 Requisitos microbiológicos

En la Tabla N° 2 se presentan los requisitos microbiológicos de las leches saborizadas las cuales no deben contener microorganismos en un número no mayor de lo especificado.

Tabla N° 2. Requisitos Microbiológicos (5)

Parámetro	Límite
<i>Escherichia coli</i>	< 3 NMP/ml
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ² UFC/ml
<i>Salmonella spp</i> /25 g	Ausencia

3.5.3 Sabores de las Leches Saborizadas.

El sabor más común es el chocolate, que se logra con el polvo de cacao. Una variante de leche con sabor a chocolate son las bebidas de barra de dulce, que imitan los sabores de dulces populares.

Otros sabores comunes de la leche son: fresa, plátano y café. Menos comúnmente, sabores a crema de Cookies'n, cal, malta, mango, papaya, cerveza de raíz, frutas tropicales, vainilla y crema de vainilla. Con la excepción de la leche de chocolate, muchos de estos sabores son artificiales. (20)

- Leches con sabor a chocolate

La leche chocolatada, o con chocolate es una bebida preparada de leche con cacao, que puede tomarse fría o caliente, con o sin azúcar. Puede comprarse preparada de fábrica o hacerla en casa mezclando leche y cacao en polvo . Al igual que la leche común, la chocolatada debe mantenerse refrigerada una vez abierta. Otros ingredientes, tales como almidón, sal, carragenina, vainilla o saborizante artificial puede ser agregado. Una solución es necesaria para mezclar los dos sabores (leche y chocolate, de ahí el nombre de la bebida mixta). (19)

- Leche con sabor a Fresa

La leche de fresa: es aquella que se prepara, ya sea con fresas frescas mezcladas con leche, con polvo de fresa o con un jarabe con sabor a fresa. Es un desarrollo relativamente reciente en el mundo lechero; que todavía no se ha

ganado la fama común que la leche de chocolate tiene, pero se vende en las tiendas más que en el pasado. La leche de fresa sobre todo comenzó a ganar popularidad en las cafeterías de América del Norte. Nesquik también hace una leche en polvo de fresa.

La leche de fresa es muy popular en Alemania, donde es la alternativa más común a la leche de chocolate. (22)

3.5.4 Clasificación según Características Fisicoquímicas

La leche con sabor pasteurizada se clasifica según sus características fisicoquímicas en los siguientes tipos:

- Leche entera (íntegra) con sabor y/o aroma, pasteurizada, homogenizada y enriquecida con vitaminas A y D o no: Es la leche de vaca cuyo contenido de grasa mínimo es de 3.0% m/m.
- Leche semidescremada con sabor y/o aroma, pasteurizada, homogenizada y enriquecida con Vitaminas A y D: Es la leche de vaca cuyo contenido de grasa es mayor de 0.15% y menor de 3.0% m/m.
- Leche descremada con sabor y/o aroma, pasteurizada, homogenizada, y enriquecida con vitaminas A y D: Es la leche de vaca cuyo contenido de grasa es menor o igual a 0.15% m/m.

La leche reconstituida entera (íntegra), semidescremada o descremada pasteurizada podrá adicionarse de:

- Edulcorantes autorizados.
- Saborizantes autorizados
- Colorantes autorizados.
- Estabilizadores y/o emulsificantes autorizados. (4)

La leche con sabor entera, semidescremada o descremada puede ser enriquecida con vitaminas y/o minerales. El contenido de vitaminas en producto terminado puede ser:

- Vitamina A: 2 000 UI/L
- Vitamina D: 400 UI/L (4)

3.6 Proceso de elaboración de la leche fresca y saborizada.

La leche es considerada como una de las mejores fuentes disponibles de alimentación en ayuda de un saludable desarrollo de dientes y huesos fuertes en el crecimiento de los niños. Por esta razón se ha introducido la leche con sabores para aquellas personas que no les gusta la leche fresca o regular. La preferencia por este tipo de leche está creciendo continuamente. (15)

3.6.1 Descripción del Proceso.

- Procesamiento de Leche Fresca.

La leche pura, que es enviada desde varios establos, es bombeada dentro de un tanque de almacenamiento.

Luego es bombeada a través de un filtro y colocada en un clarificador para remover el sarro, piel y barro a través de una fuerza centrífuga.

Crema y algunos aditivos (por ejemplo vitaminas extra) son añadidos a la leche clarificada, que luego es colocada dentro de un homogenizador. Los emulsificantes homogenizadores actúan sobre la grasa presente en la leche usando altas presiones para forzarlo a través de unas aberturas muy finas contra una superficie dura con la finalidad de impedir la separación de la crema.

La leche homogenizada es descargada dentro de un sistema de pasteurización de alta temperatura (UHT) para su pasteurización y enfriamiento. Este proceso destruye las bacterias generadoras de enfermedades que pueden existir en la leche, haciendo un producto higiénico y seguro para beber.

Después de su enfriamiento, la leche es colocada en un tanque colector para ser almacenado temporalmente.

Luego la leche fluye dentro de la máquina llenadora que está ubicada por debajo del tanque colector. Esta máquina rellena, sella y pone la fecha en las cajas automáticamente.

Las cajas de leche que son selladas son trasladadas dentro del almacén de refrigeración a través de un transportador donde ellas permanecerán hasta su comercialización.

- Procesamiento de Leche Saborizada.

Azúcar y leche en polvo desnatada son diluidos en agua caliente y mezclados con el jugo de fruta que se desea procesar.

Luego esta mixtura es mezclada con leche pura que es bombeada desde el tanque de almacenamiento hasta el tanque mezclador.

Desde este punto el procedimiento usado para el procesamiento de la leche con sabor a fruta es el mismo que el usado para el procesamiento de la leche fresca o regular. (15) (ver anexo N° 5)

3.7 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

ETAs o también conocidas como enfermedades transmitidas por alimentos, son muy frecuentes en la mayoría de los países. Pero pocas personas saben que los alimentos que consumen todos los días pueden causarles enfermedades. Llamadas así porque el alimento actúa como vehículo en la transmisión de organismos patógenos que nos enferman y sustancias tóxicas. (12)

Las ETAs se dividen en dos grades grupos:

Intoxicación alimentaria bacteriana.

Son las enfermedades alimentarias causadas por la presencia de una toxina bacteriana que se ha originado en el alimento. (3)

Infección alimentaria bacteriana.

Son las enfermedades alimentarias originadas por la entrada de bacterias en el organismo por ingestión de alimentos contaminados y a la reacción del organismo provocada por su presencia o por sus metabolitos.

Las infecciones alimentarias se pueden dividir en dos tipos:

- Infecciones alimentarias en las que los microorganismos patógenos no necesariamente se multiplican en el alimento, sino que el alimento sólo actúa como vehículo, siendo éste el caso de microorganismos patógenos como los que producen la tuberculosis, la difteria, las disenterías, la fiebre tifoidea, el cólera, la hepatitis infecciosa, la fiebre Q, y otros.
- Infecciones alimentarias en las que el alimento puede servir de medio de cultivo para que los microorganismos patógenos se multipliquen en él y alcancen cifras que aumentarán la posibilidad de que el consumidor del alimento se infecte; en este tipo de enfermedades se incluyen las producidas por los microorganismos de las especies de ***Salmonella spp***, ***Vibrio parahaemolyticus***, y por ***Escherichia coli enteropatógeno***. (3)

3.7.1 Intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus*.

3.7.1.1 Características del género.

Se trata de un estafilococo típico, que se presenta en acúmulos parecidos a los racimos de uvas, en parejas o en forma de cadenas cortas. Sobre medios sólidos crece dando colonias que suelen ser de color dorado o amarillo, aunque es posible que algunas carezcan de pigmento.

La mayoría de los cultivos que producen enterotoxina son coagulasa positivos (coagulan el plasma sanguíneo), son facultativos en cuanto a su exigencia de oxígeno en un medio glucosado complejo, aunque en aerobiosis crecen mejor que en anaerobiosis. No obstante. Algunos cocos productores de toxina son muy halotolerantes (toleran concentraciones de NaCl del 10 al 20 por ciento), y también toleran bastante bien los nitritos.

También toleran bastante bien los azúcares disueltos (de un 50 a un 60 por ciento de sacarosa). Son fermentativos y proteolíticos aunque en la mayoría de los alimentos no suelen producir olores repugnantes ni los convierte en alimentos de aspecto desagradable. ***Staphylococcus aureus*** se multiplica con mayor rapidez a temperaturas comprendidas entre 20 y 45°C; no obstante, la multiplicación a 45°C es cuatro veces más rápida que a 20°C. (2)

Los estafilococos son capaces de producir enterotoxina en la leche o en los productos lácteos.

El intervalo de las condiciones que permiten el crecimiento del estafilococo y, por consiguiente, la producción de enterotoxina, depende del alimento implicado.

En general, cuanto mejor es el alimento como medio para que se multipliquen los cocos, tanto más amplios son los intervalos correspondientes a la temperatura, al pH y A_w dentro de los cuales puede tener lugar su multiplicación. (2)

3.7.1.2 Enfermedad Producida.

Una de las intoxicaciones alimentarias que se presentan con mayor frecuencia es la originada por la ingestión de la enterotoxina que se forma en los alimentos cuando en los mismos se multiplican ciertas cepas de *Staphylococcus aureus*. La toxina recibe la denominación de enterotoxina porque produce gastroenteritis o inflamación de la mucosa que reviste el tracto gastrointestinal.

El intervalo de temperaturas dentro del cual tienen lugar la multiplicación y la producción de todas las toxinas está comprendido entre los 4 y los 46°C aproximadamente, según el alimento de que se trate. (3)

En este tipo de intoxicación, el período de incubación (tiempo transcurrido entre la ingestión del alimento y la aparición de los primeros síntomas) suele ser corto, pues suele tener una duración de 2 a 4 horas (oscilando desde 1 a 7 horas). (3)

3.7.1.3 Alimentos implicados

Como causantes de intoxicaciones alimentarias se incluyen carnes y productos cárnicos, el pescado y los productos derivados del mismo, la leche y los productos lácteos, las salsas en las que entra como ingrediente la nata, las ensaladas, los budines, las natillas, las empanadas, y los aderezos de las ensaladas. (3)

3.7.1.4 Sintomatología y Diagnóstico

Los síntomas más corrientes en el hombre son: salivación, a continuación náuseas, vómitos, arcadas, retortijones abdominales de intensidad variable, y diarrea. En casos de intoxicación grave, en las heces y en los vómitos se pueden encontrar sangre y mucosidad. Es posible que se presenten cefalalgia, calambres musculares, sudoración, escalofríos, abatimiento, pulso débil, shock, y respiración superficial. Por lo general, en lugar de fiebre, se registra una temperatura corporal inferior a la normal. Su curso es corto, generalmente de un día o dos, y normalmente la curación es total y sin complicaciones.

Por lo general, no se administra tratamiento alguno, a no ser que se trate de casos graves, en cuyo caso se puede administrar solución salina por vía parenteral con el fin de restablecer el balance salino y combatir la deshidratación. (2)

3.7.2 Salmonelosis

3.7.2.1 Características del género.

Las *salmonellas spp* son bacilos gram negativos esporógenas que fermentan la glucosa, generalmente con producción de gas, no fermentan ni la lactosa ni la sacarosa. Cuando el medio de cultivo es apropiado, crecen dentro de intervalos de temperaturas, de pH, y de actividad de agua (a_w) más amplios que cuando se trata de un medio de cultivo con escasez de nutrientes.

Su temperatura máxima de crecimiento es de unos 45.6°C. Crecen bien a temperatura ambiente, si bien su temperatura óptima de crecimiento es de aproximadamente 37°C.

El intervalo de pH de crecimiento se halla comprendido entre los valores 4.1 y 9.0, multiplicándose, por lo tanto, en alimentos de baja acidez.

Su actividad de agua (a_w) mínima de crecimiento varía para cada alimento aunque es de aproximadamente 0.93 a 0.95. Además, las especies y cepas de *Salmonella spp* se diferencian por su termorresistencia y por la influencia que los factores ambientales ejercen en el crecimiento. (2)

El tratamiento térmico que se aconsejan para destruir las *salmonellas spp* en los alimentos perecederos es el calentamiento de los alimentos a una temperatura de 66°C y mantenimiento de esta temperatura en todas las partes

del alimento por lo menos durante 12 minutos (o a 60°C durante 78 a 83 minutos). (2)

3.7.2.2 Enfermedad Producida

La salmonelosis puede ser consecuencia de la ingestión de células viables pertenecientes a una especie del género ***Salmonella spp.*** Se trata de la infección bacteriana de origen alimentario que se presenta con mayor frecuencia y desde hace algunos años es la enfermedad bacteriana transmitida por alimentos que se presenta con mayor frecuencia.

En las infecciones por ***Salmonella spp.***; por lo general, la bacteria infectante se ha multiplicado en el alimento hasta alcanzar cifras elevadas, aumentando de esta forma la posibilidad de que se produzca la infección, y con frecuencia originando brotes de enfermedad en familias o en otros grupos de mayor número de personas.

La probabilidad de infección por ingestión de un alimento que contiene ***salmonellas spp*** depende de la resistencia del consumidor, de la infecciosidad de la cepa de ***Salmonella spp*** en cuestión, y del número de microorganismos ingeridos. Su periodo de incubación es largo: suele ser de 12 a 36 horas. (3)

En algunas infecciones por ***Salmonella spp*** el período de incubación puede ser más corto (del orden de unas 5 horas) o más largo (de hasta 72 horas). (3)

3.7.2.3 Alimentos implicados.

En la producción de los brotes de infecciones por ***Salmonella spp*** se hallan implicados un gran número de alimentos. La leche y los productos lácteos, incluso la leche fresca, las leches fermentadas, los helados, y el queso, han producido infecciones salmonelósicas. (2)

3.7.2.4 Sintomatología y Diagnóstico

Los principales síntomas de toda infección gastrointestinal por ***Salmonella spp*** son: náuseas, vómitos, dolor abdominal, y diarrea que suele aparecer súbitamente. La diarrea a veces va precedida de cefalalgia y escalofríos. Otros síntomas de la enfermedad son: heces líquidas, verdosas y malolientes, abatimiento, debilidad muscular, lasitud, generalmente fiebre moderada, desasosiego, contracciones nerviosas, y somnolencia.

La mortalidad es baja, siendo inferior al 1 por ciento. La gravedad y duración de la enfermedad no sólo dependen de la cantidad de alimento ingerido, y por consiguiente del número de ***Salmonelas spp*** ingeridas, sino también de la sensibilidad individual.

La intensidad de los síntomas puede oscilar desde un ligero malestar y la existencia de diarrea hasta la presentación de la muerte en un plazo de 2 a 6 días. Los síntomas suelen persistir durante 2 a 3 días, transcurridos los cuales, la enfermedad cura sin complicaciones, aunque a veces se puede prolongar

durante semanas e incluso meses. Entre un 0,2 y un 5 por cien de los enfermos pueden ser portadores de ***Salmonellas spp.***

El diagnóstico de laboratorio de esta enfermedad resulta difícil a no ser que se pueda aislar ***Salmonella spp*** tanto en el alimento sospechoso como en las heces de los enfermos. No obstante, muchas veces ya no se dispone de los alimentos implicados, y los microorganismos desaparecen del tracto intestinal.

(3)

3.7.3 *Escherichia coli* enteropatógeno

3.7.3.1 Características del género

La especie ***Escherichia coli*** es considerada generalmente como integrante de la flora normal del tracto intestinal del hombre y de los animales. La temperatura óptima de crecimiento del microorganismo es de 37°C, con un intervalo de crecimiento de 10 a 40°C.

Su pH óptimo de crecimiento es de 7,0 a 7.5, con un pH mínimo de crecimiento de valor 4.0 y un pH máximo de crecimiento de valor 8.5. Este microorganismo es relativamente termosensible y puede ser destruido con facilidad a temperaturas de pasteurización y también mediante la apropiada cocción de los alimentos. (2)

3.7.3.2 Enfermedad Producida.

En el hombre, los síndromes de enfermedad como consecuencia de la ingestión de EEC se han dividido en dos grupos principales.

- El primer grupo está integrado por cepas que elaboran una enterotoxina y que producen una enfermedad parecida al cólera o enfermedad enterotoxigénica en las personas. Para que se desencadenen dicha enfermedades, se precisa la ingestión de serotipos de EEC capaces de elaborar las enterotoxinas, seguida de la colonización de los microorganismos en el tramo superior del intestino delgado y de la producción de las enterotoxinas.
- El otro gran grupo está integrado por cepas invasoras que elaboran una citotoxina y originan una enfermedad invasora, colitis, o un síndrome disenteriforme; Se multiplican en el colon, e invaden o penetran en las células epiteliales de su mucosa.

Para que se presenten tanto la enfermedad enterotoxigénica como la enfermedad invasora, se necesita una elevada dosis de EEC. Por consiguiente, para que tenga lugar una abundante multiplicación, los alimentos deben estar contaminados masivamente o deben estar incorrectamente conservados o refrigerados. (3)

3.7.3.3 Diagnostico

La base del tratamiento es de apoyo. Aunque la *Escherichia coli* es sensible a los antibióticos de uso común.

Los antibióticos no han demostrado aliviar los síntomas, reducir el transporte por el organismo o prevenir el síndrome hemolítico urémico. Se sospecha que las fluroquinolonas aumentan la liberación de enterotoxinas. (3)

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio (7)

4.1.1 Transversal: Se considera transversal porque se llevó a cabo durante un período aproximado de siete meses donde se estudió el problema de interés.

4.1.2 Experimental: Se realizó la determinación de microorganismos patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus*; en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD)

4.1.3 Prospectivo: Se registró la calidad microbiológica de las leches saborizadas por marca que se comercializan en la actualidad en los principales supermercados del distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador.

4.2 Investigación Bibliográfica.

Se realizó en las Bibliotecas de:

- Facultad de Química y Farmacia, “Dr. Benjamín Orozco” de la Universidad de El Salvador (UES).
- Facultad de las Ingenierías de la Universidad de El Salvador (UES).
- Central de la Universidad de El Salvador (UES).

- Facultad de Química y Farmacia de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM).
- Internet.

4.3 Investigación de campo, universo y muestra.

4.3.1 Universo: Todas las leches saborizadas distribuidas en los supermercados del distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador.

4.3.2 Muestra: Leches saborizadas seleccionadas por marca de los sabores fresa y chocolate que son las de mayor consumo que se distribuyen en dichos supermercados.

4.3.3 Muestreo: Se realizó un muestreo dirigido puntual en los principales supermercados del distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador. Se realizó al azar la selección de los establecimientos, ya que en todos ellos comercializan las leches saborizadas por marca de los sabores de fresa y chocolate.

Además se realizó una inspección en los supermercados donde se muestreo utilizando una lista de chequeo (ver anexo N°3), para identificar las condiciones en las que se encuentran las leches saborizadas en los centro de venta. (1)

Para obtener el número total de muestras a analizar, fue necesario utilizar una prueba piloto con 24 muestras (12 de fresa y 12 de chocolate); ya que se muestrearon tres diferentes supermercados, uno por línea comercial, en los

cuales se comercializan cuatro diferentes marcas de leches saborizadas de sabor fresa y chocolate, y luego a partir de los resultados que se obtuvieron en la prueba piloto se determinó el número de muestras a analizar.

3 supermercados X 4 marcas X 2 sabores = 24 muestras.

4.3.4 Cálculos estadísticos para la determinación del número total de muestras

Para conocer el número de muestras que se necesitaban para el estudio, se realizó la prueba piloto, lo cual se obtuvo a través de los datos obtenidos mediante la fórmula siguiente:

Fórmula:

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

Donde:

Z = Grado de confianza del 95%

p y q = Desviación típica o estándar de la población.

d = Error muestral máximo permisible en la investigación. (1)

4.3.5 Datos obtenidos a partir de la prueba piloto.

Z = 1.96 (valor obtenido a través de las de tablas de áreas bajo la curva normal.)

p y q: Desviación típica o estándar de la población.

p = Muestras que dieron positiva la prueba = 0 muestras 0.0 (muestras a las cuales se les determinó que no cumplen con el Reglamento Técnico Centroamericano)

q= Muestras que dieron negativa la prueba = 24 muestras = 1.0 (muestras a las cuales se les determinó que si cumplen con el Reglamento Técnico Centroamericano).

d= 0.9 (valor equivalente a la unidad, que representa el % de error que en el estudio se permite, que en este caso sería el 10 % de error y por lo tanto equivale a 90 %, y como corresponde a la unidad es igual a 0.9)

Sustituyendo en la fórmula:

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.0) (1.0)}{(0.9)^2} = \frac{(0)}{(0.9)^2}$$

$$n = 0 \text{ muestras}$$

Número de muestras a muestrear y analizar = cero muestras

Interpretación: Según los resultados obtenidos en la prueba piloto, y sustituyendo en la fórmula estos datos, demuestra que la representatividad de las muestras analizadas en la prueba piloto son suficientes para la determinación de la inocuidad microbiológica, ya que al dar un 100.0 % de

muestras negativas y un 0.0 % de muestras positivas durante el análisis, se llega a un resultado de 0 en la resolución de la fórmula que nos da el número de muestras necesarias para analizar, según el estudio y herramienta estadística. Por lo tanto ya no fue necesario realizar un análisis posterior a la prueba piloto, por ser ésta lo suficientemente representativa.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

4.4.1. Procedimiento para el muestreo:

Tabla N° 3: Listado de supermercados del área metropolitana San Salvador.

SUPER SELECTOS			
Antel centro	Arce	Autopista sur	Beethoven
Caribe	Centro 1	Centro Libertad	Escalón
España	Feria rosa	La Cima	Los Santos
Masferrer	MetroSur*	MetroCentro*	Miralvalle 1*
Morazán	San Jacinto	San Miguelito 1	Santa Emilia
San José	San Miguelito 2	San Benito	San Luis*
Trigueros	Olímpica	Miralvalle 2*	Gigante*
DESPENSA DE DON JUAN			
Centro Libertad	Escalón Norte	San Benito	Cumbres Escalón
General Arce	San Jacinto	Darío	La Cima
Terraza	MetroCentro*		
EUROPA E HIPER EUROPA			
Centro	Bernal*	Hiper Europa	

Total de sucursales Zona Metropolitana San Salvador: 41 sucursales.

Total de sucursales Distrito Dos Zona Metropolitana San Salvador: 8 sucursales

* Supermercados Distrito Dos

La selección del supermercado Súper Selectos a muestrear del distrito dos se realizó aleatoriamente colocando en una tómbola el nombre de cada una de las sucursales y luego se extrajo una sucursal; obteniéndose de esta forma el nombre de ésta. En el caso de la selección de los supermercados de la Despensa de Don Juan y Europa se realizó de forma directa ya que se contaba nada mas con una sola sucursal dentro del distrito 2, dichos resultados se presentan en la tabla siguiente:

Tabla N° 4. Listado de Supermercados muestreados.

Supermercado	Ubicación
Súper Selectos	Centro Comercial San Luis
Despensa de Don Juan	Metrocentro
Europa	Bernal

En cada supermercado seleccionado se verificó a través de una lista de chequeo las condiciones de almacenamiento por medio de inspección visual y la temperatura utilizando un termómetro digital. Luego se procedió a tomar aleatoriamente un total de ocho muestras de leches saborizadas por marca, cuatro de sabor chocolate y cuatro de sabor fresa (ver anexo N° 2) luego se colocaron en una hielera desinfectada conservando la cadena de frío, de tal

forma que no se altero la microflora y características de la muestra, luego se trasladaron a las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

Se realizó una investigación previa, acerca de la variedad comercial de leches saborizadas por marca en los diferentes supermercados.

Tabla Nº 5. Variedad comercial de leches saborizadas

Supermercado	Marca A	Marca B	Marca C	Marca D
Súper Selectos	Si	Si	Si	Si
Despensa de Don Juan	Si	Si	Si	Si
Europa	Si	Si	Si	Si

Ver anexo Nº 2

4.4.2. Identificación de la muestra

Cada muestra se identificó con sus datos completos: lugar de muestreo, fecha, hora de toma de muestra, análisis requerido, nombre del analista.

4.4.3. Procedimiento para la preparación de la muestra.

Se tomó la muestra para análisis en forma aséptica, usando un algodón impregnado de alcohol y frotando el empaque original de la muestra con el fin de quitar cualquier suciedad externa que pudiera existir y alterar los resultados; se agitó 25 veces en forma de arco de 30 cm para homogenizar el contenido.

4.4.4. Preparación de las diluciones

Dilución 10^{-1}

- En un frasco de dilución, con 90.0 mL de agua peptonada buferada pH 7.2, se agregó en forma aséptica con pipeta estéril 10.0 mL de muestra.
- Se mezcló cuidadosamente la dilución agitando 25 veces en forma de arco de 30 cm.

Dilución 10^{-2}

- Se tomó con una pipeta estéril una alícuota de 10.0 mL de la dilución 10^{-1}
- Se transfirió a un frasco de dilución con 90.0 mL de agua peptonada buferada pH 7.2.
- Se mezcló cuidadosamente la dilución agitando 25 veces en un arco de 30 cm.

Dilución 10^{-3}

- Tomar con una pipeta estéril, una alícuota de 10.0 mL de la dilución 10^{-2}
- Transferir a un frasco de dilución con 90.0 mL de búffer fosfato pH 7.2.
- Mezclar cuidadosamente la dilución agitando 25 veces en un arco de 30 cm.

Al terminar el procedimiento anteriormente descrito, no deberá transcurrir más de 15 minutos entre la dilución de la muestra y su inoculación en un medio adecuado. (6) (ver anexo N°6)

4.4.5. Recuento en Placa de *Staphylococcus aureus*

Este método es conveniente para el análisis de alimentos en que pueden esperarse más de 100 UFC/g de *Staphylococcus aureus*. (6)

Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

- De la dilución 10^{-1} se transfirió asépticamente 1 mL y se distribuyó equitativamente (0.3, 0.3 y 0.4 mL) a 3 placas con agar Baird Parker.
- Se distribuyó el inóculo sobre la superficie del agar usando un rastrillo de vidrio en L.
- Se dejaron las placas en posición horizontal hasta que el inóculo fué absorbido por el agar.
- Las placas invertidas se incubaron por un tiempo de 48 horas a una temperatura de 35°C. (6) (ver anexo N°6).
- No se observaron en las placas colonias con apariencia típica de *Staphylococcus aureus*. (ver anexo N°11)

4.4.6 Recuento de *Escherichia coli* (NMP/ml).

Prueba Presuntiva para Coliformes totales.

- De cada una de las tres diluciones preparadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), se transfirió con una pipeta estéril y por triplicado, una alícuota de 1.0 mL a cada uno de los nueve tubos conteniendo Caldo Rapidcult.
- Se incubaron los tubos a una temperatura de 35°C durante 24 ± 2 horas. se examinaron los tubos para detectar un cambio de color de amarillo tenue a azul verdoso. (9) (ver anexo N°7).
- No se obtuvieron tubos con cambio de color de amarillo tenue a azul verdoso. (ver anexo N°11).

4.4.7 Determinación de *Salmonella spp*

- Se agregaron asépticamente 25 mL de muestra a 225 mL de caldo lactosado, luego se incubó a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.
- Se transfirió 0.1 mL a un tubo que contiene 10 mL de medio Rappaport-Vassiliadis y 1.0 mL de la misma dilución a otro tubo que contiene 10 mL de caldo tetratonato, y se mezcló.
- Se incubaron los medios de enriquecimiento selectivos Rappaport-Vassiliadis y caldo de tetratonato a 24 ± 2 h a $35 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$
- Se mezclaron estos tubos y con un asa se tomó una alícuota de caldo tetratonato y se estrió en una placa de agar ***Salmonella – Shigella***.

- Se repitió el procedimiento anterior, utilizando caldo Rappaport-Vassiliadis.
- Se Incubaron las placas a una temperatura de 35° C por un tiempo de 24 ± 2 horas. (ver anexo N°8).
- No se observó en las placas la presencia de colonias sospechosas de ***Salmonella spp.*** (ver anexo N°11).

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

En las muestras analizadas en los diferentes supermercados del distrito dos de la Zona Metropolitana de San Salvador para las 24 de 4 marcas diferentes de leches saborizadas (chocolate y fresa) y su posterior análisis microbiológicos se obtuvieron los resultados siguientes. (Ver anexo N°11).

Tabla N°6. Número de lote, código, fecha de vencimiento, temperatura de almacenamiento y número asignado para el análisis de cada muestra.

Supermercado Marca		A	B	C	D
Superselectos	Chocolate	N°:1 Pasteurizada Lote: 08JV11 ERLP2 Vence:28/08/ 2010 T°: 4.1 °C	N°:2 Pasteurizada Lote:243163 B2 Vence:30/08/ 2010 T°: 4.1 °C	N°:3 UHT Lote: 14:23E Vence:30/08/ 2011 T°: 4.1 °C	N°:4 UHT Lote:16E14:33 Vence:27/03/2 011 T°: 4.1 °C
	Fresa	N°:13 Pasteurizada Lote:80JV18 AHL P2 Vence:30/08/ 2010 T°:4.2°C	N°:14 Pasteurizada Lote:243043 0BI Vence:14/09/ 2010 T°: 4.2 °C	N°:15 UHT Lote:00:50E Vence:25/01/ 2011 T°: 4.2 °C	N°:16 UHT Lote:01604:03 Vence:02/05/2 011 T°: 4.2 °C
Dispensa de Don Juan	Chocolate	N°:5 Pasteurizada Lote:08JV11 ERLP2 Vence:28/08/ 2010 T°: 4.3 °C	N°:6 Pasteurizada Lote:243165 3B2 Vence:30/08/ 2010 T°: 4.3 °C	N°:7 UHT Lote: 14:23 E Vence:4/01/2 011 T°: 4.3 °C	N°:8 UHT Lote:16E14:33 Vence:27/03/2 011 T°: 4.3 °C

Tabla N° 6. Continuación

Supermercado Marca		A	B	C	D
Despensa de Don Juan	Fresa	N°:17 Pasteurizada Lote:80JV16 AHAT2 Vence:28/08/ 2010 T°: 4.2 °C	N°:18 Pasteurizada Lote: 243043 0BI Vence:14/09/ 2010 T°: 4.2 °C	N°:19 UHT Lote:02:28E Vence:25/01/ 2011 T°: 4.2 °C	N°:20 UHT Lote:L01F10:1 5 Vence:01/04/2 011 T°: 4.2 °C
Europa	Chocolate	N°:9 Pasteurizada Lote:800M17 JALP2 Vence:3008/ 2010 T°: 4.7 °C	N°:10 Pasteurizada Lote:229202 22A Vence:28/08/ 2010 T°: 4.7 °C	N°:11 UHT Lote: 14:23 E Vence:14/01/ 2011 T°: 4.7 °C	N°:12 UHT Lote:16E14:33 Vence:27/03/2 011 T°: 4.7 °C
	Fresa	N°:21 Pasteurizada Lote:80JV16 AHAT2 Vence:28/08/ 2010 T°: 4.6 °C	N°:22 Pasteurizada Lote: 24304 30BI Vence:14/09/ 2010 T°: 4.6 °C	N°:23 UHT Lote:21:01F Vence:01/02/ 2011 I T°: 4.6 °C	N°:24 UHT Lote:L01F10:1 5 Vence:01/04/2 011 T°: 4.6 °C

En los 3 supermercados muestreados se encontraron las cuatro marcas de leches saborizadas. Se pudo observar que las 24 muestras poseían números de lotes diferentes, con sus respectivas fechas de vencimiento, por lo que cumplen con la norma de etiquetado.

Tabla N°7. Resultados obtenidos durante la inspección del almacenamiento de las leches saborizadas (Chocolate), en las salas de venta de los supermercados muestreados.

Item/Supermercado	SuperSelectos	Despensa de Don Juan	Europa
1. ¿Se encuentran los freezers limpios?	SI	SI	SI
2. ¿Presentan los freezers corrosión?	NO	NO	NO
3. ¿Se encuentran los recipientes perfectamente limpios e higienizados?	SI	SI	SI
4. ¿Están los recipientes perfectamente cerrados?	SI	SI	SI
5. ¿Están los productos con fecha de vencimiento apta para el consumo humano?	SI	SI	SI
6. ¿Cumple con la temperatura de almacenamiento (4.4°C)?	4.1	4.3	4.7

Tabla N° 8. Resultados obtenidos durante la inspección del almacenamiento de las leches saborizadas (Fresa), en las salas de venta de los supermercados muestreados.

Item/Supermercado	SuperSelectos	Despensa de Don Juan	Europa
1. ¿Se encuentran los freezers limpios?	SI	SI	SI
2. ¿Presentan los freezers corrosión?	NO	NO	NO
3. ¿Se encuentran los recipientes perfectamente limpios e higienizados?	SI	SI	SI
4. ¿Están los recipientes perfectamente cerrados?	SI	SI	SI

Tabla N° 8. Continuación.

Item/Supermercado	SuperSelectos	Despensa de Don Juan	Europa
5. ¿Están los productos con fecha de vencimiento apta para el consumo humano?	SI	SI	SI
6. ¿Cumple con la temperatura de almacenamiento (4.4°C)?	4.2	4.2	4.6

Las tablas N° 5 y 6 muestran los resultados de la lista de chequeo durante el muestreo de las leches saborizadas (chocolate, fresa) en los supermercados, siendo estos los siguientes: los freezers estaban limpios y libres de corrosión así como los recipientes se encontraban perfectamente limpios e higienizados; con fechas de vencimiento aptas para el consumo humano y temperaturas de almacenamiento normales (4.4 °C); a excepción del Supermercado Europa Bernal que presentó una temperatura de almacenamiento de 4.7 y 4.6 las cuales son levemente mayor a lo requerido (Ver formato de lista de chequeo en anexo N°3).

Para la realización del análisis se le asignó una letra a cada marca de leche saborizada y un número a cada muestra de cada marca y sabor con el objeto de facilitar la identificación y el registro de datos los cuales se mantuvieron en todo el análisis. (Ver anexo N°2 y tabla N°4).

Tabla N°9. Resultados de los parámetros microbiológicos realizados a las marcas de leches saborizadas (chocolate, fresa).

MARCA/DETERMINACION	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella spp</i>
MARCA "A"	< 3 NMP/mL	< 10 UFC/mL	Ausencia
MARCA "B"	< 3 NMP/mL	< 10 UFC/mL	Ausencia
MARCA "C"	< 3 NMP/mL	< 10 UFC/mL	Ausencia
MARCA "D"	< 3 NMP/mL	< 10 UFC/mL	Ausencia

Resultados obtenidos para la determinación de *Salmonella spp* en 25 ml de la marca "A".

Los resultados obtenidos en la determinación de *Salmonella spp*, en las marcas de leches saborizadas (chocolate, fresa), son los siguientes: en las muestras de la marca "A" no se observó crecimiento de colonias con características típicas de *Salmonella spp*, en el medio *Salmonella-Shigella* inoculado.

Resultados similares se obtuvieron en todas las muestras de la marca "B", "C" y "D", en donde en el agar *Salmonella - Shigella* hubo ausencia de crecimiento.

Resultados obtenidos para la determinación de coliformes totales de la Marca "A".

Los resultados obtenidos en las pruebas presuntivas para la determinación de coliformes totales en las marcas de leches saborizadas analizadas; se describen a continuación:

No se observó cambio de color amarillo tenue a azul verdoso en los tres tubos con caldo LMX de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} de todas las muestras analizadas de la marca "A"; por lo tanto no fue necesario realizar las pruebas confirmativas para *Escherichia coli*.

Resultados similares se obtuvieron en todas las muestras de las marcas "B", "C" y "D", en donde no se observó cambio de color amarillo tenue a azul verdoso en ningún tubo con caldo Rapidcult de las respectivas diluciones.

Resultados obtenidos para la Determinación de *Staphylococcus aureus* de la marca "A".

Los resultados obtenidos en las determinaciones de *Staphylococcus aureus* en de la marca "A" no presentaron crecimiento alguno de colonias típicas *Staphylococcus aureus*, en placas con agar Baird Parker; por lo que se reporta como <10 UFC/mL y por consiguiente no se realizaron las pruebas auxiliares confirmativas de catalasa y coagulasa.

Resultados similares se obtuvieron en todas las muestras de la marca "B", "C" y "D", en donde no se observó crecimiento alguno de colonias en las placas con agar Baird Parker

Comparación de Resultados.

Tabla N°10. Porcentajes de marcas de leches saborizadas que cumplen con el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08

MARCA DE LECHE S SABORIZADAS.	PORCENTAJE
Marcas que cumplen	100%
Marcas que no cumplen	0%

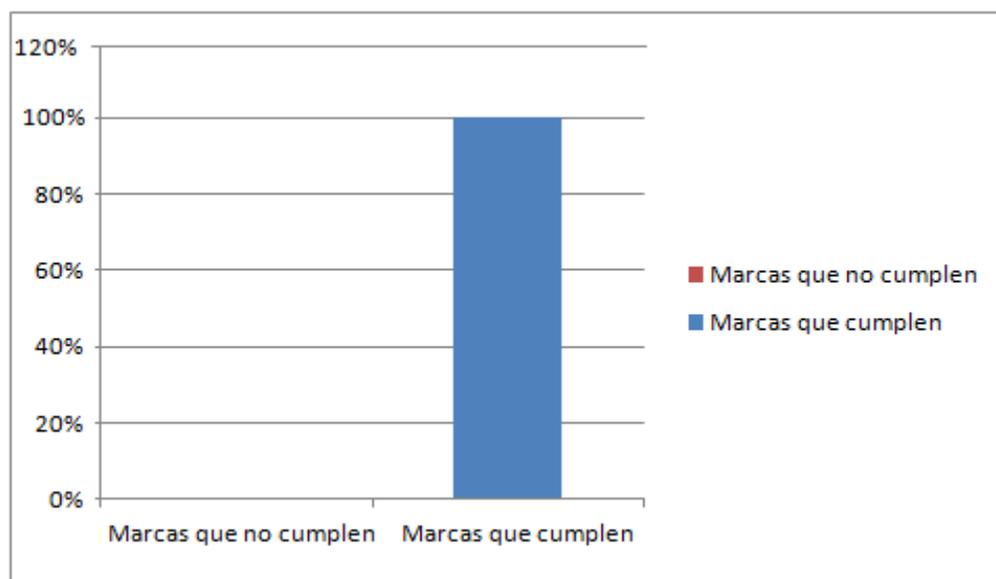


Figura N°1. Gráfico de las marcas de leches saborizadas que cumplen con la especificación según indica el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.

La Tabla N°10 y figura N°1 presentan los resultados de las marcas de leche saborizada en donde todos los resultados indican que las marcas de leches saborizadas están aptas para el consumo humano, ya que cumplen con los requerimientos microbiológicos para: ***Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp*** encontrándose completamente ausente de estos microorganismos patógenos, cumpliendo con las especificaciones del Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08. **(Ver anexo N°4)**

Posteriormente se entregaron estos resultados al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). **(Ver anexo N°12)**

CAPITULIO VI

CONCLUSIONES

6.0. CONCLUSIONES

1. Se verificaron las condiciones de almacenamiento de las leches saborizadas de acuerdo a la norma salvadoreña NSO 67.01.15:07, cumpliendo con ésta los Supermercados Selectos y Despensa de Don Juan, no así el Supermercado Europa en el cual hubo una lectura de temperatura fuera de lo especificado en dicha norma.
2. En la determinación de ***Salmonella spp*** todas las leches saborizadas de las marcas A, B, C y D están ausentes de este microorganismo patógeno por lo que se encuentran dentro de la especificación por el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.
3. En el análisis de ***Escherichia coli*** se obtuvieron resultados negativos ya que en la determinación de coliformes totales en todas las muestras analizadas de leches saborizadas mostraron resultados de <3 NMP con lo cual cumplen con la especificación del Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.
4. De acuerdo a los resultados obtenidos en los recuentos de ***Staphylococcus aureus*** el 100% de las muestras de leches saborizadas de las marcas A, B, C y D presentaron un valor de <10 UFC/mL cumpliendo con la especificación según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.

5. Por los resultados obtenidos en general para cada una de las muestras de leches saborizadas de las diferentes marcas analizadas, todas se consideran aptas para el consumo humano porque cumplen con todas las especificaciones establecidas por el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.
6. En la determinación de ***Salmonella spp, Escherichia coli, Staphylococcus aureus***, en las leches saborizadas; reflejan que estos productos lácteos se encuentran ausentes de microorganismos patógenos, lo que garantiza que los procesos de tratamiento térmico de pasteurización y Ultrapasteurización se han empleado adecuadamente durante el proceso de preparación, evitando una alteración microbiológica en la calidad de estos productos.
7. Los resultados microbiológicos de las leches saborizadas durante esta investigación demuestran la inocuidad microbiológica, lo que favorece a la población que las consume especialmente los niños, ancianos y personas inmunodeficientes; favoreciendo la economía y la salud familiar.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

1. Que el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social realice continuamente monitoreos para verificar las condiciones de almacenamiento en los supermercados, especialmente la cadena de frío en los diferentes supermercados con el fin de garantizar la calidad e inocuidad de las leches saborizadas.
2. Realizar en investigaciones futuras monitoreos o ensayos, para determinar si las empresas productoras siguen cumpliendo con todas las especificaciones establecidas por el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.
3. Que el productor, distribuidor y centros de venta de las leches saborizadas informen a los consumidores de los cambios que puede sufrir este tipo de leche por la contaminación microbiológica a través de etiquetas, folletos y panfletos para que los consumidores puedan exigir que este alimento sea de calidad y apto para el consumo humano.
4. Que las autoridades sanitarias estén capacitadas para obtener conciencia sobre la importancia de la inocuidad microbiológica de las leches saborizadas, ya que éstas son consumidas en gran medida por toda la población específicamente los niños, ancianos y personas inmunodeficientes, por ser estos más susceptibles de adquirir enfermedades transmitidas por este alimento.

5. Que futuras investigaciones den seguimiento al presente trabajo, realizando un estudio en los parámetros físico-químicos de las leches saborizadas por marcas; debido a que estos son productos lácteos que su composición es más susceptible a sufrir degradación y afectar la calidad comercial del producto.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Bonilla G. Estadística II. Métodos Prácticos de Inferencia Estadística. 4ª Ed. San Salvador. ES. Ed. UCA Editores. 1997. P. 11
2. Brooks, G.F, Butel J. S, Ornston L. N.. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 16ª Ed. México DF - Santafé Bogotá. Ed. El Manual Moderno. 1999. P. 202, 219-224, 238, 243, 245-249, 251-255.
3. C. Frazier. , C. Westhoff.. Microbiología de los alimentos. 4ª Ed. Zaragoza, España. Editorial Acribia. S.A. 2003. P. 331,373, 385-394, 546, 547, 554, 555, 559-564.
4. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt). Norma Salvadoreña NSO 67.01.15:07. Productos Lácteos. Leche pasteurizada y ultrapasteurizada con sabor. Especificaciones.
5. Helen Charley. Preparación de Alimentos. 1ª Edición. México. Editorial Limusa S.A de C.V. 1998. P. 1998, 380-390, 397-405
6. H. Michael Wehr. Standard Methods for the Examination of Dairy Products 17th Edition. Washington DC. 2004. P. 107-111, 132-134
7. Pineda, E, H. de Canales F. L. de Alvarado E. Metodología de la Investigación Manual para el Desarrollo del Personal de Salud. 1ª Ed. México D.F. Editorial Limusa S.A de C.V. 1986. P.71-77, 86-91
8. Ramírez, K. y otros. 2005. Aplicación del sistema diralec para la Evaluación de la Calidad Microbiológica de la Leche en la Provincia de Sancti Spíritus. VI Congreso de la Sociedad Cubana de Biotecnología. Habana, Cuba.

9. Rivas, K. Roque, S. Tobar, D. 2008. Determinación de la calidad microbiológica del requesón que se comercializan en los principales supermercados de la zona metropolitana de San Salvador. Trabajo de Graduación. Lic. El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. P. 21, 22, 23.
10. Valbuena, E. Castro, G. Lima, K. Acosta, W. Calidad Microbiológica de las Principales Marcas de Leche Pasteurizada Distribuidas en la Ciudad de Maracaibo, Venezuela. Revista Científica, 2004. FCV-LUZ / Vol. XIV, N° 1, 59-67
11. Varnan, A.H. Suther J. P. Leche y Productos Lácteos Tecnología, química y microbiología. 1ª Ed. Zaragoza, España. Ed. Acribia, S.A. 1994 P.39, 56, 97, 98.
12. <http://www.calidadalimentaria.net/quesonlasetas.php>. 2006. Citado el 2 de abril de 2010, Enfermedades Transmitidas por Alimentos ETAs (en línea).
13. <http://www.europa.com.sv/contenido/hiper-europa.htm#>, Consultado el 10 de Abril de 2010. Europa e Hiper Europa Sucursales 2010.
14. <http://www.ladispensa.com.sv/sucursales.asp?sucur=SS#>. Citado el 10 de Abril de 2010. La Despensa de Don Juan Sucursales 2010.
15. <http://turnkey.taiwantrade.com.tw/showpage.asp?subid=038&fdname=FOOD+MANUFACTURING&pagename=Planta+procesadora+de+leche+%28regular+y+saborizada%29>, citado el 15 de Abril de 2010

16. <http://www.sansalvador.gob.sv/?p=758>, Consultado el 17 de Abril de 2010. Sitio Oficial de San Salvador. Distrito Municipal 2. 2010.
17. <http://www.sansalvador.gob.sv/?p=745>. Consultado el 17 de Abril de 2010. Sitio Oficial de San Salvador. Distrito Municipal 3. 2010
18. <http://www.superselectos.com/wfSucursales.aspx?menu=5>. Citado el 10 de Abril de 2010 Super Selectos Sucursales 2010.
19. http://translate.google.com/translate?hl=es&langpair=en|es&u=http://en.wikipedia.org/wiki/Chocolate_milk&rurl=translate.google.com.sv. Consultado el 16 de Marzo de 2010. WIKIPEDIA.2010. Leche con Sabor a Chocolate (en línea). Enciclopedia.
20. **¡Error! Referencia de hipervínculo no válida.** = [en|es&u=http://en.wikipedia.org/wiki/Flavored_milk](http://en.wikipedia.org/wiki/Flavored_milk). WIKIPEDIA.2010. Citado el 16 de Marzo de 2010. Leche con Sabor (en línea). Enciclopedia.
21. <http://es.wikipedia.org/wiki/Leche#Historia>. Consultado el 16 de Marzo de 2010. WIKIPEDIA. 2010 Leche. (en línea). Enciclopedia.
22. http://translate.google.com.sv/translate?hl=es&langpair=en|es&u=http://en.wikipedia.org/wiki/Strawberry_milk. WIKIPEDIA.2010. Consultado el 10 de Marzo de 2010. Leche Sabor a Fresa (en línea). Enciclopedia.
23. <http://es.wikipedia.org/wiki/Ultrapasteurizaci%C3%B3n>. WIKIPEDIA. 2010. Consultado 27 de Marzo de 2010. Ultrapasteurización. (en línea). Enciclopedia.

GLOSARIO

GLOSARIO (2, 3, 11)

Bacterias lácticas: Son necesarios para la transformación de la leche en productos lácteos. Su presencia en la leche cruda no es índice de mala calidad, pero un desarrollo excesivo podría causar alteraciones. El recuento se hace en diferentes medios: Lactobacilos en Agar MRS, Streptococos lácteos en los medios Agar M17, o Agar Lee.

Bacterias termodúricas: Bacterias que resisten la pasteurización, pero que generalmente no desarrollan a elevadas temperaturas. Ej. Micrococcus, Streptococcus, Lactobacillus, y esporulados aerobios. Para la determinación se usa el medio PCA, pero previo a la siembra se somete la muestra a un calentamiento en baño maría, a 63°C durante 30 minutos por 10 días.

Clostridium: Es un género de bacterias anaerobias, bacilos grampositivas, parásitas y saprófitas algunas de ellas, que esporulan, y son móviles, en general por intermedio de flagelos peritricos. Toman la forma de fósforo, palillo de tambor o huso de hilar, de ahí su nombre griego "Klostro", que significa huso de hilar.

Enterobacteriaceae: Es una familia de bacterias Gram negativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de bacilos o cocos. Forman parte de la microbiota del intestino (llamados coliformes) y de otros órganos del ser humano y de otras especies animales. Algunas especies pueden vivir en tierra, en plantas o en animales acuáticos. Sucumben con relativa facilidad a desinfectantes comunes, incluido el cloro. Con frecuencia se encuentran especies de

Enterobacteriaceae en la bioindustria: para la fermentación de quesos y productos lácteos, alcoholes, tratamientos médicos, producción de toxinas en el uso de cosméticos, fabricación de agentes antivirales de la industria farmacéutica.

Estafilococos coagulasa positivo: La principal fuente de contaminación de la leche, además de la presencia de mastitis, proviene de los manipuladores (piel, fosas nasales, boca). Algunas cepas de ***Staphylococcus aureus*** producen enterotoxinas termoestables (no se destruyen con la pasteurización, ni la esterilización de la leche).

Microorganismos psicrótrofos: Bacteria que tiene una temperatura óptima de más de 20°C, pero pueden desarrollarse a menos de 7°C en refrigeración): evalúa la calidad de leche refrigerada. Se utiliza el medio PCA, se incuba a 7°.

Flora banal: Es la flora presente en todo alimento natural (no procesado) y que no presenta ningún riesgo para la salud del hombre. En la leche se le denomina “flora láctica”, y es la carga bacteriana normal presente en la leche cruda una vez ordeñada.

ANEXOS

ANEXO N°1

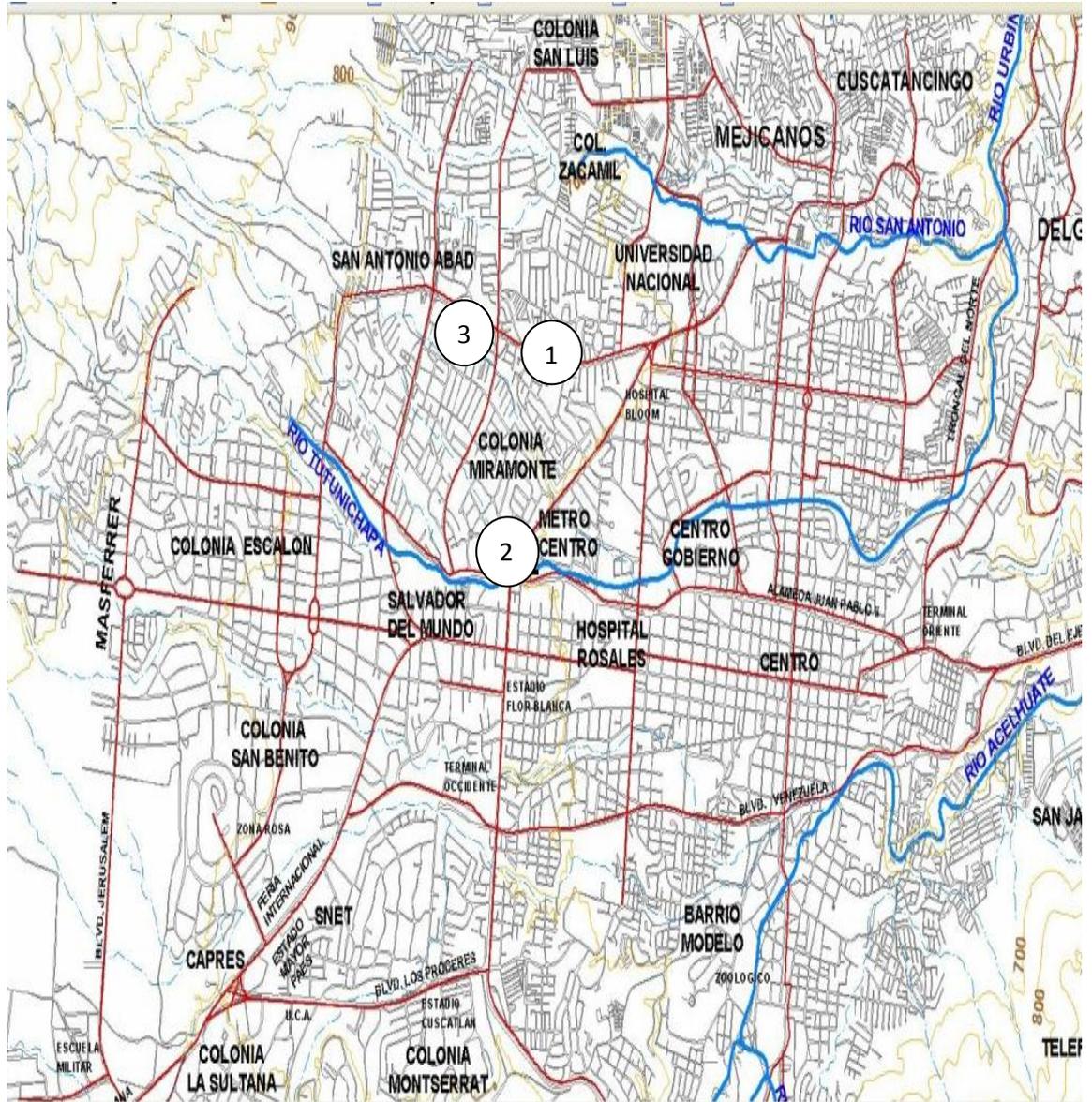


Fig. N°2. Mapa de La Zona Metropolitana de San Salvador

- 1- Súper Selectos San Luis
- 2- Despensa de Don Juan Metrocentro
- 3- Europa Bernal

ANEXO N° 2

Cuadro N° 1: Leches Saborizadas Comercializadas en los principales Supermercados del Área Metropolitana de San Salvador

Supermercado	Marca	Sabores
Despensa de Don Juan	Foremost (Marca A)	Chocolate, Fresa
	La Salud (Marca B)	Chocolate, Fresa, Avena y Canela.
	Dos Pinos (Marca C)	Chocolate, Fresa, Vainilla.
	Shaka Laka (Marca D)	Chocolate, Fresa, Vainilla.
Súper Selectos	Foremost (Marca A)	Chocolate, Fresa
	La Salud (Marca B)	Chocolate, Fresa, Avena y Canela.
	Dos Pinos (Marca C)	Chocolate, Fresa, Vainilla.
	Shaka Laka (Marca D)	Chocolate, Fresa, Vainilla.
Europa	Foremost (Marca A)	Chocolate, Fresa
	La Salud (Marca B)	Chocolate, Fresa, Avena y Canela.
	Dos Pinos (Marca C)	Chocolate, Fresa, Vainilla.
	Shaka Laka (Marca D)	Chocolate, Fresa, Vainilla.



ANEXO N°3
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



Lista de Chequeo para Productos Lácteos

OBJETIVO: Identificar las condiciones en las que se encuentran las leches saborizadas en los distintos supermercados del Distrito Dos de La Zona Metropolitana de San Salvador.

UBICACION: _____ **SUPERMERCADO:** _____

		LISTA DE CHEQUEO PARA INSPECCIONAR ZONAS DE ALMACENAMIENTO DE LECHE SABORIZADAS		Fecha: .../.../.....	
Lugar:					
ITEMS		SI	NO	OBSERVACIONES	
1 ¿Se encuentran los freezers limpios?					
2 ¿Presentan los freezers corrosión?					
3 ¿Se encuentran los recipientes perfectamente limpios e higienizados?					
4 ¿Están los recipientes perfectamente cerrados?					
5 ¿Están los productos con fecha de vencimiento apta para el consumo humano?					
6 ¿Cumple con la temperatura de almacenamiento (4.4 °C)?					

ANEXO N°4

CUADRO N° 2. Requisitos Microbiológicos según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 para leches saborizadas.

Parámetro	Límite
<i>Escherichia coli</i>	< 3 NMP/ml
<i>Listeria monocytogenes</i> /25mL	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ² UFC/ml
<i>Salmonella spp</i> /25mL	Ausencia

ANEXO N°5

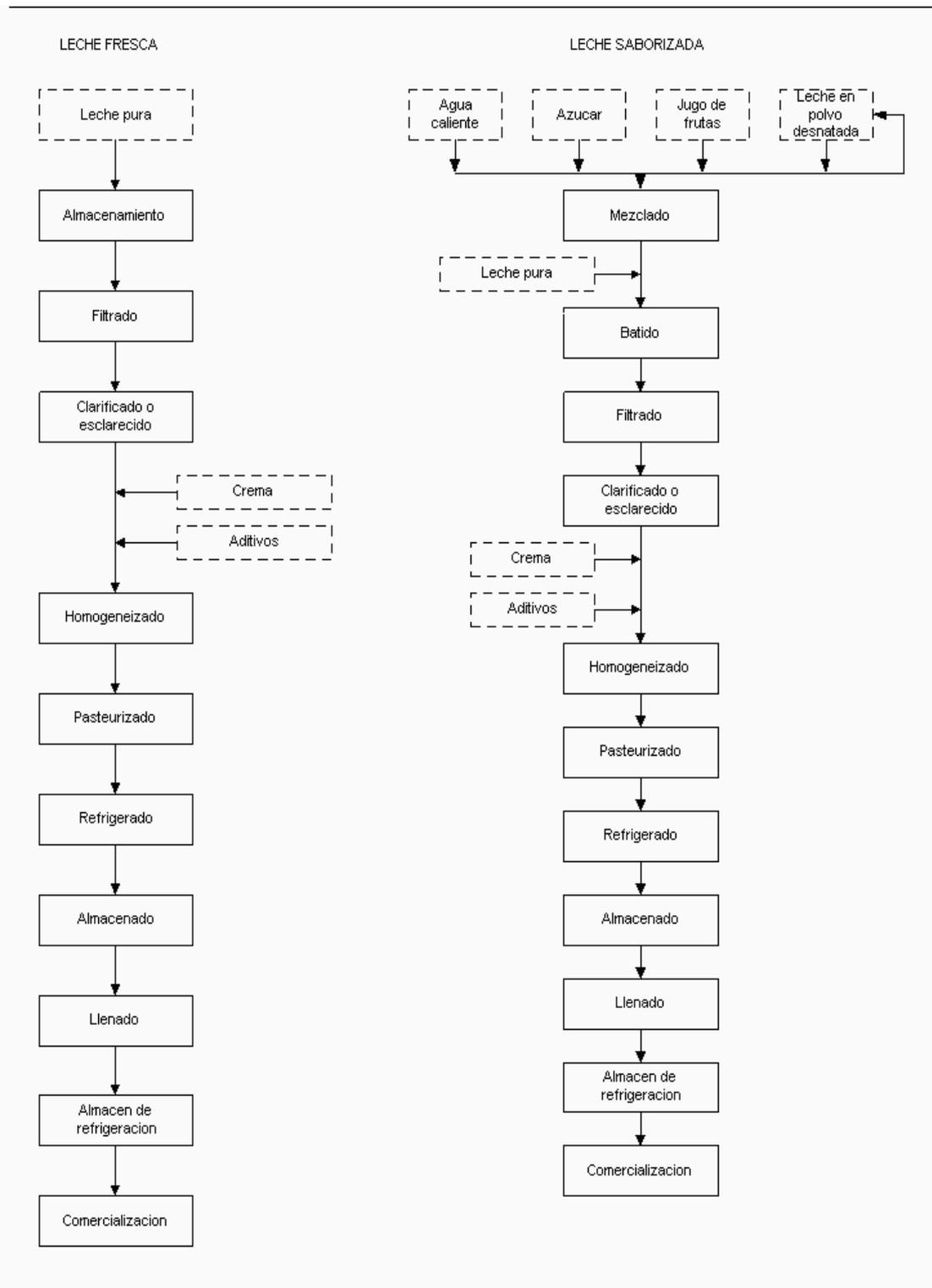


Figura N° 3. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la leche fresca y saborizada.

ANEXO N°6

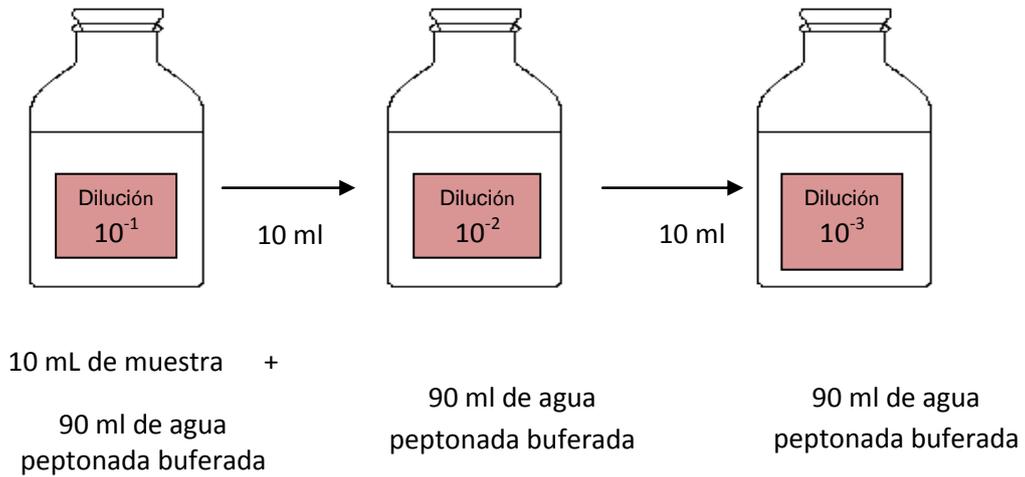


Figura N° 4. Preparación de diluciones.

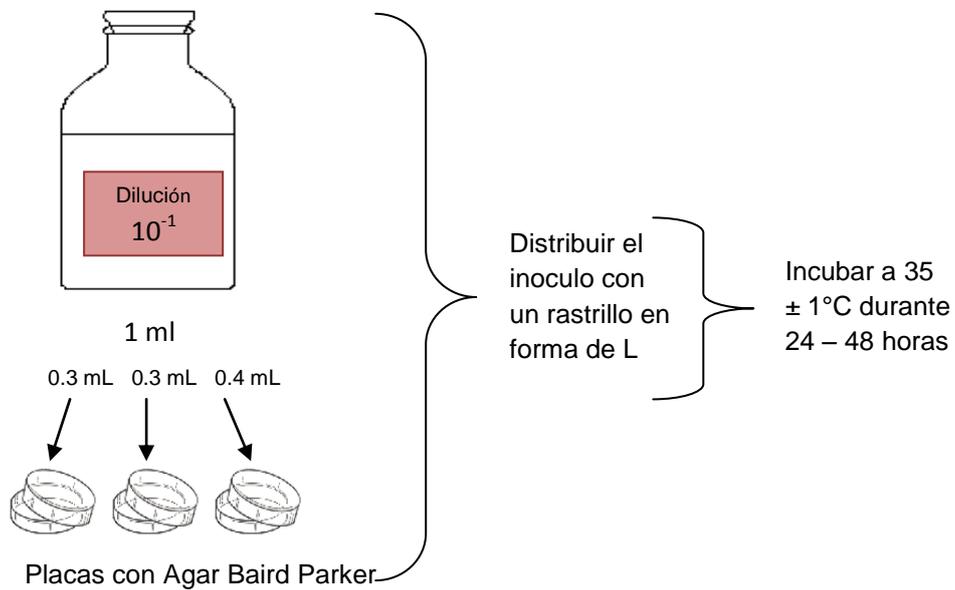


Figura N° 5. Recuento y aislamiento de *Staphylococcus aureus*

ANEXO N°7

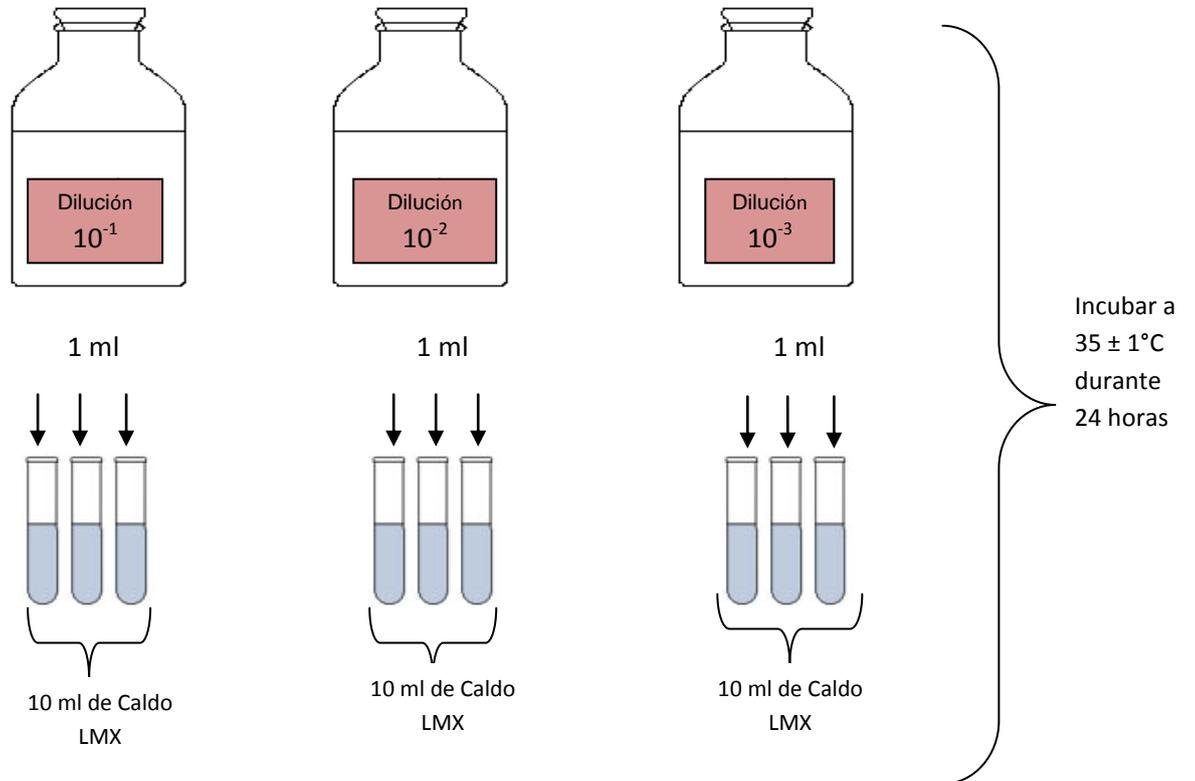


Figura N° 6. Prueba presuntiva para coliformes totales.

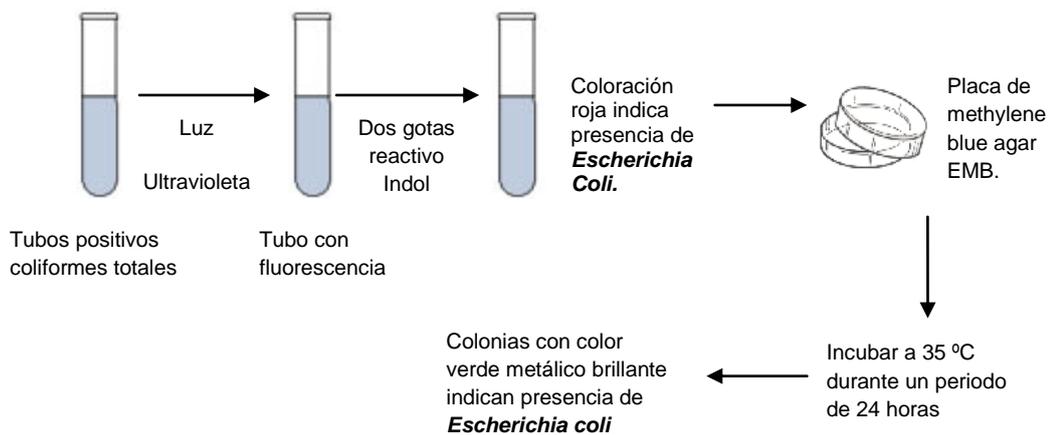


Figura N° 7. Determinación de *Escherichia coli*

ANEXO Nº8

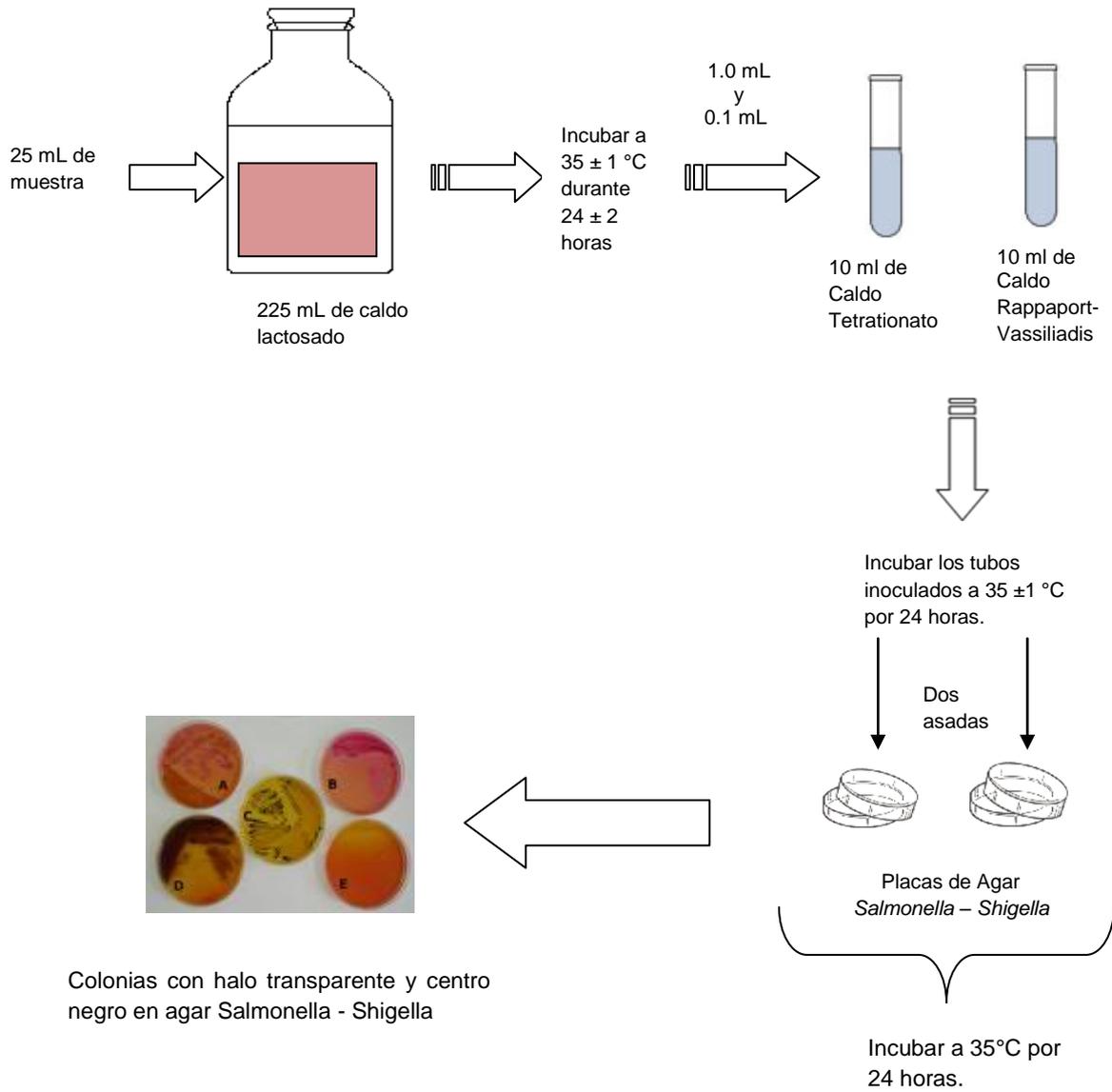


Figura Nº 8. Determinación de *Salmonella* spp.

ANEXO N°9

Material y Equipo

Cristalería

- Campanas de Durham
- Tubos con tapón de rosca
- Placas de petri
- Pipetas volumétricas de 1.0 mL
- Pipetas volumétricas de 10.0 mL
- Tubos pequeños con rosca
- Frascos de dilución
- Gradillas para tubos
- Asas de platino con punta
- Asas de platino en aro

Equipo

- Incubadora
- Estufa
- Autoclave
- Campana de flujo laminar
- Pipeteadores
- Balanza semianalítica
- Agitador de alimentos tipo
Stomacher
- Esterilizador de asas
- Hielera
- Mechero

ANEXO N°10

Medios de Cultivo y Reactivos

Medios de cultivo	Reactivos
- Caldo lactosado	- Plasma normal humano
- Caldo Rappaport Vassiliadis	- Peróxido de hidrogeno 3%
- Caldo tetrionato	- Éter
- Agar Salmonella-Shigella	- Reactivo de Kovacs
- Agua peptonada buferada	- Alfa-naftol
- Agar Baird Parker	- Hidróxido de potasio 40%
- Caldo rapidcult	- Solución indicadora de rojo
- Caldo triptófano	de metilo
- Caldo rojo de metilo Voges Proskauer	
- Agar citrato	
- Agar triple azúcar hierro	
- Agar SIM	
- Caldo infusión cerebro corazón (BHI)	
- Agar eosina y azul de metileno (EMB)	

Anexo N°11

Fotografías tomadas durante el desarrollo de la investigación.



Figura N°9. Toma de muestras de leches saborizadas (chocolate) en los principales supermercados seleccionados a ser muestreados.



Figura N° 10. Toma de muestras de leches saborizadas (fresa) en los supermercados seleccionados a muestrear.



Figura N° 11. Termómetro digital utilizado para la toma de temperatura de almacenamiento registradas durante el muestreo de leches saborizadas.



Figura N° 12. Esterilización del área de trabajo antes y después de cada rutina diaria.



Figura N° 13. Pre-tratamiento de la muestra en forma aséptica, usando un algodón impregnado de alcohol etílico y frotando el empaque original de la misma con movimientos circulares.



Figura N° 14. Inoculación de los respectivos análisis en el are de trabajo del laboratorio utilizando la indumentaria necesaria y las medidas de higiene requeridas para obtener resultados confiables.

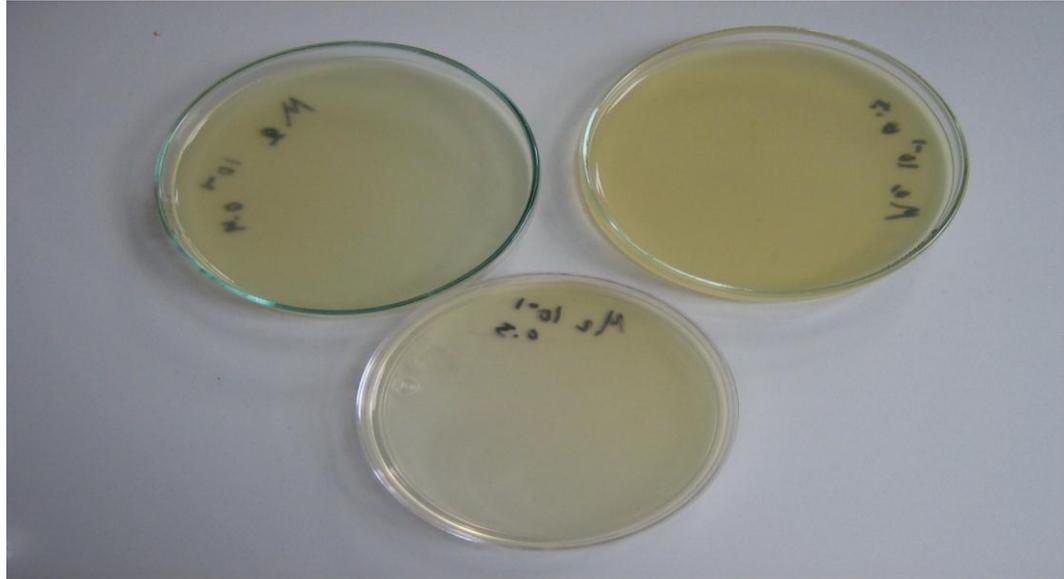


Figura N°15. Placas de Agar Baird Paker inoculadas con muestras de las leches saborizadas (chocolate, fresa) a analizar, en las que se observa la ausencia total de crecimiento de colonias típicas de *Staphylococcus aureus* (color negro azabache) en el medio.

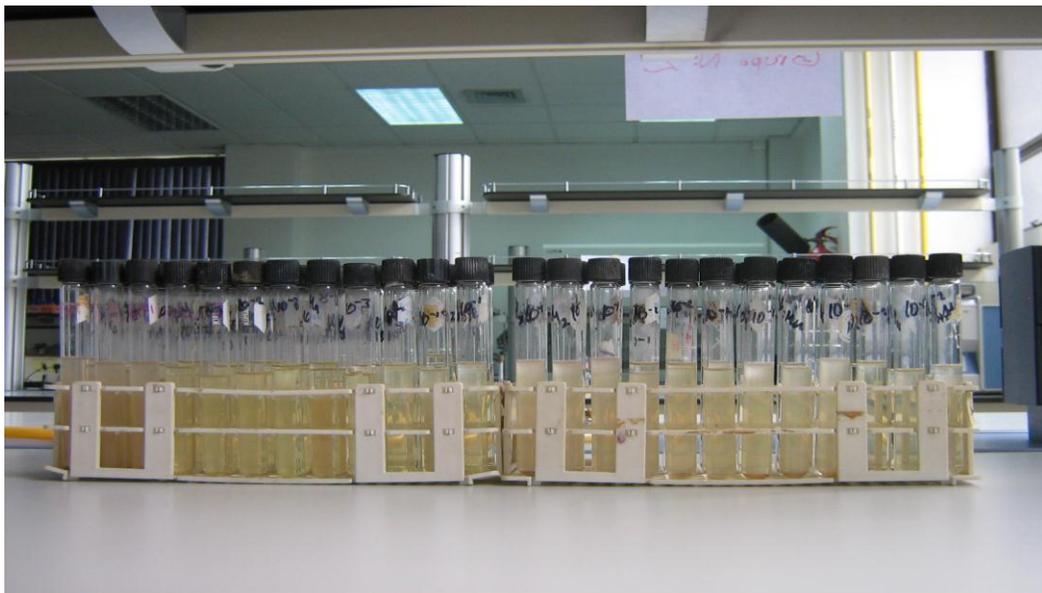


Figura N° 16. Tubos sin cambio de color en el medio rapidcult (amarillo) de todas las muestras analizadas de leche saborizadas (chocolate, fresa) en la prueba presuntiva para Coliformes totales.

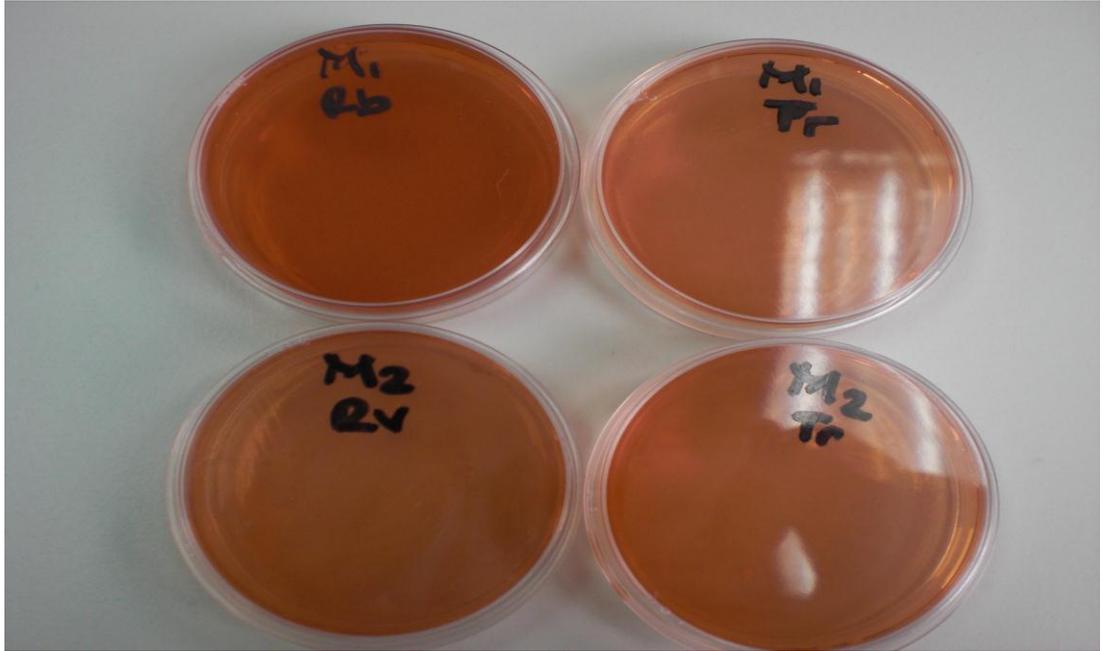


Figura N° 17. Placas de Agar salmonella-shigella, en las cuales se observa la ausencia de colonias con morfología típica de ***Salmonella spp.***

Anexo N°12

Carta dirigida al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)



FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR



San Salvador, 16 de mayo de 2011.

Ingeniero
Carlos Roberto Ochoa Córdova.
Director Ejecutivo
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)
Presente.

capto. Normalización
22348400
CONACYT
RHINA DE RODAS
Fecha 16/5/2011

Reciba un cordial saludo deseándole éxitos en su labor diaria.
El motivo de la presente es para dar a conocer a usted los resultados del análisis microbiológico realizado a 24 muestras de leches saborizadas provenientes de las diferentes cadenas de supermercados del distrito dos, ya que estamos realizando nuestro trabajo de graduación que lleva por título: "EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LECHE SAVORIZADAS COMERCIALIZADAS EN LOS PRINCIPALES SUPERMERCADOS DEL DISTRITO DOS DE LA ZONA METROPOLITANA DE SAN SALVADOR", planteando como uno de nuestros objetivos dar a conocer a las entidades correspondientes, en este caso (CONACYT), los resultados obtenidos en esta investigación.

Cabe mencionar que anexo a los resultados se le incluyen las especificaciones de El Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50.08., el cual se ha tomado como parámetro para comparar los resultados del estudio.

Agradeciendo de antemano su atención, en espera de una respuesta favorable a nuestra petición.

Atentamente,

Saúl Gustavo Barrera Orellana.

F.

Fredy Antonio Velásquez Velásquez.

F.

Estudiantes Egresados de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

Msc. Coralia de los Ángeles Gonzáles de Díaz F.

Docente Directora



Resultados de Evaluación de la Calidad Microbiológica de Leches Saborizadas Comercializadas en los Principales Supermercados Del Distrito Dos de la Zona Metropolitana de San Salvador.

MARCA/DETERMINACION	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella spp</i>
MARCA "A" (Foremost)	< 3 NMP/ml	< 10 UFC/mL	Ausencia
MARCA "B" (La Salud)	< 3 NMP/ml	< 10 UFC/mL	Ausencia
MARCA "C" (Dos Pinos)	< 3 NMP/ml	< 10 UFC/mL	Ausencia
MARCA "D" (Shaka Laka)	< 3 NMP/ml	< 10 UFC/mL	Ausencia

Requisitos Microbiológicos según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 para leches saborizadas.

Parámetro	Límite
<i>Escherichia coli</i>	< 3 NMP/ml
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ² UFC/ml
<i>Salmonella spp</i> /25 g	Ausencia

Los productos lácteos analizados están libres de microorganismos patógenos lo que garantiza la calidad e inocuidad de dichos productos, comercializados en los supermercados del distrito dos de la Zona Metropolitana de San Salvador.