

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL
FACULTAD REGIONAL RESISTENCIA



MAESTRÍA EN INGENIERÍA EN CALIDAD

CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA.
USO DE MODELOS PREDICTIVOS EN LA EVALUACIÓN DE
SANITIZANTES SOBRE *Zygosaccharomyces rouxii* (AISLADO LMFIQ 33)
CONTAMINANTE DE ALIMENTOS

Tesis presentada como requisito para optar al grado de:

Magíster en Ingeniería en Calidad

AUTOR: Bioq. Alejandro Rubén Farías

DIRECTOR: Dr. Juan Carlos Basílico

CO-DIRECTOR: Mg. Ester Elena Aríngoli

Resistencia, septiembre de 2011

*A mis hijas Celina y Bianca
Y a mi esposa Rosina
El esfuerzo siempre vale la pena*

ÍNDICE

Dedicatoria	i
Índice	ii
Agradecimientos	vii
Resumen	viii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras y gráficos	x
Lista de abreviaturas	xi

CAPITULO I: INTRODUCCION

I.1. Generalidades	1
<i>I.1.1 Principios básicos de calidad</i>	1
<i>I.1.2 La prevención como criterio</i>	3
<i>I.1.3 Importancia en la comprensión del lenguaje de la calidad</i>	4
I.2. Gestión de Calidad en industrias de alimentos	6
<i>I.2.1 Historia de la Gestión de Calidad</i>	6
<i>I.2.2 Seguridad alimentaria</i>	9
<i>I.2.3 Buenas Prácticas de Manufatctura</i>	12
<i>I.2.4 Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control</i>	13
<i>I.2.5 Familia de Normas ISO 22000</i>	16
<i>I.2.6 Otras herramientas para la seguridad y calidad alimentaria</i>	18
I.3. Higiene y desinfección en la industria alimenticia	18
<i>I.3.1 Importancia de la higiene y desinfección</i>	18
<i>I.3.2 Dificultades en la aplicación a nivel mundial</i>	20
<i>I.3.3 Productos utilizados para lograr la higiene y desinfección</i>	21

I.4 Productos desinfectantes	22
<i>I.4.1 Generalidades</i>	22
<i>I.4.2 Historia</i>	24
<i>I.4.3 Resistencia vs adaptación</i>	25
<i>I.4.4 Clasificación</i>	26
<i>I.4.5 Compuestos clorados</i>	27
<i>I.4.6 Ácido Peracético</i>	28
I.5. Microbiología de alimentos	29
<i>I.5.1 Contaminación de alimentos por microorganismos</i>	29
<i>I.5.2 Hongos como contaminantes de alimentos</i>	30
<i>I.5.3 Importancia de las levaduras</i>	31
<i>I.5.4 Zygosaccharomyces rouxii como contaminante en la industria alimenticia</i>	35
I.6. Métodos predictivos	37
<i>I.6.1 Desarrollo de la microbiología Predictiva</i>	37
<i>I.6.2 Conceptos de Microbiología Predictiva</i>	39
<i>I.6.3 Clasificación de modelos</i>	42
<i>I.6.4 La microbiología predictiva en los sistemas de calidad y seguridad alimentaria</i>	44
<i>I.6.5 Modelo Terciario DMFit</i>	45
<i>I.6.6 Modelo Terciario GInaFiT</i>	47
<i>I.6.7 Modelos predictivos en levaduras</i>	48
CAPITULO II: OBJETIVOS	
II.1. Objetivo General	50
II.2. Objetivos Específicos	50

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Microorganismo	51
III.2. Condiciones y medios de cultivos para el desarrollo	52
III.3. Determinación de curvas de crecimiento en distintas condiciones de temperatura y pH	52
<i>III.3.1. Activación del aislado</i>	53
<i>III.3.2. Determinación de la pureza</i>	53
<i>III.3.3. Ensayo de crecimiento</i>	53
<i>III.3.3.1 Preparación de la suspensión celular</i>	53
<i>III.3.3.2 Siembra e incubación</i>	54
<i>III.3.3.3 Control de crecimiento por el método de recuento en placa</i>	55
<i>III.3.3.4 Registro de resultados</i>	55
<i>III.3.4. Evaluación de los datos en DMFit</i>	55
<i>III.3.5. Evaluación estadística</i>	58
III.4. Determinación de curvas de muerte frente a distintos principios activos	58
<i>III.4.1 Hipoclorito de sodio</i>	58
<i>III.4.2 Ácido peracético</i>	59
<i>III.4.3 Evaluación de la concentración del sanitizante a ensayar</i>	60

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Determinación de curvas de crecimiento en distintas condiciones	64
<i>IV.1.1 Evaluación estadística</i>	70

<i>IV.1.2: Selección de las condiciones óptimas de crecimiento</i>	72
IV.2. Determinación de curvas de muerte frente a distintos sanitizantes	72
<i>IV.2.1 Screening inicial</i>	72
<i>IV.2.2 Ensayos de inhibición</i>	74
<i>IV.2.3 Curvas de muerte con Ácido peracético</i>	75
<i>IV.2.4 Curvas de muerte con Hipoclorito de sodio</i>	77
<i>IV.2.5 Comparación de las curvas de muerte</i>	78
<i>IV.2.6 Eficiencia de los sanitizantes</i>	79
CAPITULO V: CONCLUSIONES	
V.1 Uso de microbiología predictiva en el crecimiento de <i>Z. rouxii</i>	82
V.2 Evaluación de la inactivación/muerte de <i>Z. rouxii</i> con productos sanitizantes	83
V.3 Importancia de la microbiología predictiva en los sistemas de calidad	84
BIBLIOGRAFÍA	86
ANEXOS	
A. Gráficas de crecimiento de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (AISLADO LMFIQ 33) en función de la temperatura y el pH	103
B. Resumen de ANOVA obtenidos a partir de la evaluación de parámetros de las curvas de crecimiento	106
C. Promedio de los recuentos obtenidos en los ensayos de inhibición	112
D. Evaluación de los parámetros obtenidos con las distintas curvas en el Soft GInaFiT	114
E. Eficiencias obtenidas en cada ensayo para el ácido peracético a las distintas concentraciones ensayadas	118

F. Eficiencias obtenidas en cada ensayo para el hipoclorito de sodio a las distintas concentraciones ensayadas	120
G. Curvas de muerte para cada concentración con GInaFiT	122

Agradecimientos

A mi Director de Tesis, Dr. Juan Carlos Basílico, y a mi Codirectora de Tesis, Mgtr. Ester Elena Aríngoli, por la confianza y el apoyo recibidos.

Al Ing. Enrique Utgés por sus permanentes consejos.

A la Ing. Natalia Castillo por su colaboración desinteresada.

Al GISTAQ, y en él a todos sus integrantes del grupo, extendiendo el agradecimiento a la Facultad Regional Resistencia y sus autoridades, que me recibieron hace doce años y me permitieron y permiten desarrollarme como docente, investigador y persona.

Por último a mi familia, especialmente a mis padres, que me brindaron permanente contención y aliento y a mi esposa Rosina, ya que su apoyo y esfuerzo diario apuntalan todas las actividades de mi vida.

Resumen

Existe una búsqueda permanente tanto en gobiernos como en industrias alimenticias de la seguridad, inocuidad y calidad en los alimentos. Los sistemas de aseguramiento de la calidad han sido y seguirán siendo fundamentales para lograr las mismas. Sistemas como BPM, HACCP e ISO 22000 son algunos de los más importantes. Dentro de este contexto la higiene y sanitización cumplen funciones claves para el logro de la inocuidad.

Las levaduras son microorganismos ubicuos y con amplio rango de crecimiento en distintas condiciones. *Z. rouxii* es una levadura osmotolerante que contamina muchos alimentos. La microbiología predictiva puede colaborar en la detección temprana de contaminaciones y/o evitar que ocurran.

A fin de evaluar el crecimiento de *Z. rouxii* (aislado FIQ33) en distintas condiciones, se determinó la curva de crecimiento a distintos pH y temperaturas, procesando los datos con el Soft (DMFiT), comprobando que las condiciones óptimas de crecimiento son pH=5 y 28°C. Las curvas con DMFiT demostraron tener buen ajuste.

Se evaluó posteriormente la eficiencia de Ácido peracético e Hipoclorito de sodio a distintas concentraciones y tiempos viendo que ambos son eficientes a concentraciones de 500 ppm para tiempos de contacto de 1 minuto. Las curvas de muerte se procesaron con GInaFit, demostrando que el soft brinda buena información (D y 4D) y tiene buen ajuste.

Los métodos predictivos pueden ayudar en la aplicación de sistemas de calidad alimentaria, tanto para la evaluación del posible crecimiento/contaminación como en la muerte para lograr un buen criterio de uso de sanitizantes.

Lista de tablas

Tabla 1: Especies de levaduras más significativas y comúnmente descritas como alterantes de alimentos	33
Tabla 2: Alimentos específicos y levaduras alterantes asociadas	34
Tabla 3: Parámetros de crecimiento y validación de las curvas realizadas con DMFit a diferentes temperaturas y pH	68
Tabla 4: Parámetros (μ), (lag) e ($y_{m\acute{a}x.}$). Temperatura en función del pH. Medias y diferencias grupales obtenidas en el análisis con STATGRAPHICS Centurión XV.	71
Tabla 5: Parámetros (μ), (lag) e ($y_{m\acute{a}x.}$). pH en función de la Temperatura. Medias y diferencias grupales obtenidas en el análisis con STATGRAPHICS Centurión XV.	71
Tabla 6: Resultados del screening crece/no crece para los distintos tratamientos.	73
Tabla 7: Parámetros de muerte y del sistema obtenidos a distintas concentraciones de los sanitizantes ensayados.	80
Tabla 8: Eficiencias de ácido peracético e hipoclorito de sodio a las distintas concentraciones y tiempos ensayados.	81

Lista de figuras y gráficos

Figura 1: Características macroscópicas <i>Z. rouxii</i> .	51
Figura 2: Características microscópicas <i>Z. rouxii</i> .	52
Figura 3: Esquema utilizado para evaluar la influencia de los factores pH y temperatura	54
Figura 4: Porcentaje de cloro disponible (%) a diferentes pHs y temperaturas del agua.	59
Figura 5: Inactivación del sanitizante mediante el agregado de ágar MEA tibio.	61
Figura 6: Curva de muerte obtenida a partir del uso del soft GInaFit.	62
Figura 7: Curvas de crecimiento de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (AISLADO LMFIQ 33) en función de la Temperatura y el pH, procesadas con DMFit.	66
Gráfico 1: Curvas de crecimiento corrida con DMFit	68
Gráfico 2: Curvas de muerte con Ácido peracético en concentraciones 1000 ppm y 200 ppm.	76
Gráfico 3: Curvas de muerte con Ácido peracético en concentraciones 500 ppm y 100 ppm.	77
Gráfico 4: Curvas de muerte con Hipoclorito de sodio en concentraciones 1000 ppm y 500 ppm.	78
Gráfico 5: Curvas de muerte con Hipoclorito de sodio en concentraciones 200 ppm y 100 ppm.	79

Lista de abreviaturas

AEM: Ágar Extracto de Malta

BPA: Buenas Prácticas de Agricultura

BPH: Buenas Prácticas de Higiene

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

CA: Códex Alimentarius

CAA: Código Alimentario Argentino

CEM: Caldo Extracto de Malta

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EPA: Unites States Environmental Protection Agency

FAO: Food Agriculture Organization

FSO: Food Safety Objectives

GC: Garantía de Calidad

HACCP: Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCC: Punto Crítico de Control

PCR: Reacción de la Cadena de la Polimerasa

POES: Procedimientos Operativos Estándar de Saneamiento

PP: Programas de Prerrequisitos

QMRA: Quantitative Microbial Risk Assessment

RMSSE: Root Mean Sum of Squared Errors (Raíz Cuadrada del Error Cuadrático Medio)

TQM: Gestión de Calidad Total

CAPITULO I INTRODUCCIÓN

I.1. Generalidades:

I.1.1 Principios básicos de calidad

Ciertamente la preocupación por la calidad es tan antigua como la humanidad, desde que el hombre es tal, ha desarrollado un interés por hacer bien sus cosas.

La palabra calidad tiene múltiples significados. Según Juran y Gryna 1993, dos son los más importantes:

1. Calidad es el conjunto de características de un producto que satisfacen las necesidades de los clientes y, en consecuencia, hacen satisfactorio el producto.
2. La calidad consiste en no tener deficiencias

En base a estas definiciones, la calidad se desarrolla utilizando tres procesos a los cuales se denomina “Trilogía de Juran”: planificación, control y mejora.

El control de calidad total consiste en hacer lo que se debe hacer como cosa normal. No es un medicamento de acción rápida, sino un remedio natural que actúa lentamente y que mejorará gradualmente la constitución de una empresa si se toma durante un período largo de tiempo. La ausencia de imperfecciones y defectos de un producto es una condición necesaria, pero no suficiente, para que un producto sea “vendible” (Ishikawa 1989). Para el logro de este objetivo es imprescindible la adopción de un sistema de gestión de la calidad, el cual debería ser una decisión estratégica de la organización (Norma Internacional ISO 9001: 2000).

Los principios básicos de la Calidad Total son seis:

1. Calidad es la percibida por el cliente.
2. Todo trabajo es parte de un mismo proceso.
3. Mejora continua.
4. Agregado de valor.
5. La base es la gente.
6. Prevención.

El primer principio nos dice que la satisfacción de los clientes asegura la supervivencia de una empresa en el mercado. El éxito de la misma estará dado por la aceptación, por parte de los clientes, de sus productos y servicios. Si sus esfuerzos no guardan relación con las expectativas del cliente, su producto o servicio no será, para ese cliente, suficientemente bueno y por lo tanto no lo comprará.

El segundo principio se basa en que cada persona dentro de una empresa tiene un proceso a cargo y todos son a la vez proveedores y clientes internos (llamando proveedor interno al que brinda los recursos y cliente interno al que recibe el resultado de su proceso). Todo cliente, interno o externo, tiene derecho a que se satisfagan sus necesidades.

El tercer principio supone el compromiso para cumplir con todos los requisitos de nuestros clientes, siempre desde la primera vez. La Mejora Continua es actitud pero básicamente es acción. Para cumplir con ella debemos abandonar la tendencia a la conformidad, el “así está bastante bien” y adoptar una postura de superación permanente. Uno de los aportes más importantes en la ingeniería en calidad de las últimas décadas fue el realizado por el Ingeniero japonés Genichi Taguchi, quien proponía la obtención de productos robustos a partir de las etapas de definición y diseño, mediante el uso de un núcleo de técnicas de diseño de experimentos (Riba Romeva, 2002). A pesar que varios aspectos estadísticos y metodológicos han sido mejorados e incluso observados por otros autores, la metodología propuesta aún es usada por muchas empresas.

El cuarto principio indica que todo dentro de una organización implica un costo, y la eficiencia operativa exige que cada costo tenga la contrapartida de un valor agregado. Ya en el año 1990 James H. Harrington estimaba que en las empresas manufactureras y de servicios existía entre un 15 % y un 40 % de costos que no agregaban valor (costos de la mala calidad), generalmente debido a componentes del costo que no son visibles, por lo que no son revelados por los sistemas contables, aunque impactan, definitivamente, en los resultados de la empresa. Actualmente esto se sigue manteniendo en gran parte de las mismas.

El quinto principio nos centra en la gente, ya que las personas han sido, son y serán siempre el motor de toda organización, por lo que nos advierte la relación directa entre la gente y el elemento básico en una empresa que es la mano de obra.

El sexto principio se refiere a la prevención. Digamos entonces que para que el producto y/o servicio esté libre de defectos, tal como el cliente espera, pueden ponerse en juego dos criterios: la detección y la prevención. El sistema para asegurar la calidad es la prevención, no la evaluación y posterior detección (Guajardo Garza 2003).

1.1.2 La prevención como criterio

El criterio de prevención parte de la idea de no esperar a que el proceso entregue su producto para detectar si cumple o no con las especificaciones, sino evaluarlo durante su ejecución, en el lugar de trabajo y a través del mismo operador, para advertir las tendencias hacia eventuales desviaciones, de manera de poderlo corregir antes de entregar un mal producto. La prevención también tiene costo para la empresa, no obstante estos son gastos diseñados para que ayuden a que los empleados hagan bien el trabajo todas las veces y hace disminuir los índices de errores internos y externos, pudiendo al mismo tiempo disminuir también los costos de evaluación (Harrington, 1990). Para lograr prevención debe actuarse sobre el sistema o proceso para rediseñarlo de manera que no admita que se cometan incumplimientos. Esto se denomina una política de mejora, las corporaciones exitosas ponen su énfasis en aplicar esfuerzos para eliminar los problemas de la calidad en su origen más que en detectarlos y corregirlos más tarde. Las mismas, cada vez más, asignan recursos fundamentalmente a la prevención de defectos, y la acción correctiva se centra en identificar y eliminar las causas (Juran y Gryna 1993).

Es de importancia el término “**reingeniería de procesos**”, que consiste en considerar cómo se harían las cosas si se comienza desde el principio. El término reingeniería viene del proceso de retirar un producto electrónico y diseñar una versión mejor. Michael Hammer (uno de los fundadores de la Teoría de Reingeniería de Procesos o BPR (“Business Process Reengineering”)) aplicó el término a las

organizaciones. Entonces, aplicada a las organizaciones, la reingeniería de procesos significa que la administración debe empezar con una hoja en blanco, se debe volver a pensar y diseñar los procesos con los que se crea valor y se hace el trabajo, al tiempo que se deshace de las operaciones que quedaron anticuadas (Robbins 2004).

Un proceso se define como un conjunto de tareas, actividades o acciones interrelacionadas entre sí que, a partir de una o varias entradas de información, materiales o de salidas de otros procesos, dan lugar a una o varias salidas también de materiales (productos) o información con un valor añadido.

El criterio de la prevención se enriquece a partir de la consideración del pensamiento estadístico, entendiendo por tal una postura mental que ayuda a comprender la variación en los procesos y la posibilidad -o no- de predecir esa variación.

1.1.3 Importancia en la comprensión del lenguaje de la calidad

El éxito de una organización estará fundado en lograr el cumplimiento de objetivos planeados cada vez más ambiciosos. Para esto intentará disminuir en el tiempo la cantidad e importancia de las no conformidades encontradas y centrarse en la mejora continua del sistema. Dicha mejora depende de:

- la eliminación de las no conformidades existentes
- la prevención de las no conformidades potenciales, y
- el aumento continuo de la capacidad y de la eficacia de la organización.

Es de suma importancia para una empresa que desea aplicar sistemas de gestión de calidad, entender las diferencias existentes entre los términos **corrección**, **acción correctiva** y **acción preventiva**, ya que suelen ser confundidos y/o intercambiados por el personal e incluso por los que llevan adelante el sistema de gestión. La **corrección** es solamente la eliminación de la no conformidad existente, sin investigar ni eliminar sus causas; la **acción correctiva** busca la eliminación de la no conformidad y de sus causas raíz, para evitar que vuelva a ocurrir; mientras que la **acción preventiva** trata de eliminar las causas de las no conformidades potenciales, para evitar que ocurran.

Formalmente, una **acción preventiva** (Norma Internacional ISO 9000: 2008) se define como una acción tomada para eliminar la causa de una no conformidad potencial u otra situación potencial no deseable.

Dentro de los requisitos de la Norma ISO 9001:2000 sobre Acción Preventiva, se detalla que: “Debe establecerse un procedimiento documentado para definir los requisitos para”:

- a) determinar las no conformidades potenciales y sus causas;
- b) evaluar la necesidad de actuar para prevenir la ocurrencia de no conformidades;
- c) determinar e implementar las acciones necesarias;
- d) registrar los resultados de las acciones tomadas; y
- e) revisar las acciones preventivas tomadas.

Uno de los pilares para lograr el mejoramiento continuo es la gestión de los tres niveles de acción frente a un problema, esto refiere a las correcciones, las acciones correctivas y las acciones preventivas.

Una organización normalmente pasa por las tres etapas, es decir en primer lugar está enfocada en hacer correcciones, por lo que los mismos problemas se vuelven a presentar. En un segundo nivel se empieza a hacer un análisis de causas y eliminar la causa raíz de los problemas, por lo que nos estamos enfocando en acciones correctivas. En esta etapa ya se empiezan a usar las herramientas de calidad. La tercera etapa y la que realmente lleva al mejoramiento es prevenir que los problemas pasen, es decir hacer un análisis de riesgo de lo que podría ocurrir en la organización y tener planes para evitar que estos problemas pasen.

El uso de las técnicas de simulación puede considerarse como una herramienta con el fin de planificar la prevención de fallas o errores en los procesos (Norma Internacional ISO 9004: 2000).

En el Control de Calidad Total se practica mucho la prevención de reaparición de problemas en las áreas de control y de garantía de calidad. De esa manera, el control en su sentido amplio no es una simple conservación del *status quo*, sino un tipo de mejora. En épocas de rápidas innovaciones tecnológicas y de cambios

económicos como la actual, el mantener el *status quo* y no realizar mejoras innovadoras significa en realidad ir hacia atrás (Ishikawa 1989).

La garantía de calidad (GC) es el alma del control de calidad y consiste en garantizar que un cliente pueda comprar con confianza un producto o servicio y disfrutar de su uso satisfactorio durante un período de tiempo largo. En relación a GC es necesario considerar la seguridad de los consumidores (la ausencia de riesgo de que un producto ocasione lesiones, enfermedad, muerte, incendio, etc.), y los trastornos ambientales (gases, ruidos, etc.) ocasionados por los productos. Es responsabilidad social de las empresas poner en práctica un programa de GC fiable (Ishikawa 1989).

I.2. Gestión de Calidad en industrias de alimentos

I.2.1 Historia de la Gestión de Calidad

En el decenio de 1940 la ciencia y la tecnología de los alimentos hicieron rápidos progresos. Con la aparición de instrumentos analíticos más sensibles, crecieron también rápidamente los conocimientos sobre la naturaleza de los alimentos, su calidad y los riesgos para la salud. Se intensificó el interés por la microbiología, la química de los alimentos y las disciplinas afines, y los nuevos descubrimientos fueron objeto de amplias reseñas periodísticas. Mientras que anteriormente las preocupaciones de los consumidores solo abarcaban lo «visible» (peso insuficiente del contenido, variaciones en el tamaño, etiquetado engañoso y calidad deficiente), ahora incluían un temor a lo «invisible», es decir los peligros para la salud que no podían percibirse con la vista, el olfato o el gusto, por ejemplo microorganismos, residuos de plaguicidas, contaminantes ambientales y aditivos alimentarios. En 1961 se tomaron las primeras medidas para establecer un Códex Alimentarius para que el tema de la calidad e inocuidad de los alimentos sea objeto de la atención mundial (<http://www.codexalimentarius.net>). En el año 1991 en la Conferencia FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, Sustancias Químicas en los Alimentos y Comercio Alimentario se convino que el proceso de armonización de los reglamentos alimentarios nacionales con las normas y recomendaciones

internacionales representaba una cuestión urgente y era necesario acelerarlo (www.fao.org/docrep/meeting/005/t0490s/T0490S01.htm). A principios de este siglo, en la 53^a Asamblea Mundial de la Salud realizada en el año 2000 se reconoce la importancia de las normas, directrices y otras recomendaciones para proteger la salud de los consumidores y asegurar la aplicación de prácticas comerciales leales e insta a los países a la activa participación.

La actual globalización, surge como consecuencia de la internacionalización cada vez más acentuada de los procesos económicos, conflictos sociales y fenómenos político-culturales. El término globalización es usado en la literatura internacional para referirse a la compleja relación de interdependencia a través de las fronteras de los estados, incluyendo la toma de conciencia y el proceso de expansión de los límites del comportamiento. La interdependencia compleja, que es característica de la globalización da lugar a la aparición de isomorfismo en las estructuras, actitudes y normas, debido a la integración de las actividades políticas, económicas y sociales a través de las fronteras estatales (surgimiento de zonas de libre comercio, mercados financieros internacionales, etc.). La industria alimentaria, como parte estructural y fundamental del sector manufacturero, se ha visto inevitablemente afectada por estos cambios en la actividad económica mundial (Unnevehr y Jensen 1999). Necesariamente, esto lleva a que las empresas gestionen productos o servicios de mayor calidad para ser competitivas, cualquiera sea su rubro o actividad, y que los certifiquen a través de estándares reconocidos y aceptados en los mercados internacionales.

Cuando se refiere a la industria alimenticia, la relevancia de este control de calidad se magnifica, ya que todos los alimentos son susceptibles de contaminación. La importancia de la inocuidad alimentaria radica en ser una herramienta indispensable para la calidad en los alimentos y como instrumento de competitividad.

En el aseguramiento de la inocuidad alimentaria, la industria ha trabajado incansablemente. Desde hace algunos años, el criterio de “detección” de productos no conformes, ha ido perdiendo terreno con respecto al criterio de “prevención”. La explicación es que en la detección, el producto o servicio que no cumple con las

especificaciones se convierte en scrap, rechazo o rezago y es desechado, o bien vuelve a la producción y es reprocesado. En todos los casos la información es posterior al defecto y por lo tanto no evita los costos de un producto mal elaborado. En el caso de los alimentos, los clásicos métodos de recuento microbiano en diferentes momentos de su conservación y la identificación de la microflora para entender el por qué de la contaminación, generalmente son caros y lentos y no conducen a una base de datos estructurada que pueda ser consultada rápidamente (Notermans y col. 1995; Baranyi y Roberts 2004; Loureiro 2000; Renard y col. 2008). Además, uno de los graves inconvenientes es que son laboriosos de realizar, demanda el uso de grandes volúmenes de medios líquidos y sólidos, así como de reactivos. Tanto las autoridades de control como los operadores de cada empresa alimentaria utilizan, en general, estos métodos con el fin de seguimiento de la situación real y análisis de tendencias. La mayoría de las veces, con estos procedimientos, resulta imposible conservar alimentos perecederos en el establecimiento procesador mientras se aguardan los resultados del análisis; por otro lado, el almacenamiento de alimentos estables incrementa el costo financiero del producto; más aún, el análisis microbiológico sólo identifica el defecto pero no controla sus causas (Michanie y Quevedo 1990). Durante las últimas décadas, el interés ha aumentado en el desarrollo de métodos más rápidos. A tales métodos rápidos se los ha denominado "métodos alternativos". Los métodos microbiológicos alternativos pueden ayudar a la industria a encontrar nuevas formas de obtener resultados fiables con más eficiencia para garantizar la seguridad alimentaria. Los métodos de detección rápida disponibles comercialmente como ELISA, PCR y otros, han reducido el tiempo y la labor en el análisis de los productos alimenticios, pero todavía se encuentran en una etapa de crecimiento y aún resultan demasiado costosos. En este momento todavía no es posible identificar inmediatamente las causas y el control de no conformidades y, por tanto, imposible tomar medidas correctivas rápidas, ya que aún estos análisis microbianos requieren de mucho tiempo para proporcionar un resultado (Jasson et al 2010). El desarrollo y uso de estos métodos rápidos para detección de microorganismos, son de gran valor, no obstante

esto no obvia la necesidad de nuevos enfoques para asegurar la inocuidad en alimentos (Jay y col. 2005).

Aún, y a pesar de los esfuerzos que se han realizado, existen muchos casos de enfermedades relacionadas con alimentos y los microorganismos juegan un importante papel. Son necesarias entonces políticas estructuradas y una ciencia proactiva, comenzando por la habilidad para predecir dónde pueden surgir los problemas y estudiar el comportamiento de los microorganismos ante distintas situaciones de estrés ambiental (Havelaar y col. 2010). La información acerca de lo que se está haciendo para identificar, impedir y manejar riesgos en alimentos debe ser comunicada a consumidores; como así también brindar notificaciones constantes en cuanto a programas preventivos, sistemas que se están ejecutando y la variabilidad e incertidumbre científica asociada con las evaluaciones de riesgos (Cope y col. 2010).

1.2.2 Seguridad alimentaria

Según ISO 22000:2007 **inocuidad de alimentos** es un “concepto que implica que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparan y/o consumen de acuerdo con el uso previsto” y el **peligro relacionado con la inocuidad de los alimentos** es un “agente biológico, químico o físico presente en un alimento, o la condición en que éste se halla, que puede ocasionar un efecto adverso para la salud”. Posteriormente en sus notas aclaratorias, dicha norma esclarece y solicita no confundir el término “*peligro*” con “*riesgo*”. El riesgo, en el contexto de la inocuidad de los alimentos, significa una función de probabilidad de que se produzca un efecto adverso para la salud cuando estamos expuestos a un peligro especificado. “En lo que concierne a otras operaciones, aparte de las que implican una manipulación directa de los alimentos, los peligros pertinentes relacionados con la inocuidad son aquellos que pueden transferirse directa e indirectamente a los alimentos debido al uso previsto, y por lo tanto pueden tener el potencial para causar un efecto adverso para la salud humana”.

Considerando los principios generales de la microbiología en alimentos, dados ya a fines de la década de 1970 (Mossel, 1977), se reconocen dos campos de interés: (1) la protección de los consumidores en referencia a los microorganismos contaminantes de alimentos que pueden causar enfermedad y (2) la prevención del deterioro de los alimentos debido a la actividad microbiana. También se mencionaban tres reglas en la microbiología en alimentos:

A Es posible que un alimento contenga un número peligroso de organismos patógenos o de niveles de toxinas microbianas, y aún aparecer como perfectamente saludable para los consumidores.

B Las medidas que son efectivas para prevenir el crecimiento de organismos patógenos no controlará necesariamente el desarrollo de organismos alterantes.

C Cuando se previene el desarrollo de microorganismos alterantes, se produce la inhibición de los patógenos, especialmente cuando el alimento se almacena bien refrigerado.

Pasados ya más de 30 años, la regla A continúa cumpliéndose y podría tener mayor importancia debido al desarrollo de nuevas tecnologías para los alimentos mínimamente procesados con la vida útil más larga. La regla B también sigue manteniendo vigencia, pero la tercera no es aceptada actualmente debido a la aparición de importantes patógenos psicótrofos (McMeekin y Ross 2002).

La aparición de problemas de seguridad alimentaria a nivel internacional en las últimas décadas, ha dado lugar sin duda a una disminución de la confianza pública en la regulación de seguridad y de gestión alimentaria (Marvin y col. 2009, Wentholt y col. 2009). El reconocimiento de este problema ha llevado a los organismos nacionales e internacionales a tratar de aumentar la confianza pública en el proceso de análisis de riesgos y a alentar y promover la incorporación de manera voluntaria de los operadores alimentarios a programas en materia de seguridad alimentaria (Houghton y col. 2008). La evolución reciente de las reglamentaciones europeas de seguridad alimentaria se caracteriza por una mayor participación y responsabilidad de los agentes privados en los controles de inocuidad de los alimentos (Fares y Rouviere 2010).

La industria alimenticia ha avanzado hacia nuevos desafíos, pensando tanto en la generación de nuevos productos que satisfagan la necesidad del mercado así como en la obligación de asegurar la inocuidad y calidad de los mismos. Para lograrlo, se dispone de herramientas claves para la generación de un sistema de gestión que garantice la calidad e inocuidad de sus alimentos, tales como BPM (*Buenas Prácticas de Manufactura*), HACCP (*Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control*) y las normas ISO 22000:2007. Todas ellas ponen énfasis en las acciones preventivas que deben adecuarse y tenerse en cuenta para la obtención de un alimento seguro.

Durante los últimos 10 años diversas instituciones internacionales (Codex Alimentarius, OMS y FAO) han establecido numerosos textos estatutarios para ayudar a los profesionales en alimentos a seleccionar tanto los estándares de seguridad alimentaria como de aseguramiento de la calidad (Gaaloul y col. 2010).

En gran parte del mundo, un número creciente de consumidores y gobiernos están adquiriendo conciencia de las cuestiones relacionadas con la calidad y la inocuidad de los alimentos y están percibiendo la necesidad de adoptar una actitud selectiva respecto de los alimentos que se consumen. Hoy en día, la industria de alimentos ofrece los servicios a consumidores sofisticados, que exigen productos que son mínimamente procesados, que contengan menos aditivos, conservando así excelentes propiedades nutricionales y sensoriales y el mantenimiento de estas características durante un largo periodo (Fitzgerald y col. 2003; Tzortzakis 2008) En esto radica la paradoja del equilibrio entre las aspiraciones de los consumidores y el riesgo de eliminar las barreras tradicionales para el desarrollo microbiano. La hipótesis es que la paradoja de diseñar un alimento mínimamente procesado, pero microbiológicamente seguro, sólo puede ser resuelta por el conocimiento detallado de la ecología y fisiología de los microorganismos en los alimentos (McMeekin y Ross 2002). Actualmente es normal que los consumidores pidan a sus gobiernos que tomen medidas legislativas para asegurar que sólo se vendan alimentos inocuos y de calidad aceptable y que se reduzcan al mínimo los peligros para la salud de origen alimentario. La labor de la Comisión del Codex Alimentarius se ha inspirado en el

principio, actualmente aceptado de manera universal, de que las personas tienen derecho a esperar que los alimentos que comen sean inocuos, de buena calidad y aptos para el consumo (<http://www.codexalimentarius.net>). El Codex Alimentarius es, sin lugar a dudas, el punto de referencia internacional más importante en los asuntos relativos a la calidad de los Alimentos, y se ha convertido en una referencia mundial para los consumidores, los productores y elaboradores de alimentos, los organismos nacionales de control de los alimentos y el comercio alimentario internacional.

La Comisión del Codex Alimentarius fue creada en 1963 por la FAO y la OMS para desarrollar normas alimentarias, reglamentos y otros textos relacionados

El concepto de calidad de los alimentos abarca todos los atributos que influyen en el valor de un producto para el consumidor. Engloba, por lo tanto, atributos negativos, como estado de descomposición, contaminación con suciedad, decoloración y olores desagradables, pero también atributos positivos, como origen, color, aroma, textura y métodos de elaboración de los alimentos (FAO/OMS) (http://www.who.int/foodsafety/publications/capacity/en/Spanish_Guidelines_Food_control.pdf).

Los términos inocuidad de los alimentos y calidad de los alimentos son importantes y ambos son requeridos por los consumidores.

1.2.3. Buenas Prácticas de Manufactura

Las BPM son una herramienta básica para la obtención de productos seguros para el consumo humano. Fueron implementadas por primera vez en el año 1969 en los Estados Unidos y recomendadas luego por el Codex Alimentarius. Se centralizan en la higiene y forma de manipulación y son pre-requisitos del sistema HACCP. Tienen como fin asegurar que los alimentos ingeridos por los consumidores sean salubres, inocuos y de calidad. Además, las características de las BPM también apoyan a la cadena de suministro de alimentos al desarrollar Programas de Prerrequisitos (PP) que permiten a los participantes de la cadena mejorar sus métodos operacionales y por ende su competitividad en los mercados nacionales e

internacionales. El Código Alimentario Argentino (C.A.A.) incluye en el Capítulo N° II la obligación de aplicar las BPM; asimismo la Resolución 80/96 del Reglamento del Mercosur indica la aplicación de las BPM para establecimientos elaboradores de alimentos que comercializan sus productos en dicho mercado (Secilio G. 2005). Su aplicación posee diversas ventajas:

- ✓ Son útiles para el diseño y funcionamiento de los establecimientos, y para el desarrollo de procesos y productos relacionados con la alimentación.
- ✓ Contribuyen al aseguramiento de una producción de alimentos seguros, saludables e inocuos para el consumo humano.
- ✓ Son indispensable para la aplicación del Sistema HACCP (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control), de un programa de Gestión de Calidad Total (TQM) o de un Sistema de Calidad como ISO 9000.
- ✓ Se asocian con el control a través de inspecciones del establecimiento.

Las BPM pueden aplicarse en todo tipo de establecimiento en el que se realice alguna de estas actividades: elaboración, faena, fraccionamiento, almacenamiento, transporte de alimentos elaborados o industrializados.

La aplicación de BPM, se puede realizar en seis etapas. Una de ellas prevé la confección de un plan de limpieza especificando los productos a usar, la periodicidad con la que se realizará y como se supervisará (Publicación de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. 2006).

1.2.4 Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control

La introducción del HACCP, establece un cambio fundamental en la orientación hacia el control preventivo de los riesgos en todas las fases de la producción de alimentos, desechando por consiguiente la inspección y comprobación del producto final. El sistema puede aplicarse en toda la cadena alimentaria, desde el productor primario hasta el consumidor. Fue desarrollado por la compañía Pillsbury, en el año 1959, en respuesta a un requerimiento de seguridad alimentaria impuesto por la NASA para sus alimentos espaciales. Se procuraba diseñar y producir

alimentos para el espacio, los cuales debían estar libres de todo patógeno que pudiese causar alguna enfermedad a la tripulación, ya que los métodos tradicionales no daban la suficiente garantía de producir alimentos seguros (Secilio G. 2005). El sistema HACCP se considera el método de elección para asegurar la inocuidad de los alimentos de la granja a la mesa. Fue desarrollado como un medio eficaz de mantener tanto la calidad como la seguridad en la producción de alimentos. Además, existe un mayor reconocimiento de que los sistemas de calidad combinados con los controles establecidos mediante el sistema HACCP, son las más fiables en el sector de la industria alimentaria en relación con la seguridad alimentaria. Es un sistema que debería conducir a la producción de alimentos microbiológicamente inocuos a través del análisis de los riesgos de las materias primas, los que pudieran aparecer a través del procesamiento de los mismos y aquellos que pueden ocurrir a partir de su consumo. Hace enfoque en los procesos de control y los pasos a seguir dentro de ellos. Establece procedimientos de cómo esos peligros pueden reducirse o eliminarse y requiere documentación para la verificación de esos procesos de control. El sistema se puede aplicar para controlar todas las fases del sistema alimentario, y está diseñado para proporcionar información suficiente para dirigir las medidas correctivas (Unnevehr y Jensen 1999). Debe ser proactivo y tener un enfoque sistemático para el control de los procesos. (Jay y col. 2005). Sus principios han sido incorporados dentro de la legislación en seguridad alimentaria, para la distribución, procesamiento y producción en las industrias alimenticias a nivel nacional e internacional. También ha sido identificada como un componente importante para la estandarización del control de calidad en alimentos. Incluso existen recomendaciones (sobre todo en los países desarrollados), para su aplicación en el ámbito doméstico, donde existe una alta incidencia de enfermedades relacionadas con los alimentos (Ropkins y Beck 2007). Este método ha sido ampliamente adoptado en las grandes compañías. La experiencia práctica y una revisión de la literatura de seguridad alimentaria indican que el éxito en el desarrollo, instalación, seguimiento y la verificación de un sistema de HACCP depende de una mezcla compleja de instrumentos de gestión, organizativos y técnicos. Las barreras que encuentran

especialmente las pequeñas empresas para su implementación se basan en la falta de experiencia y recursos humanos formados (identificado como una de las más importantes barreras para su implementación, ya que estudios indican que el 65,5% de los trabajadores de la industria alimenticia dice no conocer el sistema y el 23,5% menciona que es muy complicado), ausencia de requerimientos legales, falta de presupuesto y de actitud. De todos modos, estas barreras varían de país a país o de un sector a otro. (Egan y col. 2007, Bao et al 2007).

El sistema ha evolucionado, se implementa en cinco etapas preliminares y siete principios. Cada uno de los principios debe estar fundamentado por medio de conocimientos científicos comprobados.

Un aspecto importante del sistema HACCP es la especificación de los criterios dentro de un Punto Crítico de Control (PCC). Una correcta elección de los límites críticos en el mismo debe asegurar que las actividades que se realizan en el PCC están bajo control (Notermans y col. 1995). Los test de almacenamiento, test microbiológicos y modelado matemático predictivo son aptos para “predecir” el crecimiento o la muerte de los microorganismos de interés durante el procesamiento y pos distribución. Este riesgo cuantificable puede ser usado para juzgar la aceptación o no aceptación de un producto. En ausencia de información apropiada de un determinado organismo, es necesario recolectar datos relevantes y desarrollar modelos para determinar el efecto de diversas variables que afectan al crecimiento, supervivencia o muerte de un microorganismo. Estos test son usados en HACCP en la etapa de especificación de los criterios (ej: se pueden valorar las consecuencias microbiológicas del proceso y determinar objetivamente que etapas son críticas para la calidad y seguridad del producto). Sin embargo, existen aún pocos modelos que midan la efectividad del sistema evaluando simultáneamente el rol de los sistemas de control y monitoreo en un PCC. (Doménech y col. 2008).

Tanto HACCP como BPM son las herramientas más usadas en el manejo de riesgos microbiológicos, sin embargo están basadas en riesgos conocidos y no consideran peligros futuros o potenciales (Havelaar y col. 2010).

1.2.5 Familia de Normas ISO 22000

Actualmente, el estándar internacional IRAM-ISO 22000:2007 (Sistemas de gestión de inocuidad de alimentos. Requisitos para cualquier organización de la cadena alimentaria), proporciona un marco de requisitos cuya intención final es conseguir una armonización internacional en las diversas normas existentes. Diseñada con la participación de expertos del sector alimentario, incorpora los principios HACCP y engloba, en un solo documento, los requisitos de las normas principales (Gaaloul y col. 2010). Combina elementos reconocidos (4 elementos claves) y aceptados para asegurar la inocuidad

- ✓ Sistema de gestión (enfoque ISO 9000)
- ✓ Comunicación interactiva a través de la cadena alimentaria, definiendo esta cadena como la secuencia de etapas y operaciones involucradas en la producción, procesamiento, distribución, almacenamiento y manipulación de un alimento y sus ingredientes, desde la producción primaria hasta el consumo.
- ✓ Programas de prerrequisitos. Comprende BPM, BPA, BPH, etc.
- ✓ Principios del HACCP (Requisitos para desarrollar el sistema de acuerdo a los principios HACCP enunciados en el Codex Alimentarius)

Se considera que la armonización de las normas alimentarias contribuye a proteger la salud de los consumidores y, en el mayor grado posible, al comercio internacional (<http://www.codexalimentarius.net>).

La norma IRAM-ISO 22000:2007 está alineada con la IRAM-ISO 9001 (única norma certificable de la familia), con el objeto de aumentar la compatibilidad de las dos normas, y posee un anexo en donde se proporcionan las referencias cruzadas entre ambas. Integra los principios HACCP y los puntos de aplicación desarrollados por la Comisión del Códex Alimentarius y combina el plan HACCP con programas de prerrequisitos. También posee un anexo con referencias cruzadas entre los principios y los puntos de aplicación del HACCP, de la Comisión del Códex Alimentarius y de la ISO 22000. Está particularmente prevista para su aplicación por

organizaciones que buscan un sistema de gestión de la inocuidad de los alimentos más enfocado, coherente e integrado que lo requerido normalmente por la legislación. No se debe ver como un reemplazo de la implementación del sistema tradicional HACCP; sino que para aquellas compañías que buscan un mayor compromiso con respecto a la seguridad de alimentos, el nuevo estándar es una alternativa auditable e internacionalmente reconocida. Se recomienda que toda industria que busque adoptar éste estándar, inicialmente mejore la calidad de BPM y el HACCP como un prerrequisito para el primer paso del programa de certificación (Niels, R. 2008).

Además como se especifica en “Objeto y campo de aplicación”, se incluye a todas aquellas organizaciones directamente involucradas en uno o más pasos de la cadena alimenticia, como productores de piensos, agricultores, ganaderos, productores de materias primas y aditivos para uso alimentario, elaboradores de productos alimenticios, cadenas de distribución, caterings, organizaciones que proporcionan servicios de limpieza, transporte, almacenamiento y distribución de productos alimentarios y otras organizaciones indirectamente involucradas con la cadena alimentaria como proveedores de equipamientos, agentes de limpieza, material de envase y embalaje y productores de cualquier otro material que entre en contacto con los alimentos. Debido a lo mencionado, resulta imprescindible en la industria alimentaria contar con métodos confiables que garanticen la llegada del alimento de forma inocua al consumidor, y los procedimientos de higiene y desinfección son un factor de calidad clave. La elección de los productos de higiene y desinfección adecuados para el logro de este objetivo es fundamental.

Según Arvanitoyannis y Varzakas (2009), la aplicación de la Norma ISO 22000 posee ventajas con respecto al Sistema HACCP debido a la presencia de Prerrequisitos que hace al sistema más flexible y con menor necesidad de introducir muchos Puntos Críticos de Control.

1.2.6 Otras herramientas para la seguridad y calidad alimentaria

Junto con los sistemas HACCP surgieron en los años 90 el QMRA (quantitative microbial risk assessment). QMRA tiene un menor y más corto desarrollo. Las primeras referencias aparecen en 1994 y no se encuentra totalmente desarrollada. No posee métodos acordados universalmente y su eficacia no está totalmente testada.

En los últimos 10 años en Europa se han llevado a cabo grandes inversiones financieras, en tecnología y gestión con el fin de implementar los sistemas de gestión de la seguridad alimentaria (food safety management systems (FSMS)), que se basan en BPM, BPH y principios HACCP. Además, empresas del sector alimentario han desarrollado y validado un sistema de gestión de seguridad alimentaria, basado en siete indicadores y sus correspondientes redes de evaluación. La validación se llevó a cabo sobre la base de un sistema llamado microbiological assessment scheme (MAS). Este sistema es una herramienta para el análisis sistemático de los recuentos microbianos que define la identificación de los puntos críticos de muestreo, la selección de los parámetros microbiológicos, la evaluación de la frecuencia de muestreo, la selección del método de muestreo y el método de análisis, y finalmente el procesamiento e interpretación de resultados. De esta manera evalúan el rendimiento de su sistema de gestión de la seguridad alimentaria de una manera más estructurada y de acuerdo con criterios muy estrictos y específicos, cuentan con una visión más certera de su performance con respecto a la seguridad alimentaria y el riesgo microbiológico, porque los problemas de seguridad alimentaria son detectados de manera más sistemática (Jacxsens y col. 2009, Jacxsens y col. 2010).

I.3 Higiene y desinfección en la industria alimenticia

1.3.1 Importancia de la higiene y desinfección

La prevención en la industria de alimentos se torna clave para asegurar la inocuidad alimentaria. Para cumplir con esta premisa la higiene y desinfección son factores fundamentales y determinantes en la calidad e inocuidad final del producto.

Por lo que respecta a la higiene de los alimentos, el texto fundamental son los “*Principios Generales de Higiene de los Alimentos*” del CA, que en su cuarta revisión del año 2003 introduce la utilización del análisis de peligros y de puntos críticos de control (HACCP) para el sistema de gestión de la inocuidad de los alimentos. Otras normas generales para la higiene de los alimentos, los aditivos alimentarios, los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos, y para los alimentos irradiados son de extrema importancia para proteger la salud de los consumidores y se utilizan ampliamente con ese fin. También comprende códigos de prácticas, la mayoría de los cuales son códigos de prácticas de higiene en los que se ofrece orientación sobre la producción de alimentos inocuos y aptos para el consumo. El *Código Internacional Recomendado de Prácticas – Principios Generales de Higiene de los Alimentos* se aplica a todos los alimentos. Es especialmente importante para la protección de los consumidores, dado que establece una firme base para la inocuidad de los alimentos y sigue la cadena alimentaria desde la producción primaria hasta el consumo final, poniendo de relieve los principales controles de higiene que son necesarios en cada etapa.

En su documento CAC/GL 21-1997: “*Principios para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos a los alimentos*”, el Codex Alimentarius establece los principios para implantar los criterios microbiológicos (define la aceptabilidad de un producto o un lote) en alimentos, recomendando el uso de sistemas HACCP. Dentro de los microorganismos incluidos en los criterios se mencionan a las levaduras y los mohos como importantes en el deterioro de alimentos y también como patógenos.

La Organización Mundial de la Salud dentro de sus “10 realidades en seguridad alimentaria”, menciona las cinco llaves para mantener un alimento seguro y la primera de ellas es la higiene (www.who.int/features/factfiles/food_safety/facts). Ya en el año 1956 en su Informe Técnico N° 104, El Comité de Expertos sostenía que: “... *los productos alimenticios son a menudo objeto de contaminación bacteriana y química y que, en consecuencia, ejercen una influencia directa y de considerable importancia sobre la salud pública.*”. Así mismo define higiene de

alimentos a “*cuantas medidas sean necesarias para garantizar la inocuidad, la salubridad y el valor intrínseco de los alimentos en todas las fases que van desde su cultivo, producción y preparación, hasta su consumo*”. Se hacía necesario ya entonces proponer y educar a la población y a la industria alimenticia en la implementación de programas de higiene de los alimentos adecuado, lo cual favorecerá la prevención de enfermedades y redundará a su vez en beneficios económicos por disminución de gastos por enfermedad y aumento de la productividad propio de una población sana.

La contaminación de alimentos se produce de diversas fuentes (agua, suelo, aire, etc., en el propio hombre y en todos los seres vivos, plantas o animales), más tarde las operaciones de procesado y distribución proporcionan nuevas posibilidades de contaminación.

La higiene de los alimentos abarca un amplio campo que incluye la cría, alimentación, comercialización y sacrificio de los animales así como todos los procesos sanitarios encaminados a prevenir que las bacterias lleguen a los alimentos. Establecer y ejecutar medidas de higiene a través de la implementación de planes adecuados, garantizará que los alimentos no se contaminen y en consecuencia, que no haya daño para la salud.

1.3.2. Dificultades en la aplicación a nivel mundial

Las preocupaciones por la higiene apropiada en las actividades de procesamiento de alimentos son muy grandes, debido a que pobres prácticas de sanitización pueden causar contaminación de los mismos, rechazo de productos y pérdida de la confianza del cliente. Pueden describirse muchos incidentes de contaminación durante el procesamiento de los alimentos, asociados con la falta de higiene.

A pesar del aumento en el número de operarios de la industria alimenticia que reciben formación acerca de higiene alimentaria, una gran proporción de los brotes de intoxicación por alimentos se siguen produciendo como resultado de pobres

prácticas de higiene durante la manipulación de los alimentos (Seaman 2010, Seaman y Eves 2010).

El sistema de gestión diseñado debe entonces, asegurar planes y procedimientos operativos de higiene y desinfección acordes a la estructura de la empresa y garantizar que los mismos se cumplan y tengan los resultados esperados.

El desarrollo de un microorganismo patógeno en un producto alimenticio, derivado por ejemplo de una contaminación debido a una superficie mal higienizada, puede concluir en un producto de desecho, pero también en un problema sanitario grave tanto para la empresa como para la comunidad. La sanitización es un proceso crítico en cualquier operación de procesamiento de alimentos que quiere ser exitosa. Los estándares para las prácticas de higiene continúan creciendo año tras año. No sólo es esencial tener procedimientos apropiados y equipos para realizar la limpieza, sino también buenas instalaciones y diseño que facilite una sanitización eficiente, para mantener de manera exitosa altos estándares de higiene (Scheffler 2009).

Algunos países poseen normas nacionales y/o directivas aplicables al diseño higiénico de maquinaria de alimentos, pero existen pocos estándares internacionales y generalmente están dirigidos a la industria de la leche. Los problemas de higiene en equipos son causados cuando los microorganismos se adhieren a las superficies y sobreviven sobre ellas. Más tarde se desprenden contaminando el producto. Esto puede deberse a una higiene deficiente así como también a un mal diseño del equipo, ya que las irregularidades de las superficies juegan un importante papel como barreras para la acción sanitizante (Kunigk y Almeida 2001). La contaminación en alimentos también puede deberse a la falta de conciencia como el lavado de manos o uso de guantes (Aarnisalo y col. 2006).

1.3.3. Productos utilizados para lograr la higiene y desinfección

Según el Codex Alimentarius en el documento CAC/RCP 40-1993 (uno de los documentos tomados como referencia por la Norma ISO 22000:2007), se define el término **limpieza** como “la eliminación de los residuos de alimentos, suciedad, grasa y otras materias objetables” y **aséptico** “significa comercialmente estéril”.

También en ese documento define **desinfección** como “la reducción del número de microorganismos a un nivel que no produzca la contaminación nociva de los alimentos, mediante la aplicación de agentes químicos y/o métodos físicos satisfactorios del punto de vista higiénico, sin afectar de modo adverso a los alimentos”.

Dentro de estos productos, los antimicrobianos son cada vez de mayor importancia en el procesamiento de los alimentos, por lo que se deberían desarrollar procedimientos uniformes para probar su efectividad. Una precaución que hay que tener con respecto al uso de los mismos es la posibilidad de que ocasionen la aparición de resistencia en los gérmenes. En algunos casos se recomienda el uso correcto y adecuado de un biocida como mecanismo de higiene y limpieza y no el agregado de conservantes en alimentos que puedan generar resistencia en diversas cepas de organismos patógenos (Martorell y col. 2007).

I.4 Productos desinfectantes

I.4.1. Generalidades

La industria alimentaria ha generalizado el uso de sustancias químicas capaces de matar a los microorganismos presentes en sitios de contacto con alimentos, generando al mismo tiempo una higiene del lugar. A los mismos se los denomina “sanitizantes”. Existe gran variedad de agentes sanitizantes con diferentes principios activos. Los más ampliamente usados debido a su capacidad biocida son los compuestos fenólicos, los halogenados y los peróxidos. Los resultados que logran estos productos ante distintos tipos de microorganismos son disímiles y dependen también de las condiciones ambientales y del producto alimenticio (Russel y col. 1992).

La información del tipo de contaminación posible en cada una de las industrias dedicadas a los alimentos es fundamental para la evaluación de riesgos y los procedimientos de higiene y desinfección están íntimamente relacionados a lo antes mencionado. El conocimiento adecuado de los microorganismos capaces de contaminar el alimento y su resistencia/sensibilidad a los agentes de higiene y

desinfección utilizados por la industria, junto con la evaluación de condiciones ambientales y de uso, da la posibilidad de evaluar de forma más amplia los procedimientos a usar para el logro de una higiene adecuada y el resultado de un producto inocuo.

Si bien la definición legal es más detallada, se puede decir que un desinfectante es un agente que libera de la infección producida por microorganismos que generan enfermedad o daño, pero no elimina sus esporos bacterianos. Generalmente es un agente químico, pero a veces puede ser un agente físico tal como los rayos X o la luz UV. Se refiere a sustancias aplicadas a objetos inanimados (Block 1991). Dentro de una formulación, el producto químico que mata microorganismos se menciona como el ingrediente activo. Cuando los desinfectantes son usados para matar microorganismos sobre el cuerpo, se denominan antisépticos. Cuando los ingredientes activos son usados sobre las manos, se los llama sanitizantes de manos. Cuando se utilizan en altas concentraciones y poseen una potente actividad antimicrobiana pueden llegar a lograr la esterilidad de la superficie sobre la que actúan.

Un sanitizante, es un agente/producto que reduce el número de microorganismos a niveles seguros de acuerdo a normas de salud (Resolución Mercosur GMC N° 50/06), pero no necesariamente los elimina. Son generalmente utilizados en objetos inanimados y superficies que están en contacto con alimentos. Los sanitizantes son sustancias que reducen el número de microorganismos a un nivel seguro. Deben tener propiedades germicidas o antimicrobianas y se aplican para destruir los microorganismos. Dicho proceso se conoce como desinfección o sanitización.

La principal diferencia entre un desinfectante y un sanitizante es que a una determinada dilución, el desinfectante debe tener una mayor capacidad para matar bacterias patógenas en comparación con la de un sanitizante. Técnica y legalmente, el desinfectante debe ser capaz de reducir hasta un 99,999% de la población bacteriana en menos de 10 minutos. (Unites States Environmental Protection Agency, 1997). Los sanitizantes generalmente son diseñados para funcionar como la fase final de

limpieza para superficies de contacto del alimento tales como tablas, mesas de cocina y utensilios o cristalería. Además, en sanitizantes no se permite ningún perfume, los que son de uso frecuente en desinfectantes.

Los productos desinfectantes (a diferencia de los antibióticos) trabajan mediante la oxidación de los gérmenes, a través de la ruptura o desorganización de sus paredes celulares, o reaccionando inespecíficamente con grupos de proteínas funcionales. Este mecanismo de acción inespecífico de los biocidas hace que el desarrollo de resistencia se observe a concentraciones de biocida muy elevadas (Meyer 2006).

1.4.2 Historia

Los productos de higiene y desinfección fueron introducidos ya en la edad media por físicos árabes. El sulfato cúprico fue introducido ya en 1767 y el cloruro de zinc en 1815. En 1827 el cloruro mercuríco en solución era usado como desodorante y desinfectante. En 1839 Davies sugiere al yodo en heridas y en 1843 Lefebre introduce el agua de cloro y Semmelweis la usa en 1847 para realizar el lavado de manos de operarios en sus trabajos con la fiebre puerperal en Viena. Trece años después Kiichenmeister usó fenol puro para curaciones y en 1875 Bucholtz desarrolla lo que aún hoy es usado: “**concentración mínima inhibitoria de fenol**”. Otros dos desinfectantes aún usados en la actualidad fueron introducidos hace muchos años. El peróxido de hidrógeno por Traugott en 1893 y compuestos clorados por Dakin en 1915. En 1916 Jacobs introduce los compuestos de amonio cuaternario. Paralelamente se determina la importancia de la identificación de la especie microbiana en relación con una determinada infección o contaminación.

Actualmente, la preocupación por la propagación paulatina de nuevas enfermedades infecciosas, virus y gérmenes hace que el uso de los desinfectantes y sanitizantes se vuelva más popular que nunca, existiendo numerosos tipos de agentes antimicrobianos para distintos tipos de propósitos (Russel y col 1992). Dicha cantidad y variedad de productos obliga a las empresas que los utilizan a documentar los químicos utilizados, las concentraciones, los métodos y horarios de aplicación

para cada parte de la planta, junto con las variantes en los tipos de piso, diseños de equipo y flora microbiana en las plantas. Estos detalles en general son descriptos en POES u otros que la empresa posea dentro de su sistema de gestión, pero son fundamentales para un correcto procedimiento de higiene y desinfección dentro de una planta.

1.4.3 Resistencia vs adaptación

Como se menciona anteriormente, la aparición de resistencia en los microorganismos es uno de los posibles efectos no deseados derivados del mal empleo de los productos sanitizantes. No obstante esto, la resistencia, determinada genéticamente debe ser distinguida de los procesos de adaptación fenotípica, que no son hereditarios. Para entender el desarrollo de tolerancia o adaptación al estrés en los microorganismos, es crucial entender las causas de su muerte. La muerte es la incapacidad irreversible para crecer y multiplicarse, y puede ocurrir en varias etapas durante la exposición a condiciones nocivas. Las condiciones pueden ser tan severas que las células mueren inmediatamente (por ejemplo: por ruptura de la membrana plasmática). Las células también pueden sufrir daños, pero mantenerse metabólicamente activas, mientras que tratan de reparar el daño o adaptar su fisiología. Si esto no fuera posible, las células mueren. Por lo tanto, para sobrevivir, las células no deben morir inmediatamente, sino que necesitan de un determinado tiempo para reparar los daños y adaptar su fenotipo. Esto provoca un retraso en el crecimiento (fase lag), en algunos casos porque las células detienen su crecimiento en una fase específica de su ciclo celular (Smits y Brul 2005).

La adaptación puede ser evitada por la limpieza rigurosa y la desinfección, evitando las concentraciones de desinfectantes por debajo de la concentración microbicida. La rotación en el uso de desinfectantes para evitar la resistencia no está recomendada.

El proceso de adaptación se observa de manera más habitual en el uso de conservantes. Algunas levaduras se han adaptado a crecer en ambientes de hasta 800 mg/L de ácido sórbico, que es un agente usado frecuentemente en la preservación de

alimentos. Sin embargo, en ausencia de la sustancia, generalmente se pierde dicha tolerancia, por lo que se deduce que no es una verdadera resistencia, sino una adaptación fenotípica.

La elección del desinfectante con el espectro apropiado de eficacia para evitar problemas de adaptación en microorganismos, es el primer paso para crear un plan de higiene exitoso (Meyer 2006).

1.4.4 Clasificación

Para conocer los distintos productos generalmente usados se puede realizar una breve clasificación de los mismos según Russel y *col.*(1992):

1. Fenoles y sus compuestos
2. Ácidos orgánicos e inorgánicos: ésteres y sales
3. Diaminas aromáticas
4. Biguanidas
5. Agentes surfactantes: Aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfóteros.
6. Aldehidos
7. Colorantes antimicrobianos
8. Halógenos: los más importantes son los compuestos iodados, los clorados y el bromo.
9. Derivados de quinolonas e isoquinolonas
10. Alcoholes
11. Peróxidos: peróxido de hidrógeno y ácido peracético.
12. Agentes quelantes
13. Permeabilizantes
14. Metales pesados
15. Anilidas
16. Misceláneas: Otros productos químicos con actividad antimicrobiana
17. Desinfectantes con fase vapor

1.4.5 Compuestos clorados

La estabilidad del cloro libre disponible en solución depende de distintos factores: concentración de cloro, pH, presencia de materia orgánica y de luz. (Dychdala, G. 1983). El cloro en sus diversas formas es uno de los compuestos químicos más ampliamente utilizados como sanitizantes en alimentos. Los sanitizantes a base de compuestos clorados forman ácido hipocloroso en solución. Se define como “cloro disponible” a la medida de la capacidad oxidativa y se expresa en términos de la cantidad equivalente de cloro elemental (Cords y col. 2001).

Los hipocloritos son los compuestos con cloro activo más antiguos y ampliamente usados en el campo de la desinfección química. Esto se debe a que son:

- a. Gericidas poderosos y probos, que controlan un amplio espectro de microorganismos
- b. Son desodorizantes
- c. En las concentraciones usadas, no producen daño en el personal que trabaja con ellos
- d. Sin color y no producen manchas
- e. Fáciles de usar
- f. Económicos

Expuestos al aire los hipocloritos atraen la humedad y son menos estables.

Las soluciones de hipoclorito de sodio entre 1 y 15 %, con el 1 al 5 % de cloro disponible, son usadas para aplicaciones domésticas. Las soluciones más concentradas son utilizadas en aplicaciones industriales. La concentración de cloro disponible o libre comprende las formas Cl_2 , el ácido hipocloroso (HOCl) e iones hipoclorito (OCl^-).

Debido a su amplia aceptación como desinfectante en muchas industrias, las soluciones de hipoclorito sirven como estándar para testear otros sanitizantes.

Actualmente son usados como sanitizantes en la mayoría de los hogares, hospitales, escuelas y edificios públicos. También son ampliamente usados como sanitizantes en plantas procesadoras de alimentos, industrias lácteas y cárnicas y plantas de embotellado como cervecerías y viñedos. A pesar que el empleo de ozono,

el peróxido de hidrógeno y ácido peroxiacético en los alimentos mínimamente procesados está tomando fuerza, el uso de productos a base de cloro es aún mayor en este tipo de alimentos de gran interés en la actualidad. De manera general, su uso en frutas y hortalizas frescas se recomienda en concentraciones de cloro libre entre 50 y 200 mg.L⁻¹, pH entre 5 y 7, durante 3 a 20 minutos de exposición del producto alimenticio al sanitizante (Guerra Lund y col. 2005).

Tienen un amplio espectro de acción bacteriana, aunque es menos activo con esporas. Es muy afectado por la presencia de materia orgánica (Ruiz Cruz y col. 2006) y su acción decrece con el aumento del pH.

Una de las desventajas de su uso es la posible producción de cloraminas tóxicas y también sensibilizaciones pulmonares, pero esto puede ser eliminado por un correcto uso y un seguimiento cuidadoso del procedimiento de desinfección. Para evitar la formación de cloraminas y haloformos es necesario mantener los niveles de cloro libre elevados (Russel y col. 1992).

1.4.6 Ácido Peracético

Fue introducido en 1955 como agente antimicrobiano. Comercialmente se lo consigue al 15 % en solución acuosa. Tiene un amplio espectro de actividad, incluyendo bacterias como *Escherichia coli*, *colifagos* y *Clostridium perfringens* y sus esporos (Beber de Souza y Daniel 2005), algas, levaduras, mohos y virus. Por ser estos productos de naturaleza ácida, su acción germicida es atribuible a que afectan el pH del medio, desnaturalizan las proteínas y afectan el funcionamiento de la membrana celular. Altera/oxida los enlaces S-S y S-H de las enzimas. Es un poderoso agente oxidante pudiendo ser hasta corrosivo en algunas circunstancias. Se encuentra en equilibrio con sus productos de descomposición (ácido acético y peróxido de hidrógeno) y los productos finales de su descomposición son ácido acético y oxígeno. Posee un mecanismo de acción similar al peróxido, o sea, a través del alto poder oxidante que se asocia a la formación de radicales libres de alta reactividad y que son catalizados por la temperatura, las radiaciones y los iones metálicos como el Cu²⁺. Se ha encontrado que es más activo que el peróxido de

hidrógeno y no es tan afectado por la presencia de materia orgánica (Beber de Souza y Daniel 2005). Es recomendable para superficie en contacto con alimentos (Russel y col. 1992). Su actividad decrece con el aumento del pH. Actualmente tiene extenso uso, desde el tratamiento de lodos y efluentes a la sanitización en industrias alimenticias (Srebernich 2007).

El ácido peracético (PAA) presenta muchas ventajas en comparación con hipoclorito de sodio y los iodóforos. Una de ellas es que no produce residuos tóxicos cuando se descompone (productos de descomposición inocuos), y por lo tanto no afecta ni el producto final ni al proceso de tratamiento de residuos. Así también presenta ventajas sobre los amonios cuaternarios, ya que es menos afectado por la materia orgánica y los detergentes que estos últimos (López y col 2002). PAA se puede utilizar en un espectro amplio de temperatura (0 a 40 ° C) (Leaper 1984), en la limpieza in situ y en los procesos con ambientes saturados de dióxido de carbono (Jurado 1993). PAA también se puede usar con agua dura. Además, los residuos de proteínas no afectan su eficiencia. Hasta ahora, no se ha informado ninguna resistencia microbiana a los PAA. Es eficiente en un amplio espectro de pH, 3,0 a 7,5 (Block 1991).

I.5 Microbiología de alimentos

1.5.1 Contaminación de alimentos por microorganismos

La contaminación por microorganismos en la industria alimenticia posee diversos orígenes, incluyendo materias primas, trabajadores, equipamiento y envases. Si dichos microorganismos no son destruidos durante el procesamiento, pueden crecer durante la producción, distribución o comercialización del alimento, reduciendo su calidad, pudiendo llegar a ser peligrosos para la salud del consumidor. Además, si la contaminación no es eliminada totalmente de la planta procesadora de alimentos, las producciones posteriores también pueden resultar contaminadas. La eliminación de la microbiota contaminante de las superficies de contacto con los alimentos puede conseguirse utilizando sanitizantes eficaces. Por lo tanto, debe ser bien determinada la eficacia de los mismos en las condiciones de uso.

Existen diferentes métodos disponibles para esta evaluación, incluyendo el método de suspensión de la AOAC. Sin embargo, este método no tiene en cuenta el hecho de que la actividad de un desinfectante depende de la situación física de las células microbianas. Cuando los microorganismos se encuentran dentro de o adheridos a la superficie del equipo, pueden estar protegidos por las irregularidades de la superficie, lo que dificulta la acción del desinfectante. En la contaminación microbiológica de un alimento pueden estar implicados grandes cantidades de gérmenes distintos, desde larvas de parásitos hasta distintas especies de bacterias y hongos. Esto dependerá del tipo de alimento que se está evaluando y del ambiente en el que se encuentra.

1.5.2 Hongos como contaminantes de alimentos

El deterioro de los alimentos es un problema grave para la industria alimentaria, ya que hace que los productos sean inaceptables para el consumo humano. Debido a que actualmente los productos alimenticios se realizan a gran escala, la consecuencia del deterioro se traduce en pérdidas económicas cuantiosas para la industria alimentaria (Martorell y col. 2005). Los hongos pueden crecer en ambientes húmedos, y establecerse en los techos, suelos, paredes y hasta en los drenajes del piso si estas áreas no se limpian y desinfectan adecuadamente (Gougouli y Koutsoumanis 2010).

El tipo de microorganismo que prolifera en el producto dependerá altamente del germen que se encuentra en contacto con los ingredientes y con el producto, y de las condiciones ambientales tales como la composición del producto y las condiciones de almacenamiento. Debido a que los hongos generalmente pueden resistir condiciones extremas mejor que las bacterias, habitualmente se encuentran en productos de bajo pH e incluso que contienen conservantes, en donde a las bacterias se les hace imposible el crecimiento (Loureiro 2000). El deterioro de alimentos por hongos puede afectar a una variedad de alimentos procesados, como pan, cereales, especias, los productos lácteos como el queso y los diferenciales (margarina),

aderezos, pasta de azúcar, chocolate, salsas fermentadas (soya), refrescos, frutas, mermeladas y jarabes de azúcar (Smits y Brul 2005).

Los hongos son responsables del cambio en la apariencia, sabor y olor de algunos productos, reduciendo su valor nutricional y con posibilidades de producción de alérgenos y toxinas (micotoxinas). Generalmente se usan fungicidas sintéticos como primera medida para evitar la contaminación. No obstante esto, se están buscando alternativas debido a la aparición de residuos no deseados de estos fungicidas en los alimentos, aparición de cepas resistentes de los contaminantes y la inhabilitación para el uso de ciertos biocidas habituales. (Magro y col. 2006). Para combatir efectivamente deterioro de los alimentos por hongos, es crucial comprender el mecanismo de tolerancia, y/o la adaptación al método de preservación empleado. Sin embargo, para los hongos que causan deterioro de los alimentos aún no existe un nivel de comprensión superlativo como ya se ha alcanzado por ejemplo en *S. cerevisiae*, del cual ya se ha caracterizado la secuencia genómica completa (Smits y Brul 2005).

El crecimiento de los hongos se encuentra influenciado por complejas interacciones entre factores intrínsecos y extrínsecos. El tiempo, la temperatura, humedad, composición gaseosa y la presencia de antimicrobianos son algunos de los factores que se combinan para evaluar los sistemas fungistáticos y/o fungicidas. Si bien, como se mencionó anteriormente, el crecimiento de los hongos es controlado generalmente por antimicrobianos sintéticos, existen antimicrobianos naturales que han demostrado tener importantes propiedades antifúngicas (López-Malo y col. 2005).

1.5.3 Importancia de las levaduras

Las levaduras han sido explotadas por sus beneficios comerciales por cientos de años en la producción de diversos alimentos y de bebidas alcohólicas. Sin embargo, las levaduras también han demostrado estar implicadas en el deterioro de una amplia gama de alimentos, de acuerdo con sus capacidades metabólicas y fisiológicas. Estas capacidades les permiten superar las condiciones ambientales y las

medidas de conservación aplicadas para controlar el deterioro de los alimentos. Gran cantidad de medidas han sido adoptadas por la industria alimentaria para controlar la amenaza de deterioro por levaduras, debido a las exigencias de los consumidores que demandan un alimento de alta calidad, sin conservantes, y seguros, que posean menores transformaciones y mantengan una vida de anaquel prolongada, lo que impone de manera permanente nuevos retos a la industria alimentaria.

Por otra parte, el número de organismos capaces de tolerar las condiciones ambientales presentes en la elaboración de alimentos, incluyendo la capacidad de resistir y vencer las medidas de conservación utilizadas para controlar el deterioro, se está incrementando dramáticamente (Martorell y col. 2005). Incluso en productos como la carne, que generalmente atribuía el deterioro al desarrollo exclusivamente de bacterias, las nuevas tecnologías de procesamiento y envasado han provisto de oportunidades para el crecimiento de levaduras, las cuales ya se han aislado en muestras de productos cárnicos (Nielsen 2008).

De todos los hongos contaminantes de alimentos, las levaduras cobran mayor importancia en productos de bajos pH y a_w como son los jugos de fruta concentrados, y representan el mayor problema que poseen las industrias procesadoras de este tipo de bebida (Renard y col. 2008). Las levaduras no sólo pueden causar alteraciones organolépticas sino también producir gran cantidad de CO_2 durante la fermentación de los monosacáridos y el envase suele estallar o deformarse. Algunas alteran el ambiente cambiando el pH o degradando los conservantes ácidos. Otras, pueden crecer hasta pH 2,8 y además en jugos concentrados con 50° Brix porque tienen un sistema enzimático que produce solutos compatibles (Ancasi y col. 2006). Uno de los géneros más comúnmente aislados es *Zygosaccharomyces*. Dentro del mismo se mira con particular atención a las especies *Z. rouxii*, *Z. bisporus* y *Z. bailii*, por su alta resistencia a bajos pH y bajas a_w , siendo estos los organismos causantes de mayores deterioros en jugos de frutas, salsas, bebidas carbonatadas, aderezos salados y ketchup (Martorell y col. 2007).

En la actualidad existen aproximadamente 1000 especies de levaduras. Sin embargo, sólo un pequeño grupo es responsable de la alteración de alimentos.

En las siguientes tablas se muestra las especies de levadura más importantes en la contaminación de alimentos (Tabla 1) y posteriormente el detalle del tipo de alimento susceptible de ser contaminado por las distintas especies (Tabla 2).

Pitt y Hocking (1997)	Tudor y Board (1993)	Grupo 1 de Davenport ^a
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	<i>Brettanomyces intermedius</i>	<i>Brettanomyces anomalus</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Candida holmii</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Brettanomyces naardenensis</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula spp</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
<i>Torulopsis holmii</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	-	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>

^a En Stratford y col., 2000

Nota: cambios recientes en la nomenclatura (Barnett y col., 2000; Kurtzman, 2003)

Brettanomyces intermedius=*Brettanomyces bruxellensis*=*Dekkera bruxellensis*

Brettanomyces anomalus=*Dekkera anomala*

Candida krusei=*Issatchenkia orientalis*

Candida holmii= *Torulopsis holmii*= *Saccharomyces exiguus*=*Kazachstania exigua*

Kloeckera apiculata= *Hanseniaspora uvarum*

Zygosaccharomyces microellipsoides=*Torulaspota microellipsoides*

Tabla 1: Especies de levaduras más significativas y comúnmente descritas como alterantes de alimentos (Guerola, 2006)

Producto (ejemplos)	Levaduras	Referencia
Frutas Uva, manzana, fresa, cereza, higo, frutas tropicales, naranjas	<i>Hanseniospora spp</i> , <i>Candida stellata</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>P.</i> <i>membranaefaciens</i> , <i>P. fermentans</i>	Lachaise , 1977; Guerzoni y Marchetti, 1987; Spencer y col., 1992
Verduras Verduras frescas y procesadas, ensaladas	<i>Candida spp</i> , <i>Cryptococcus spp</i> , <i>Rhodotorula</i> <i>glutinis</i> , <i>Sporobolomyces roseus</i>	Parish y Carroll, 1985; Collins y Buick, 1989; Babic y col., 1992
Zumos de frutas y refrescos Zumos frescos y procesados, refrescos	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Dekkera anomala</i> , <i>Candida spp</i> , <i>P. anomala</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Sadler y col., 1992; Sand, 1974; Cole y col., 1987; Deák y Beuchat, 1993, 1994; Kisko et al., 2005
Bebidas alcohólicas Vino	<i>Dekkera spp</i> , <i>Saccharomycodes ludwigii</i> , <i>Candida vini</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>I.</i> <i>orientales</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>P. guilliermondii</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i>	Goswell, 1986; Sancho y col., 1986; Chatonnet y col., 1992; Ibeas y col., 1996; Constantí y col., 1997; Stender y col., 2001; Dias y col., 2003a
Cerveza	<i>Saccharomyces spp.</i> , <i>Dekkera spp</i> , <i>P.</i> <i>fermentans</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>T. delbrueckii</i>	Lawrence, 1988; van der Aa Kuhle y Jespersen, 1998
Sidra	<i>P. membranaefaciens</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>S. ludwigii</i> , <i>S. pombe</i>	Carr, 1984; Morrissey y col., 2004
Productos lácteos Leche, nata, mantequilla, yogurt, queso	<i>Candida spp</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>P. anomala</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>Cryptococcus spp</i> , <i>S. roseus</i> , <i>Z. rouxii</i> , <i>Z.</i> <i>microellipsoides</i>	Green y Ibe, 1987; Brocklehurst y Lund, 1985; Fleet, 1990a; Caggia y col., 2001; Cappa y Cocconcelli, 2001
Carnes y pescados Carnes roja fresca, pollo, carne procesada, pescado, marisco	<i>Candida spp</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , <i>Trichosporon spp</i> , <i>Cryptococcus</i> <i>spp</i> , <i>Y. lipolytica</i>	Fung y Liang, 1990; Diriye y col., 1993; Fleet, 1990b; Deak, 2001

Tabla 2: Alimentos específicos y levaduras alterantes asociadas (Guerola, 2006).

Producto (ejemplos)	Levaduras	Referencia
Cereales y productos de panadería Avena, trigo, maíz, pan	<i>Candida spp.</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>S. roseus</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>Trichosporon spp.</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>P. membranaefaciens</i>	Petters y col., 1988; Legan y Voysey, 1991
Alimentos con elevado contenido en azúcar o sal Mermelada, jarabe, concentrados, frutas confitadas, dulces	<i>Z. rouxii</i> , <i>Z. bisporus</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>P. anomala</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>Candida spp</i>	Tilbury, 1980a; Tokouka y col., 1985; Jemini y col., 1987
Alimentos fermentados y conservados con ácidos orgánicos Col ácida, aceitunas, mayonesa, aliños, carne fermentada	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. anomala</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>I. orientalis</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>T. delbrueckii</i>	Brocklehurst y Lund, 1984; Pitt y Hocking, 1988; Kurtzman, 1990; Marquina y col., 1992

Continuación Tabla 2: Alimentos específicos y levaduras alterantes asociadas (Guerola, 2006).

1.5.4 *Zygosaccharomyces rouxii* como contaminante en la industria alimenticia

Existen levaduras de diversos géneros y especies. Una de las formas de clasificación es de acuerdo con su composición de ácidos grasos. Según esta categorización, *Zygosaccharomyces rouxii* se ubica en el segundo grupo, entre las levaduras que carecen del ácido graso C 18:3, y su aislamiento e identificación en jugos de frutas es considerado como altamente riesgoso para la estabilidad del producto (Sancho y col. 2002).

La osmotolerancia de esta levadura es importante, llegando a crecer en medios que contienen hasta 15 % de NaCl ó 70 % de sacarosa. El mecanismo de tolerancia ha sido motivo de muchos estudios y se asocia a la producción intracelular de polioles, que balancean la presión osmótica interna; e involucra también otros factores como composición de la pared celular y membrana plasmática, y la actividad ATPasa.

Puede crecer a su vez, en un amplio rango de pH (entre 1,5 y 8); esta característica común a muchas levaduras, se relaciona con la actividad ATPasa de la membrana plasmática, que regula el pH intracelular a través de la exportación de

protones. (Praphailong y Fleet 1997). *Z. rouxii* es también resistente a altos niveles de dióxido de carbono (80 %), siendo entonces de importancia en el deterioro de alimentos con atmósferas modificadas, como sucede con ciruelas y pasas de uvas envasadas (El Halouat y col. 1998).

Z. rouxii es considerado el segundo organismo más xerófilico conocido, sumando además esta habilidad con la de fermentar hexosas, hace que esta levadura sea una de las principales causantes de contaminación fermentativa en alimentos (Martorell y col. 2005). Se han reportado aislamientos de esta levadura en gran variedad de alimentos: azúcar de caña, extracto de malta, mostos de vinos, concentrados de jugos de frutas (Arias y col. 2002), tortas heladas, miel, salsas de soja y chocolate, ciruelas, pasas de uva, etc. (Smits y Brul 2005). Aún bajas cantidades de células viables pueden ocasionar importantes pérdidas, causando rápidamente hinchazón en alimentos envasados (Pitt y Hocking 1997).

El género *Zygosaccharomyces* es, junto con los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, uno de los organismos que presentan resistencia a los conservantes (Martorell y col. 2005). Si bien *Z. rouxii* no es considerada la especie más resistente de este género (Reyns y col. 2000), su importancia como contaminante de alimentos centra nuestro interés en la misma. La resistencia de la especie a distintos fungicidas y conservantes ha demostrado ser variable, encontrando distintas sensibilidades al ácido sórbico y benzoico dependiendo del pH (Praphailong y Fleet, 1997; El Halouat y col, 1998) y con posible producción de pentadieno (compuesto volátil con olor semejante al petróleo) en alimentos conservados con sorbato de potasio (Casas y col. 2004) , sensibilidad variable a ciertos conservantes como sulfitos y peróxido de hidrógeno (Martorell y col. 2007) o aceites de canela y ajo (Matan *et al.* 2006); así como también siendo la especie de mayor resistencia entre las ensayadas cuando se emplea fungicidas de uso vitivinícola (Calhelha y col. 2006). Cerrutti y Alzamora, 1996 lograron una inhibición del crecimiento de *Z. rouxii* en puré de tomates durante 40 días, utilizando vainillina a 2000 ppm de concentración.

No lograron efecto alguno sobre el crecimiento con aceite esencial de menta a 100 ppm.

I.6. Métodos predictivos

1.6.1 Desarrollo de la microbiología Predictiva

En 1937 un microbiólogo cárnico australiano Scott insinuaba el concepto de microbiología predictiva cuando decía: “el conocimiento de las tasas de crecimiento de determinados microorganismos a diferentes temperaturas es esencial para estudiar el deterioro de los cortes de carne vacuna. Obteniendo estos datos podría ser posible predecir la influencia relativa de distintos microorganismos en el deterioro, a cada temperatura de conservación del alimento”. En la década de 1980 hubo un aumento significativo del interés por la microbiología predictiva como resultado de algunos brotes de intoxicación alimentaria causada por los principales agentes patógenos “tradicionales” en los alimentos (por ejemplo, *Salmonella* en huevos), así como los agentes patógenos emergentes con características poco comunes (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* que puede crecer a temperaturas de refrigeración).

El término modelado predictivo fue usado por primera vez por Roberts en 1983. En esa década empezaron a aparecer artículos y revisiones relacionados con el tema y tomaron fuerza en los 90’, período en donde se realiza el primer encuentro internacional de microbiología predictiva. Años más tarde, los aportes de Roberts se transformaron en el primer paquete de microbiología predictiva comercializable: Food Micro Model desarrollado en Inglaterra. En USA se desarrolló un sistema paralelo PMP (Pathogen Modeling Program). Actualmente, PMP está disponible de forma gratuita en (<http://www.arserrc.gov/mfs/PATHOGEN.HTM>) y es la aplicación de software de microbiología predictiva más ampliamente usada. Incluye más de 35 modelos para 11 bacterias patógenas. El soft comercial Food MicroModel, es similar a PMP y se encuentra integrada con el Growth Predictor, el cual posee 18 modelos, pero incluye poca información sobre el desarrollo del modelo y sobre el rendimiento de los modelos en diferentes alimentos. Todos estos, actualmente se encuentran integrados en ComBase (McMeekin y Ross 2002).

La base de datos llamada ComBase evalúa las respuestas microbianas a los ambientes relacionados con los alimentos. Es un receptor de datos de microbiología predictiva que pueden ser utilizados por los evaluadores de riesgos de los distintos países (McMeekin y col. 2006). Según Legan (2007), es probable que la introducción de los datos crudos obtenidos en las investigaciones en bases de datos como ComBase, se tornen en el futuro un requerimiento para la publicación de trabajos referidos al crecimiento, muerte o supervivencia microbianas.

El potencial de las bases de datos es a partir de juntar piezas (datos) recogidas de diferentes lugares como ir armando un rompecabezas (conocimiento total del sistema). Esto requiere que la información sea recolectada en un formato bien definido y de manera sistemática, siguiendo un estricto protocolo.

Una analogía para entender lo que pretende el modelado en microbiología puede ser la siguiente: “si se puede tomar una foto de sólo un pequeño segmento del cielo, entonces es imposible conocer la estructura de la Vía Láctea desde una sola imagen. Sin embargo, cuando las piezas se unen, puede surgir un patrón que muestra el espiral ahora bien conocido de la Vía Láctea”. Se llama a este modelo el “efecto Vía Láctea”, el que muestra el potencial de las bases de datos para introducir pedazos o partes de información, para finalmente lograr un conocimiento de todo el conjunto. ComBase pretende realizar el “efecto vía láctea”, intentando juntar y ordenar datos para que la cantidad pueda compensar la inexactitud de los mismos. Muchos microbiólogos sostienen que las simplificaciones realizadas, hacen que la información en la base de datos no refleje el ambiente y/o respuesta de los microorganismos con suficiente precisión. El hecho es sin embargo, que no es ésta la función de la base de datos. Es más bien, para que los aspectos más importantes de los datos estén disponibles rápidamente, aunque a costa de omitir algunos detalles (McMeekin y col. 2006).

Los sistemas de información tienen que ver con la captura, almacenamiento, análisis y recuperación de datos y constituyen una oportunidad para la recopilación de los conocimientos acumulados y la posibilidad de una mejor interpretación del significado de la nueva información.

El conocimiento que se desea tener de los microorganismos y el comportamiento de las poblaciones microbianas en los alimentos se requiere a nivel de población, a nivel celular y a nivel molecular, con el fin de desarrollar estrategias eficaces de gestión de seguridad alimentaria.

Es evidente que las bases de datos que contienen información sobre el comportamiento de la población microbiana o las características que permiten la definitiva identificación de un patógeno de transmisión alimentaria tienen un papel muy importante que desempeñar en la gestión de inocuidad de los alimentos.

En las últimas dos décadas, la microbiología predictiva se ha consolidado como una disciplina científica por derecho propio, con conferencias internacionales multidisciplinarias realizadas en forma regular, artículos científicos en revistas indexadas, libros y sitios web de Internet. Las aplicaciones actuales en un contexto industrial son amplias y se están extendiendo rápidamente (Membré y Lambert 2008).

Si bien la microbiología predictiva proporciona información muy valiosa para la producción de alimentos seguros con un tiempo de conservación adecuado, las iniciativas verdaderamente innovadoras de conservación de alimentos sólo se obtendrán mediante la combinación del conocimiento de la ecología microbiana cuantitativa con una mejor comprensión de las respuestas fisiológicas a las limitaciones ambientales (McMeekin y Ross 2002). Una combinación entre la ciencia y la tecnología es esencial para la aplicación efectiva de la microbiología predictiva.

1.6.2 Conceptos de microbiología predictiva

El análisis de toda esta amplia gama de posibilidades (factores ambientales, desarrollo de resistencia/adaptación, presencia de inhibidores, etc.) se torna complejo, debiendo realizar gran cantidad de ensayos de laboratorio, lo que demanda un costo importante en dinero y tiempo. Debido a esto se propone la implementación de la “microbiología predictiva” la cual se define como la necesidad de describir la respuesta microbiana en ambientes alimentarios a través de modelos matemáticos (Baranyi y Roberts 2004).

Para poder entender a qué se refieren estos autores se puede citar lo mencionado por Mario Bunge (1972) en su obra *La investigación científica: su estrategia y su filosofía*, donde dice “*Efectivamente: salvo en el caso de teorías de bajo nivel, sabemos desde el primer momento que nuestras teorías tratan de idealizaciones*”. El autor alude a las abstracciones que elabora nuestra mente para dar cuenta o explicar un referente empírico. A esto también se denomina el “efecto platónico”, ya que fue Platón, quien hizo hincapié en que el pensamiento científico necesita estas simplificaciones (es decir, idealizaciones) (McMeekin y col 2006). La microbiología predictiva aporta un enfoque interesante y es un instrumento muy útil para la seguridad alimentaria y para la optimización de procesos. Es una valiosa herramienta para el seguimiento y control de la misma, sobre todo en casos en que los modelos se relacionan con condiciones dinámicas como ser cambios de temperatura. Cuanto más simples son los modelos propuestos y más realistas las condiciones consideradas, es más fácil la implementación en los procesos (Yaghlene y col 2009).

La combinación entre la microbiología predictiva y la ingeniería en alimentos, puede fortalecer los procesos en relación a su seguridad y su optimización. (Mafart 2005).

Esas abstracciones crean un esquema que hace las veces de una contrapartida ideal, esquematizada, de un hecho objetivo, aún cuando éste pueda ser inferido. Estas abstracciones explicativas, estas idealizaciones que se superponen a la realidad, y que “funcionan” como tales, es lo que se llama **modelo**. Por lo tanto, un modelo puede definirse como “la descripción de un sistema, teoría o fenómeno que explica sus propiedades ya conocidas o deducidas, y puede ser utilizado para estudiar más a fondo sus características” (McMeekin y col 2008). Los modelos enfocan ciertas partes importantes de un sistema, restándoles importancia a otras. Son creados empleando herramientas de modelado. Nunca deben considerarse productos definitivamente acabados, todo lo contrario, ellos siempre están en estado de sofisticación buscando su perfeccionamiento, en cuanto a representación de la realidad se refiere. Son construcciones hipotéticas, imaginarias creadas a partir de un

conjunto de definiciones, donde siempre se trabaja con factores y un marco de referencia, por lo que no se pueden realizar extrapolaciones por fuera de dicho marco. El modelo es una descripción a menudo simplificada de relaciones entre las observaciones del sistema (respuestas) y los factores que se cree provocan o causan las respuestas observadas. Esta descripción puede realizarse en palabras o, expresarse cuantitativamente en una o más relaciones o ecuaciones matemáticas. Un modelo nos permite extraer más información de los datos que con las técnicas clásicas, y rechazar la hipótesis nula siempre que la diferencia entre los dos grupos sea lo bastante grande.

Los modelos para predecir la respuesta de microorganismos a diversos factores, pueden ayudar a entender y controlar el crecimiento de gérmenes en alimentos. El crecimiento de un microorganismo en un alimento puede ser modelado, controlando algunos factores y evaluando otros.

El desarrollo de los modelos propuestos que puedan predecir el crecimiento de los microorganismos de interés y/o la inhibición de los mismos por productos conservantes y sanitizantes pueden complementarse con el sistema HACCP (Baranyi y col. 1999). Un claro ejemplo de esto lo desarrolla Panisello y Quantick 1998, quienes demostraron la aplicación del modelado en un sistema HACCP en la elaboración de paté a base de carne. También colaboran en el análisis de riesgos para definir estrategias y políticas que reduzcan el peligro de enfermedades transmitidas por alimentos.

El predecir el comportamiento de la microflora ayuda a una rápida detección de la contaminación microbiana (McMeekin y col. 1993; Baranyi y Roberts 1994,1995, 2004; Ross y McMeekin 1994), aunque debe tenerse en cuenta también que dichas predicciones y/o modelos aplicados pueden tener desvíos que deben ser evaluados minuciosamente previo a su aplicación; un ejemplo de esto es el tipo de alimento que se desea evaluar (Dens y Van Impe 2001) o la posible interacción entre distintos microorganismos o especies presentes en el mismo alimento (Pin y Baranyi 1998, Baranyi y col. 1996). La ecuación de Gompertz modificada y otros diversos modelos matemáticos fueron aplicados para predecir el crecimiento bacteriano (Perni

y col. 2005; Ingaramo y col. 1995; Van Impe y col. 2005; Cayré y col. 2007), así como de mohos y levaduras contaminantes de alimentos (Andrés *et al.* 2002, Chowdhury y col. 2005, Valik y col. 1999).

Estos modelos permiten predecir la seguridad microbiológica, la inocuidad de los productos, la detección de puntos críticos en los procesos de producción y distribución y la optimización de los mismos (Zwietering *et al.* 1990), reduciendo la necesidad de un estudio microbiológico “ad hoc” y realizando así un análisis más rápido con considerables beneficios económicos. Los mismos predicen el tiempo que tardarían los microorganismos patógenos y/o los alterantes, en empezar a proliferar en determinadas condiciones y a qué velocidad pueden crecer; esto permitirá en un futuro desarrollar estrategias y tecnologías para prevenir el ingreso de microorganismos a la cadena alimentaria, o, en caso de estar presentes, ayudar a eliminarlos. Detectar mediante estos mecanismos regiones de inhibición de crecimiento bien definidas (por medio de la variación de pH, a_w y concentración de biocidas, etc.) puede ayudar a la elaboración de directrices para la formulación de nuevos alimentos estables sin utilizar conservantes químicos, lo que facilitaría la innovación de productos sin aditivos (Dang y col. 2010).

1.6.3 Clasificación de modelos

Los modelos predictivos ya están siendo usados por la industria de alimentos para desarrollar nuevas formulaciones que minimicen el crecimiento microbiano.

Se pueden clasificar según el siguiente esquema propuesto por Whiting y Buchanan 1993:

Modelos PRIMARIOS: describen cómo la densidad de las poblaciones van cambiando a través del tiempo en un ambiente específico y se representan a través de curvas de crecimiento o muerte

- Ecuación Gompertz
- Ecuación Baranyi y Roberts
- Modelo lineal en 3 fases

Modelos SECUNDARIOS: indican cómo los parámetros de los modelos primarios cambian con la variación de los factores ambientales e implican una transformación en los datos de los tiempos de respuesta

- Modelos Raíz cuadrada
- Ecuaciones polinómicas
- Redes Neuronales Artificiales

Modelos TERCARIOS: Son software que utilizan los modelos antes mencionados para un conjunto determinado de microorganismos y los encuadra en un sistema informático en el cual el usuario puede introducir distintas condiciones o variables para ver los parámetros de crecimiento e incluso de inactivación de dicho microorganismo. La mayoría de los mismos son de acceso gratuito a través de su link en la web. Son herramientas de aplicación tales como los normogramas, paquetes de software y sistemas expertos

- DMFit (www.ifr.ac.uk/safety/dmfit)
- GlnaFit (www.cit.kuleuven.be/biotec/index.htm)
- PMP (www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm)
- Growth Predictor (www.ifr.ac.uk/safety/growthpredictor)
- ComBase (www.combase.cc)

Los modelos también pueden basarse en el comportamiento de la cinética de las poblaciones microbianas o examinar la probabilidad que un determinado organismo pueda crecer, morir o producir un metabolito en un cierto período de tiempo. Existen otras clasificaciones de los modelos, tales como los mecanicistas y los empíricos, en referencia a si poseen o no una base teórica.

Existen otros importantes sistemas desarrollados como el Sym'previus (<http://www.symprevius.net/>), que es un sistema de soporte de decisiones en francés que incluye (i) una base de datos con las respuestas de crecimiento de microorganismos en los alimentos y (ii) los modelos de predicción para el crecimiento y la inactivación de seis bacterias patógenas; el Food Spoilage Predictor (“FSP”). El Seafood Spoilage, el Safety Predictor (SSSP), (www.dfu.min.dk/micro/sssp/) y Safety Monitoring and Assurance System, son

ejemplos de software de predicción de aplicación más específica. FareMicrobial (<http://www.foodriskclearinghouse.umd.edu/faremicrobial.htm>) es un programa de software más sofisticado para realizar una evaluación probabilística del riesgo microbiano.

1.6.4 La microbiología predictiva en sistemas de calidad y seguridad alimentaria

La microbiología predictiva forma parte de un nuevo paradigma en los sistemas de gestión de seguridad alimentaria, ya que provee un soporte esencial a los sistemas ya ampliamente aceptados como HACCP, QMRA y otros. En el campo de la seguridad alimentaria, las investigaciones y publicaciones realizadas son revisadas periódicamente, ya que proveen evidencia con base científica para nuevas regulaciones y mediciones de la higiene alimentaria internacional, tal como lo solicita la Comisión de Código Alimentario. Como se dijo anteriormente, la microbiología predictiva, resulta actualmente un soporte para sistemas mayores en la gestión de seguridad alimentaria como HACCP, QMRA, FSO e ISO 22000. Es por esto que las investigaciones realizadas en seguridad alimentaria son vistas como una actividad que debería estar implantada por los gobiernos y sostenida por la industria. Para fijar los límites y las respuestas del sistema HACCP, se requiere de datos científicos. En el contexto de los peligros microbiológicos, esta información se encuentra cada vez más disponible a través de los modelos de microbiología predictiva. Así, cuando se establece la tolerancia de un paso en particular, la microbiología predictiva puede especificar las diversas combinaciones de factores (ej.: temperatura, tipo de microorganismo, tiempo, pH, etc.), que se deben cumplir para estar dentro de ese límite de tolerancia. Para estimar el número de microorganismos presentes en el alimento al momento de ser consumido, a partir de niveles conocidos en algún momento anterior de la historia del producto, se requiere de un conocimiento sólido y cuantitativo de las respuestas de los microorganismos a las condiciones ambientales que experimentan en los alimentos. Sin los modelos de la microbiología predictiva esto no podría ser posible. (McMeekin y Ross 2002).

En general en todo el mundo, la mayoría de las investigaciones realizadas en modelado predictivo son efectuadas sobre microorganismos patógenos en alimentos más que sobre los alterantes de los mismos. Generalmente estos últimos son solicitados por el sector alimentario o alguna compañía en particular con el fin de obtener ventajas comerciales (McMeekin 2007). Ejemplos de esto son empresas como Unilever, quien ha desarrollado y validado modelos de microbiología predictiva adaptados a sus necesidades y a un alimento en particular, o Nestlé, quien también ha comenzado su aplicación, pero de forma un poco más acotada.

El objetivo final de la microbiología predictiva en alimentos es ayudar al tecnólogo de alimentos elegir la combinación más adecuada de las condiciones de estrés para llegar a una formulación del producto estable (Brul y col. 2008).

Una restricción de estas herramientas es que sólo abarcan un cierto número de microorganismos, a menudo sólo los microorganismos patógenos, y han establecido los modelos con mayor frecuencia en medios de cultivo líquidos (caldos). Como se ha indicado antes, esto limita la utilidad para la aplicación industrial en relación con el desarrollo de productos, aunque se está trabajando para la mayoría de los sistemas en ampliar la gama de microorganismos cubiertos (incluyendo microorganismos alterantes), y añadir los modelos que han sido validados en los sistemas alimentarios.

Se estima que un modelo predictivo puede dar resultados al menos 1000 veces más rápido que una prueba tradicional (Membré y Lambert 2008).

1.6.5 Uso del Modelo Terciario DMFit

DMFit es una aplicación on-line para ajustar curvas de crecimiento microbianas donde la fase lineal (fase exponencial) está precedida de una fase de adaptación y una posterior estacionaria. La edición web del DMFit ha sido elaborada con financiamiento del UK Food Standards Agency (Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido). El uso del soft es gratuito y se lo descarga directamente de la página <http://www.ifr.ac.uk/safety/dmfit>, desde donde se recibe el mismo vía correo electrónico. Los modelos del ComBase predictor, fueron desarrollados utilizando DMFit.

El sistema permite:

- Ver una representación gráfica de los datos de crecimiento/supervivencia microbiana.
- Ajustar los datos a un modelo de crecimiento/supervivencia para obtener estimaciones de parámetros cinéticos como:
 - Velocidad Máxima de crecimiento/muerte
 - Fase de latencia (o interfase)
 - Número inicial de células
 - Número final de células
 - Estimación de errores típicos o estándar de estos parámetros.

Los parámetros que definen los modelos disponibles en DMFit son:

- Valor inicial: Describe el logaritmo inicial de la densidad de células bacterianas (en \log_{10} ufc/g ó \ln ufc/g).
- Fase lag/interfase (**lag**): El tiempo de latencia (o interfase en el caso de una curva de supervivencia). El tiempo de latencia se define generalmente como la intersección entre la tangente de la fase de crecimiento exponencial y el valor inicial. Las unidades son las mismas que las unidades utilizadas por los datos de tiempo.
- Velocidad o Tasa máxima (μ): Hace relación a la máxima velocidad o tasa de crecimiento (o la máxima tasa de mortalidad en caso de una curva de supervivencia). Las unidades de las estimaciones están relacionada con las unidades de los datos. Por ejemplo, si el conteo bacteriano está expresado en \log_{10} ufc/g y el tiempo en horas, la máxima velocidad de crecimiento/muerte es \log_{10} ufc/g/h.
- Valor final (y_{\max}): Se refiere al logaritmo de la densidad celular final, en las mismas unidades que los datos.

Las curvas pueden ser ajustadas a dos tipos diferentes de modelos (o de forma parcial a estos modelos): El modelo de Baranyi y Roberts y el modelo trilineal, bifásicos y lineales. El modelo de Baranyi y Roberts (1994) describe una curva microbiana sigmoidea.

1.6.6. Modelo Terciario GInaFiT

El GInaFiT (Geeraerd and Van Impe Inactivation model Fitting Tool) es una herramienta útil para probar diez tipos diferentes de modelos de supervivencia microbiana usando datos experimentales obtenidos por el usuario, relacionando la evolución de la población microbiana con el tiempo. Los diez tipos de modelo son: (i) curvas logarítmicas-lineares clásicas, (ii) curvas que muestra un hombro antes de una disminución log-lineal, (iii) curvas que muestran una cola tras un descenso log-lineal, (iv) curvas de supervivencia con hombro y cola, (v) curvas cóncavas, (vi) curvas convexas, (vii) convexa / cóncava seguidas por una cola, (viii) cinética de inactivación bifásica, (ix) cinética de inactivación bifásica precedida por un hombro, y (x) curvas dobles cóncava / convexa (GInaFiT, 2009).

Junto a los valores de los parámetros obtenidos, son automáticamente registrados los errores estándar de los valores, la suma de errores al cuadrado, la suma de errores medios al cuadrado y el R^2 . Además se muestra automáticamente el tiempo necesario para lograr una reducción de 4 log a partir de la población inicial.

La herramienta se puede utilizar de dos maneras. Por un lado, para los usuarios que poseen ya una idea cualitativa de la forma general de las curvas de supervivencia, el sistema lo ayuda a seleccionar una curva. Por otra parte, si el usuario no tiene una idea clara, distintos modelos pueden ser probados y comparados.

Además, la herramienta tiene algunas características incorporadas para evitar el uso indebido de la misma por parte de usuarios sin experiencia. Por ejemplo, cuando se trata de identificar un modelo con colas en los datos que no la tienen o cuando se utiliza un número demasiado limitado de puntos (observaciones) en comparación con el número de parámetros que posee el modelo elegido. En estas circunstancias, el sistema da aviso al usuario de las razones por las cuales no se realiza el cálculo. Estos detalles ayudan a generalizar el uso de la herramienta.

1.6.7 Modelos predictivos en levaduras

Suponiendo que se dispone de suficientes nutrientes (como suele ocurrir con los alimentos), el crecimiento microbiano es controlado principalmente por la temperatura, actividad de agua (a_w) y el pH. El tratamiento de factores adicionales como la presencia de conservantes, el calor o la atmósfera modificada, también contribuyen. En principio, siempre que se tenga información suficiente acerca de los factores que controlan el crecimiento microbiano, las respuestas de crecimiento de los microorganismos involucrados se pueden predecir.

El modelado matemático del crecimiento de hongos, y la capacidad de predecir si un hongo en particular crecerá en un alimento, y si es así, a qué velocidad lo hará, no ha recibido un grado similar de interés como el modelado del crecimiento bacteriano. La demora en el desarrollo de estas metodologías en hongos no resulta una casualidad, sino que se justifica en el interés por parte de la industria alimenticia, hacia los microorganismos de mayor influencia en la salud de la población. De aquí surge el gran avance realizado sobre las contaminaciones producidas por bacterias. Por otro lado, el crecimiento celular bacteriano que se produce por medio de fusión binaria es clave, ya que provoca un crecimiento del tipo geométrico exponencial que puede ser evaluado con ecuaciones matemáticas conocidas. No se da esto en el crecimiento fúngico, ya que sobre todo en mohos, esto se da a través de germinación, extensión de hifas y formación de micelio, por lo que es más dificultosa la cuantificación del crecimiento micelial. Además aún se tiene poca información acerca de la cinética de germinación por lo difícil de conseguir datos experimentales suficientes y reproducibles. Un prerrequisito para la producción de un modelo útil y confiable para hongos debe ser una base de datos que contenga grandes cantidades de datos relevantes y confiables.

Sin embargo, en la última década se ha generado un aumento del número de modelos de predicción para el crecimiento de hongos, lo cual puede verse en algunos trabajos como Membré y col. 1999, Baranyi y col. 1996, Valik y col. 1999, Rosso y Robinson 2001, Dantigny y col. 2005, Lahlali y col. 2005; Marín y col. 2009; Panagou y col. 2003, 2007; Pardo y col. 2005, 2006; Plaza y col. 2003; Rosso y

Robinson, 2001; Samapundo y col. 2005, 2007; Sautour y col. 2001; Tassou y col. 2007, Reyns *et al.* 2000. La mayoría de estos modelos se centran en el efecto de a_w , o el efecto combinado de la temperatura y otros factores ambientales sobre el crecimiento.

Uno de los aspectos más importantes del desarrollo de un modelo es asegurar que las predicciones hechas por el modelo son aplicables a situaciones reales, por lo tanto el proceso de validación es esencial. Muy pocos modelos que describen el crecimiento de hongos en la literatura científica se han validado externamente (Judet-Correia y col. 2010).

Hay una necesidad de mejorar la comprensión de los factores que controlan el crecimiento de hongos en alimentos, en particular los factores que se asocian a nuevos procesos de fabricación y las técnicas de embalaje. La posibilidad de aplicar estos modelos en hongos va adquiriendo valor debido al reconocimiento de la importancia que los mismos tienen en el deterioro de los alimentos.

Las levaduras pueden presentar, según la especie de que se trate, un crecimiento por gemación, fisión, filamentosos, presencia de artroconidios, etc. La reproducción asexual de levaduras tiene alguna similitud con la bacteriana (fisión). Aún para las otras formas, la cinética de crecimiento en levaduras se ha podido adaptar a los modelos bacterianos. *Z. rouxii* presenta una reproducción de este tipo, lo que la hace susceptible a la aplicación de la metodología mencionada.

Z. rouxii es una levadura de alta incidencia en la industria de alimentos por su característica xerofílica y la posibilidad de contaminación de alimentos sobre todo de bajos pH y a_w .

Este trabajo plantea el conocimiento de *Z. rouxii* aislado LMFIQ 33 contaminante de productos alimenticios (curva de crecimiento en distintas condiciones) y el uso de métodos predictivos para la selección de sanitizantes en la industria alimenticia.

CAPITULO II

OBJETIVOS

II.1. Objetivos Generales

- ✓ Mejorar la calidad y seguridad alimentaria mediante la evaluación del comportamiento de *Zygosaccharomyces rouxii* aislado LMFIQ 33 contaminante de alimentos y el uso de modelos predictivos en la industria alimenticia.

II.2. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar la influencia de distintos factores sobre la curva de crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* (aislado LMFIQ 33).
- ✓ Aplicar distintos modelos predictivos y comparar su desempeño.
- ✓ Valorar la capacidad biocida de sanitizantes de uso habitual en la industria alimenticia sobre la cepa en estudio.
- ✓ Demostrar las ventajas y viabilidad de uso de modelos predictivos en la industria alimenticia, para el mejoramiento de la calidad y seguridad alimentaria.

CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Microorganismo

Se trabajó con *Zygosaccharomyces rouxii* (aislado LMFIQ 33) provisto por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe – Argentina). El aislado se obtuvo a partir de jugo de frutas. Luego del aislamiento, fue identificado y purificado según Pitt y Hocking 1997, y fue mantenido en crioviales con agar agua (agar al 0,2 %) a 2-4° C. La pureza del aislado se comprobó previamente a cada ensayo a realizar a través de observaciones macro y microscópicas identificando estructuras características del aislado en cuestión. En referencia a los aspectos macroscópicos se seleccionaron colonias que en el medio Ágar Extracto de Malta (AEM) medían entre 2 y 3 mm de diámetro luego de 7 días de incubación a 28°C, de color blanco, márgenes circulares, semiesféricas y superficie brillante (**Figura 1**). Al microscópico se observó la presencia de células helicoidales generalmente aisladas, de a pares o en pequeños grupos (Pitt y Hocking 1997) (**Figura 2**).

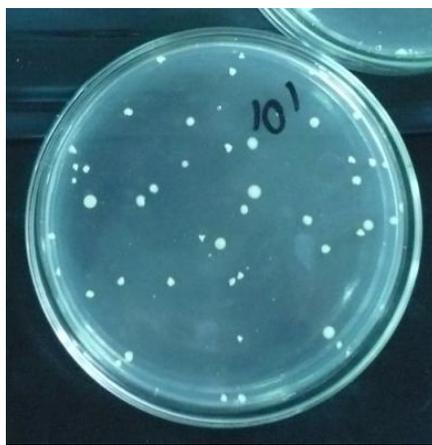


Figura 1: Características macroscópicas

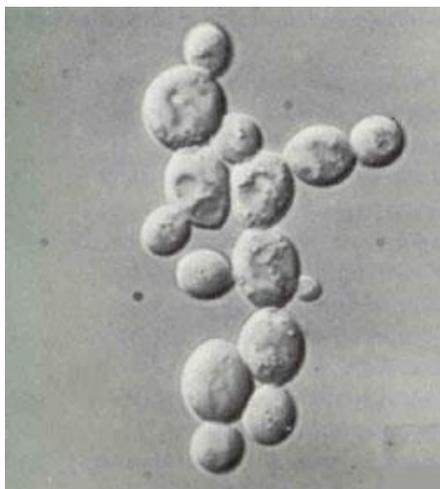


Figura 2: Características microscópicas

III.2. Condiciones y medios de cultivos para el desarrollo

Se utilizó el medio AEM como medio base para el desarrollo adicionado con Cloranfenicol (Loureiro 2000), para inhibir posibles crecimientos bacterianos, y el mismo medio pero sin agregado de ágar (Caldo Extracto de Malta –CEM-) en la determinación de la capacidad biocida. La preparación se realizó a partir de drogas y medios deshidratados. Para obtener 500 ml de dicho medio se utilizaron:

Extracto de malta Britania (10 g)

Peptona de carne Britania (0,5 g)

Ágar-ágar marca Britania (10 g)

Glucosa en polvo Cicarelli (10 g)

Cloranfenicol (Chloromycetin 500) (75 mg)

El medio preparado se autoclavó a 121°C por 15 minutos para obtener su esterilidad.

III.3. Determinación de curvas de crecimiento en distintas condiciones de temperatura y pH.

Para el estudio de la influencia de los factores elegidos y su significancia en la curva de crecimiento de la levadura, se utilizó un diseño factorial completo con bloques (Membré *et al* 1999). Los niveles de los factores evaluados fueron:

Temperatura: 23°C, 28°C y 33°C

pH: 3, 5 y 7

Los parámetros evaluados fueron:

- μ (velocidad de crecimiento expresado en horas⁻¹),
- λ (tiempo de latencia expresado en horas), y
- y_{\max} . (población microbiana máxima expresado en log₁₀ de los recuentos celulares)

III.3.1. Activación del aislado

Para lograr la activación del *Z. rouxii* conservado en agar agua, se procedió a repicar el mismo en un tubo con 10 ml de CEM preparado según lo indicado en el punto **III.2**. Se realizó la incubación durante un período de 48-72 horas para lograr dicho objetivo.

III.3.2. Determinación de la pureza

Se corroboró la pureza de la misma a través de observaciones macro y microscópicas según lo indicado en **III.1**.

III.3.3. Ensayo de crecimiento

III.3.3.1 Preparación de la suspensión celular

Para los ensayos de crecimiento se partió de una suspensión de 10⁶ células/ml. Esta densidad celular es la usada habitualmente para ensayar el comportamiento de poblaciones celulares (Block 1991). Se repicó la levadura en CEM y se incubó 2 días a 28°C (fase exponencial de crecimiento). Para la obtención de la concentración celular requerida se realizaron recuentos en placa y lecturas de absorbancia en paralelo a 530 nm (Evans *et al.* 2004, Perni *et al.* 2005) usando un espectrofotómetro Shimadzu 4300. De este modo se partió de una concentración de células estándar en los ensayos posteriores a través de la medición de la absorbancia, ajustando la misma a 0,700 D.O.. Posteriormente, en cada uno de los ensayos, se determinó de manera práctica la concentración inicial por medio de un recuento en placa (Block 1991) en

AEM y usando diluciones decimales con agua de peptona al 0,1 % p/v como diluyente (Basílico y Basílico, 1999), incubando las placas durante 5 días a 28°C. (Douey y Wilson 2004).

III.3.3.2 Siembra e incubación

Se prepararon erlenmeyers de 100 ml con CEM a los cuales se les reguló el pH. Los distintos niveles de pH se obtuvieron por agregado de NaOH ó HCl 0,1 M al medio de cultivo original (Praphailong y Fleet, 1997; Vermeulen y col, 2008), usando un peachímetro Hanna 9210. Dichos medios fueron posteriormente esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos. Previo a cada ensayo se realizaron controles de pH, midiendo este parámetro en erlenmeyers elegidos de manera aleatoria.

En el ensayo de crecimiento, cada erlenmeyer conteniendo 50 ml de CEM fue sembrado con 0,1 ml del inóculo estándar preparado previamente según lo indicado en III.3.3.1 e incubado a las temperaturas correspondientes (según diseño) durante un período de cuatro (4) días (**Figura 4**).

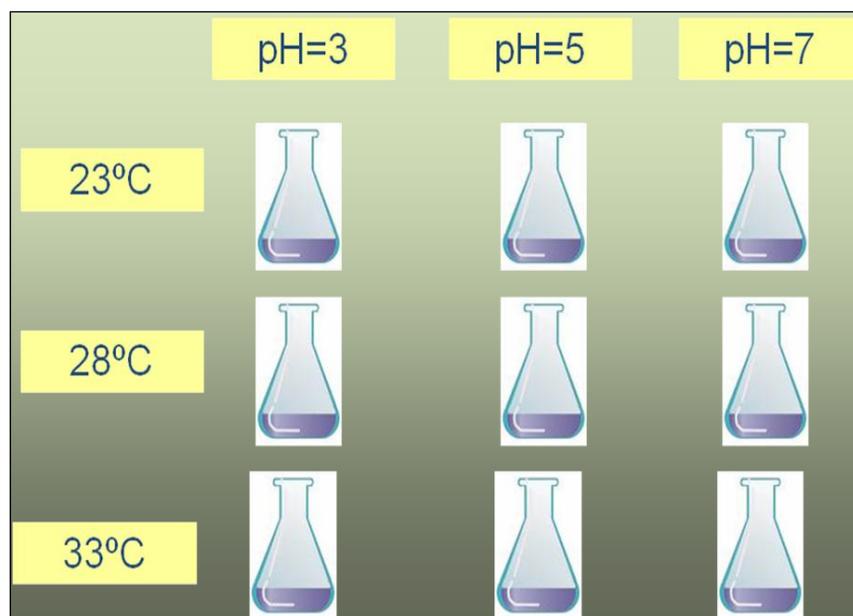


Figura 3: Esquema utilizado para evaluar la influencia de los factores pH y temperatura

III.3.3.3 Control de crecimiento por el método de recuento en placa

Se realizaron en cada uno de los erlenmeyers, recuentos en placa a fin de obtener la concentración celular a distintos tiempos durante el transcurso del ensayo. Para esto se extrajo de forma estéril una mínima porción del caldo cultivado, previamente homogeneizado, de cada una de las unidades de análisis y se le realizaron diluciones decimales en agua peptonada al 0,1 %. El cultivo se realizó en placas de Petri esterilizadas previamente por calor seco durante 2 horas a 160°C. A dicho inóculo se le adicionó entre 12 y 15 ml de AEM estéril a una temperatura entre 40°C y 50°C a fin de no dañar las levaduras. Una vez solidificado el agar, se incubaron las placas a 28°C durante 48-72 horas. Transcurrido este lapso de tiempo se procedió al recuento de las UFC, seleccionando las placas que contaban con un número de colonias entre 30 y 300. El método de recuento de células viables fue elegido por sobre el de medición de absorbancia debido a que otorgan valores distintos de los parámetros de crecimiento al aplicar los modelos matemáticos propuestos (Dalgaard y col, 1994; Begot y col, 1996; Dalgaard y Koutsoumanis, 2001).

III.3.3.4 Registro de resultados

Los datos obtenidos de los recuentos en UFC/ml fueron ingresados en una planilla Excel en donde se obtuvieron los logaritmos correspondientes para la realización de las curvas de crecimiento.

III.3.4. Evaluación de los datos en DMFit

Los logaritmos de los recuentos obtenidos fueron analizados a través de soft de uso gratuito DMFit (DM: Modelos Dinámicos) basado en Baranyi, J. & Roberts, T.UN. (1994): A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J. Food Microbiol. 23. 277-294 (www.ifr.ac.uk/safety/dmfit). Este soft presenta la ventaja de poder ser usado como una aplicación de Excel y ser corrido con Windows 98 y Excel 97 o versiones más actuales. Produce la adaptación de las curvas cuando una fase lineal es precedida y seguida por fases estacionarias. Pretende calcular la

evolución más probable del crecimiento del microorganismo, siguiendo la curva más frecuente, es decir, una sigmoidea (forma de s) y es un sistema empleado para el cálculo de las variaciones de tiempo necesarias para que un microorganismo se duplique. Utiliza un modelo primario que toma como base la Ecuación de Gompertz modificada:

$$y = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_m e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

y la mejora y perfecciona a través de la evaluación de la incertidumbre de medición y estabilizando la estimación de la velocidad de crecimiento.

El modelo es el propuesto por Baranyi, 1997:

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{(y_{\max} - y_0)}} \right)$$

donde

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln(e^{-\mu_{\max} t} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{\max} t - h_0})$$

Agrega también un parámetro de importancia para mejorar las estimaciones que es el “estado fisiológico inicial” del microorganismo en estudio (α_0), donde:

$$\alpha_0 = e^{-h_0} \quad \text{y} \quad \lambda = h_0 / \mu_{\max},$$

lo cual tiende a corregir la variabilidad natural de las células de un cultivo determinado (ej: no todas las células se encuentran en fase logarítmica, sino que al mismo tiempo podemos tener algunas en fase de latencia y otras en fase estacionaria). Esto hace que la predicción y la validez del modelo sean mayores. DMFit posee otra ventaja adicional que es el cálculo automático de errores.

Ingresa entonces, todos los datos obtenidos de los ensayos realizados, se obtuvieron los parámetros μ (velocidad de crecimiento), λ (tiempo de latencia), y y_{\max} . (población microbiana máxima) con sus respectivos errores, de las curvas de crecimiento en distintas condiciones. Un ejemplo se muestra en el **Gráfico 1**.

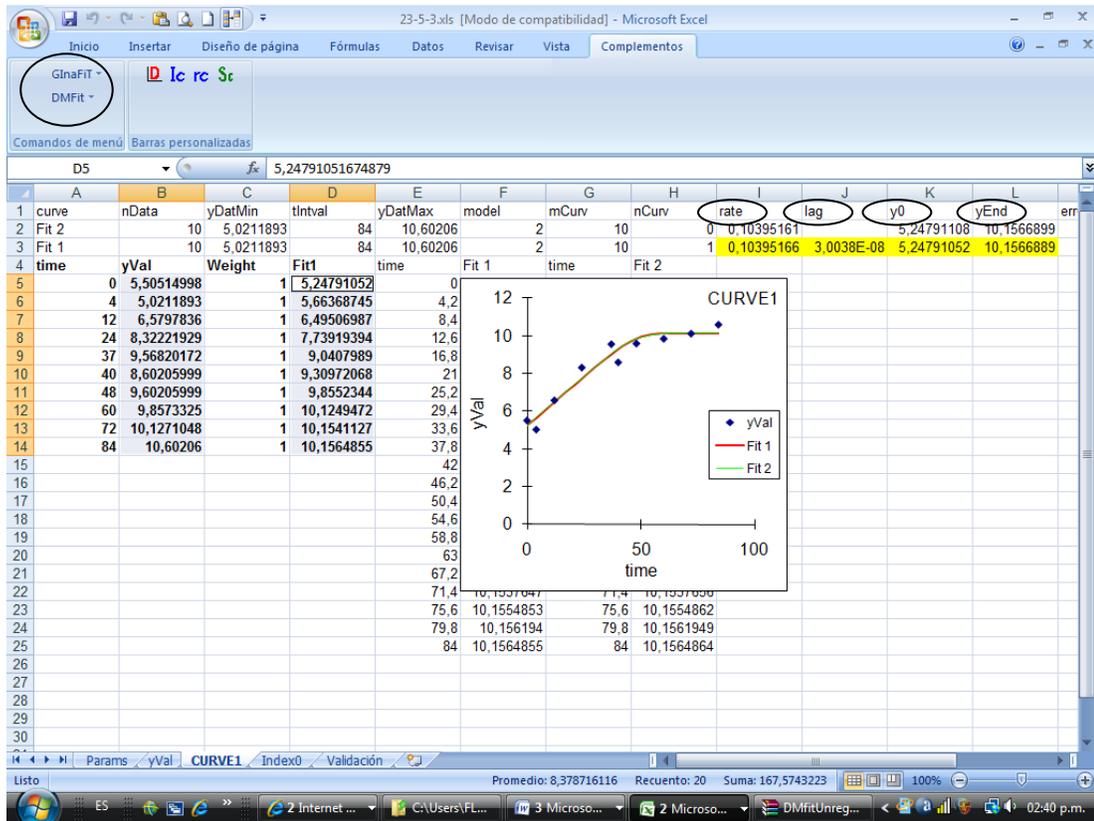


Gráfico 1: Curva de crecimiento corrida con DMFit.

El soft produce la detección de la fase de latencia y su posterior transformación en fase de crecimiento logarítmico a través de lo que denomina **n curve**. Cuando la fase de latencia es muy corta, el **n curve** es cero (0). Al obligar al sistema a generar una curva de crecimiento tradicional y reemplazando el **n curve = 0** por **n curve = 1**, el sistema muestra un error (Err 3), lo que facilita la interpretación de la presencia o no de la fase lag.

A partir de los datos obtenidos se realizó una validación interna a fin de corroborar el ajuste de las curvas obtenidas mediante el cálculo del BIAS y la Precisión. Ambos valores son importantes ya que el primero es el sesgo mientras que la precisión relaciona los valores observados con los predichos. El valor “ideal” para ambos es 1 y cuanto más lejos de este valor se encuentre el cálculo, menor será el ajuste que tendrá la curva.

III.3.5. Evaluación estadística

Se usó el paquete STATGRAPHICS Centurion XV para la evaluación estadística

III.4. Determinación de curvas de muerte frente a distintos principios activos

III.4.1 Hipoclorito de sodio

Pertenece al grupo de productos con liberación de cloro, y es uno de los más usados del grupo junto con los compuestos N-cloro. La estabilidad del cloro libre disponible depende de numerosos factores. La presencia de materia orgánica inactivará al ácido hipocloroso y rápidamente puede reducir la cantidad de cloro disponible. El cloro que se combina con la materia orgánica ya no es más activo contra los patógenos. También es afectado por la luz. Tiene un amplio espectro de acción.

Las formas principales de cloro usados incluyen hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$), y cloro gaseoso (Cl_2). Cuando el hipoclorito de sodio es adicionado al agua, forman hidróxido de sodio (NaOH) y ácido hipocloroso (HClO). Las tres formas de cloro producen ácido hipocloroso (también llamado cloro disponible o cloro activo). El ácido hipocloroso es el que mata a los patógenos. En soluciones de pH alto, la mayor parte del ácido hipocloroso se disocia a la forma de ión hipoclorito (ClO^-), el cual no es un efectivo sanitizante (**Figura 4**).

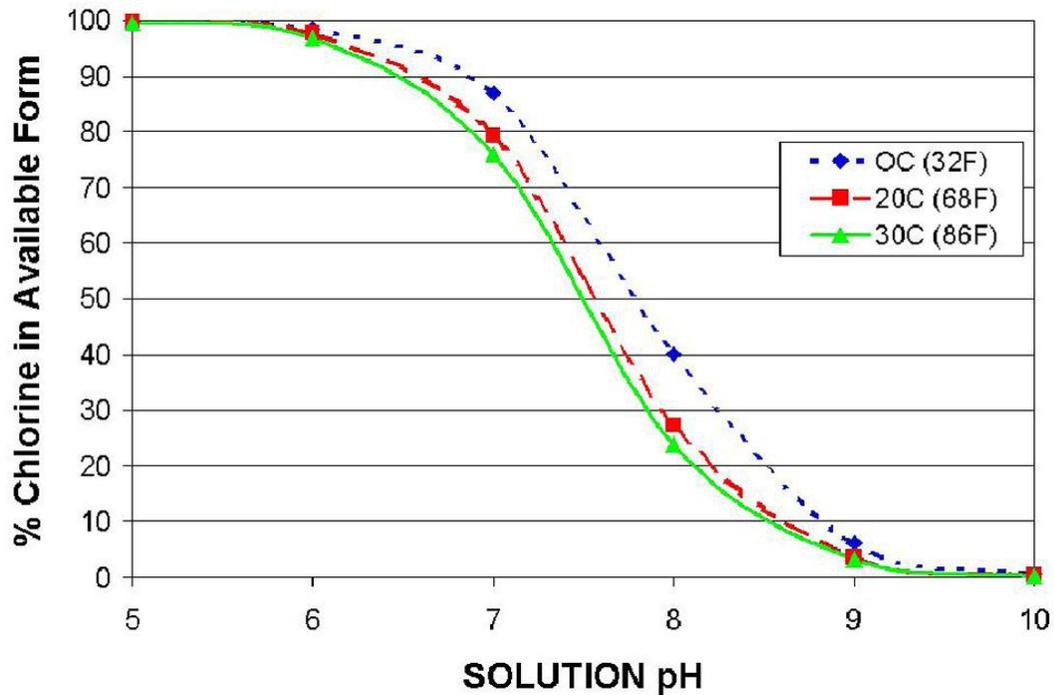


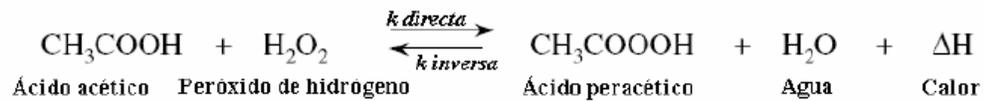
Figura 4: Porcentaje de cloro disponible (%) a diferentes pHs y temperaturas del agua. (Ritenour y col 2007)

Altas concentraciones de cloro disponible matan a los patógenos en tiempos cortos de exposición (< 1 min.).

Para los ensayos se usó hipoclorito de sodio de una marca comercial en una concentración de 100 g/L (100.000 ppm), que se diluyó convenientemente según lo indicado en **III.4.3**.

III.4.2 Ácido peracético

No existe comercialmente como producto puro. Lo que se conoce con este nombre son mezclas en equilibrio conteniendo ácido peracético, ácido acético, peróxido de hidrógeno y agua en proporciones variables según las cantidades predeterminadas de ácido acético y peróxido de hidrógeno que se utilizan como reacción inicial en el proceso de fabricación.



$$K_{eq} = \frac{[\text{PAA}] [\text{H}_2\text{O}]}{[\text{HOAc}] [\text{H}_2\text{O}_2]}$$

<u>PKa:</u>	
PAA	8,2
HOAc	4,7

Una de las ventajas de este producto es que, por requerir bajas concentraciones su costo es moderado. Además, no mancha y si se almacena concentrado resulta estable durante largo tiempo (S.E.N.A.S.A., 2006). Se lo recomienda para superficies en contacto con alimentos. Una propiedad inherente al APA es su lenta liberación de oxígeno, producto de su descomposición, en el transcurso del tiempo. No obstante esto, puede liberar más de 100 veces su volumen en gas durante una descomposición rápida (causada, p. ej., por contaminación).

Para mantener la calidad del producto, se recomienda almacenarlo por debajo de 30°C. La tasa de descomposición del APA se duplica por cada 10°C de aumento de la temperatura.

Las concentraciones más utilizadas son 5, 12 y 15%.

Varios trabajos reportan su eficacia desinfectante frente a bacterias, tanto in vitro como sobre los productos sin embargo, existen pocos estudios en relación a su acción antifúngica (Kyanko y col 2010).

Para los ensayos se usó ácido peracético de una marca comercial en una concentración al 15 % (150.000 ppm) y se diluyó convenientemente según lo indicado en **III.4.3**.

III.4.3 Evaluación de la concentración del sanitizante a ensayar

Debido a la importancia de la microbiología clínica, donde se hizo hincapié en agentes patógenos y/o que pueden producir riesgos a la salud, el interés por la micología fue siempre menor al brindado a la bacteriología y virología. Es tal vez por este motivo, que en la mayoría de los casos los test utilizados para evaluar el

comportamiento de desinfectantes sobre hongos son adaptaciones de los bacteriológicos (Russel y col. 1992). Se utilizó el Test de Suspensión, el cual se fundamenta en la acción que produce 9,9 ml de una determinada dilución de sanitizante ensayado, sobre 0,1 ml de una suspensión estandarizada de células del microorganismo en fase de crecimiento exponencial (Russel y col. 1992).

La preparación de *Z. rouxii* se realizó según lo indicado en **III.3.3** y 0,1 ml de esta suspensión fue utilizada para ensayar los distintos sanitizantes y tiempos. Luego de cumplido el tiempo de acción seleccionado se dispensó 1 ml de la mezcla microorganismo/sanitizante en una placa de Petri estéril. Posteriormente se inactivó a través del agregado de MEA tibio (**Figura 5**). Una vez realizada la agitación correspondiente de la placa y solidificado el medio, se incubaron las mismas durante 48 hs. a la temperatura óptima, seleccionada según los ensayos de crecimiento. Luego del tiempo de incubación, se realizaron los recuentos en las placas que tuvieron crecimiento, evaluando así la actividad del sanitizante en la dilución ensayada.



Figura 5: Inactivación del sanitizante mediante el agregado de agar MEA tibio.

A fin de seleccionar las concentraciones a evaluar, se realizó un ensayo de inhibición inicial con varias concentraciones de cada principio activo y en base a este ensayo se eligieron las tres (3) concentraciones a evaluar para cada uno. Las diluciones del producto se realizaron con agua destilada estéril.

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un diseño en bloques completo con arreglo factorial 2x4x3 según el siguiente detalle:

Factores:

- Principios activos: Hipoclorito de sodio y Ácido peracético.
- Concentración del principio activo: cuatro niveles a evaluar más nivel cero (control).
- Tiempo de contacto: 1, 3, 5, 7, 9 y 11 minutos

Se realizaron recuentos en placa a los tiempos planificados para determinar la capacidad de inactivación/muerte de cada producto y de cada concentración evaluada.

Los datos obtenidos se ingresaron en el soft de uso gratuito GlnaFit (www.cit.kuleuven.be/biotec/index.htm). De esta manera se obtuvieron las curvas de inhibición a distintas concentraciones de los sanitizantes. Se evaluaron las distintas ecuaciones seleccionando las que tenían un mejor ajuste.

En la **Figura 6** se observan las opciones de ecuaciones que despliega el programa para la realización de las curvas. También se puede observar que una vez realizado el cálculo y la gráfica para la ecuación seleccionada, el sistema arroja valores inherentes a los parámetros de muerte, junto con datos estadísticos y la ecuación utilizada para la realización de todos los cálculos.

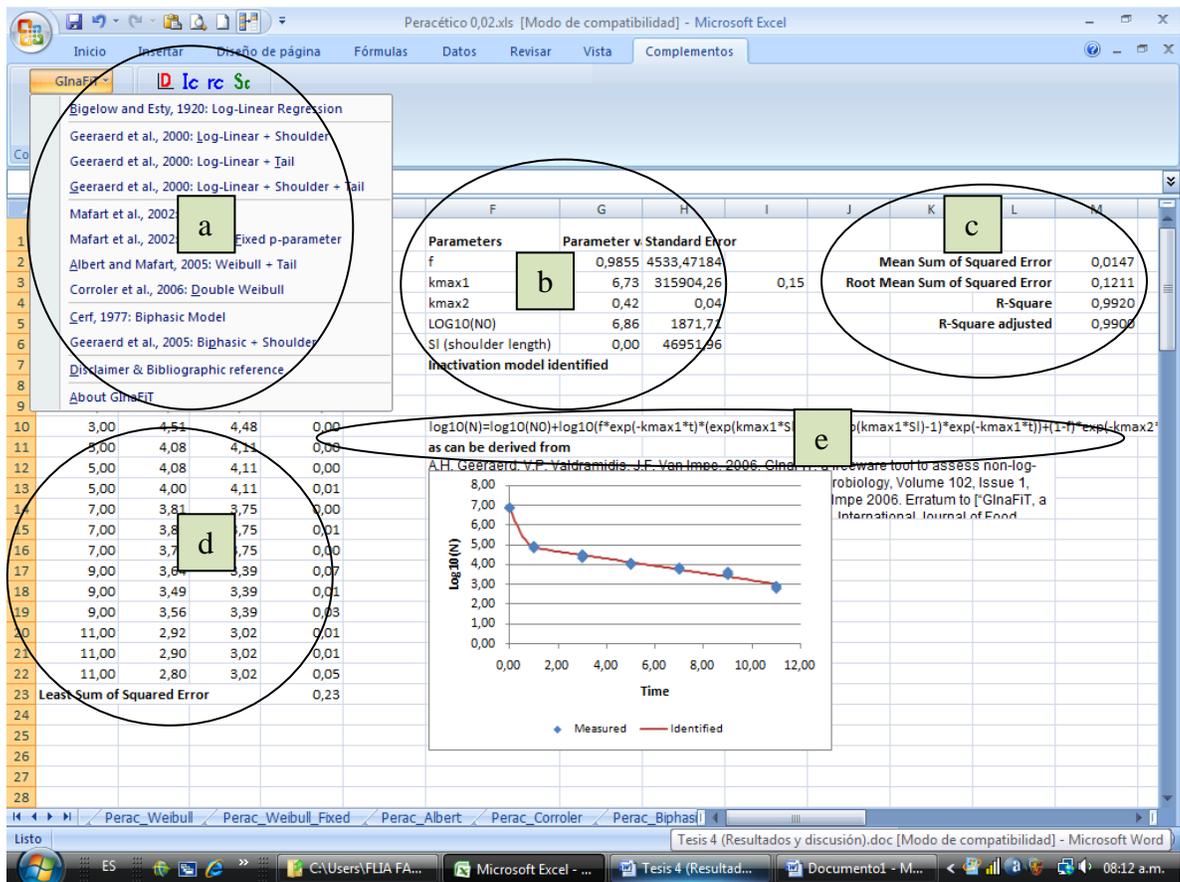


Figura 6: Curva de muerte obtenida a partir del uso del soft GInaFIT. a) Tipo de ecuaciones disponibles para el cálculo, b) Parámetros de la curva obtenidos con sus errores estándar, c) Parámetros estadísticos obtenidos, d) Datos de la predicción, e) Ecuación utilizada para la predicción

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Determinación de curvas de crecimiento en distintas condiciones

Los ensayos de crecimiento se realizaron por triplicado, realizándose recuentos en placa a los siguientes tiempos: 0, 4, 12, 24, 32, 37, 40, 48, 60, 72, 84 y 88 horas a fin de determinar la cantidad de células viables que estaban presentes en los mismos. Las gráficas para cada una de las curvas se pueden ver en el **ANEXO A: Gráficas de crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* (AISLADO LMFIQ 33) en función de la Temperatura y el pH.**

Los promedios de cada una de estas experiencias fueron procesados por el Soft DMFit con el Modelo Primario de Baranyi (Baranyi y Roberts 1994), para el cálculo de los siguientes parámetros: Tasa de crecimiento (μ), Fase de latencia (lag (λ)) y Número de células viables máximo ($y_{\text{máx.}}$). Membre y col en 1999 ya mencionaba la preferencia en la aplicación de este modelo respecto de la Ecuación de Gompertz, que era ampliamente usada, pero que sobreestimaba de manera sistemática las tasas de crecimientos de los microorganismos. Conclusiones similares han sido obtenidas por Perni y col., 2005. Sin embargo, Cayré y col, 2007 no encontraron diferencias entre los dos modelos trabajando con bacterias lácticas.

La ecuación utilizada para el cálculo es:

$$y(t) = y_0 + \mu_{\text{max}} A(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{\text{max}} A(t)} - 1}{e^{(y_{\text{máx.}} - y_0)}}\right) \quad \text{donde:}$$

$y(t)$: Población microbiana a tiempo (t)	λ : Fase de latencia (lag)
y_0 : Población microbiana inicial	μ_{max} : Velocidad máxima de crecimiento
$y_{\text{máx.}}$: Población microbiana final	$A(t)$: Función de ajuste que tiene en cuenta el estado fisiológico inicial

Si bien para el uso del Soft DMFit es necesaria una capacitación, sobre todo para la confección de la curva y evaluación de los resultados, el programa es

amigable y no requiere de una especialización mayor. A esto se suma la comodidad del uso de un software ampliamente utilizado como es el Excel. La obtención del programa es gratuita y sumamente sencilla a partir del envío de una clave vía mail, su instalación no genera necesidades de programas especiales ni de gran espacio. Por otra parte y como se dijo anteriormente, la ecuación de Baranyi utilizada por el soft ha sido ampliamente aceptada para el uso en confección de curvas de crecimiento (Gibson y Hocking, 1997; Baranyi y Roberts, 2004; Perni y col, 2005; Yaghlene y col, 2009). Esto redundará en beneficios para la micología que está retrasada con respecto al estudio de las bacterias, y más aún en el caso de las levaduras, que por sus características de crecimiento semejante a las bacterias, pueden usar modelos similares al de Baranyi, facilitando la comprensión de sus parámetros de crecimiento.

No obstante esto, las conclusiones obtenidas deben realizarse con cuidado porque deben ser fruto del análisis de todas las condiciones que se ponen en juego (tipo de microorganismo, condiciones ambientales, tipo de alimento, etc), las cuales interactúan de manera compleja (Evans y col, 2004; Havelaar y col, 2010).

De los ensayos mencionados se obtuvieron como resultado nueve (9) curvas de crecimiento las cuales se muestran en la **Figura 7**. Se realizó la validación interna de cada una de las curvas obteniendo valores de R^2 , Bias y Precisión a fin de corroborar la consistencia de las mismas.

Se puede observar que, si bien en general siguen un patrón de crecimiento sigmoideal (Zwietering y col, 1990; Perni y col, 2005), se comportan de manera diferente con la variación tanto del pH como de la temperatura. Estos dos parámetros junto con el a_w , son considerados clave en el crecimiento de los microorganismos en general y de *Z. rouxii* en particular (Jansen y col, 2003).

Es notable la reducción o el aplastamiento de las curvas a 33°C, con valores reducidos de recuentos celulares finales (Log N), demostrando la dificultad que tiene *Zygosaccharomyces rouxii* (AISLADO LMFIQ 33) para desarrollarse normalmente a esa temperatura. Esta dificultad de desarrollo a 33°C concuerda con lo evaluado por Martorell y col en 2007, quienes determinaron el efecto de la temperatura sobre dos aislados de *Z. rouxii*, obteniendo una inhibición del crecimiento a 37°C.

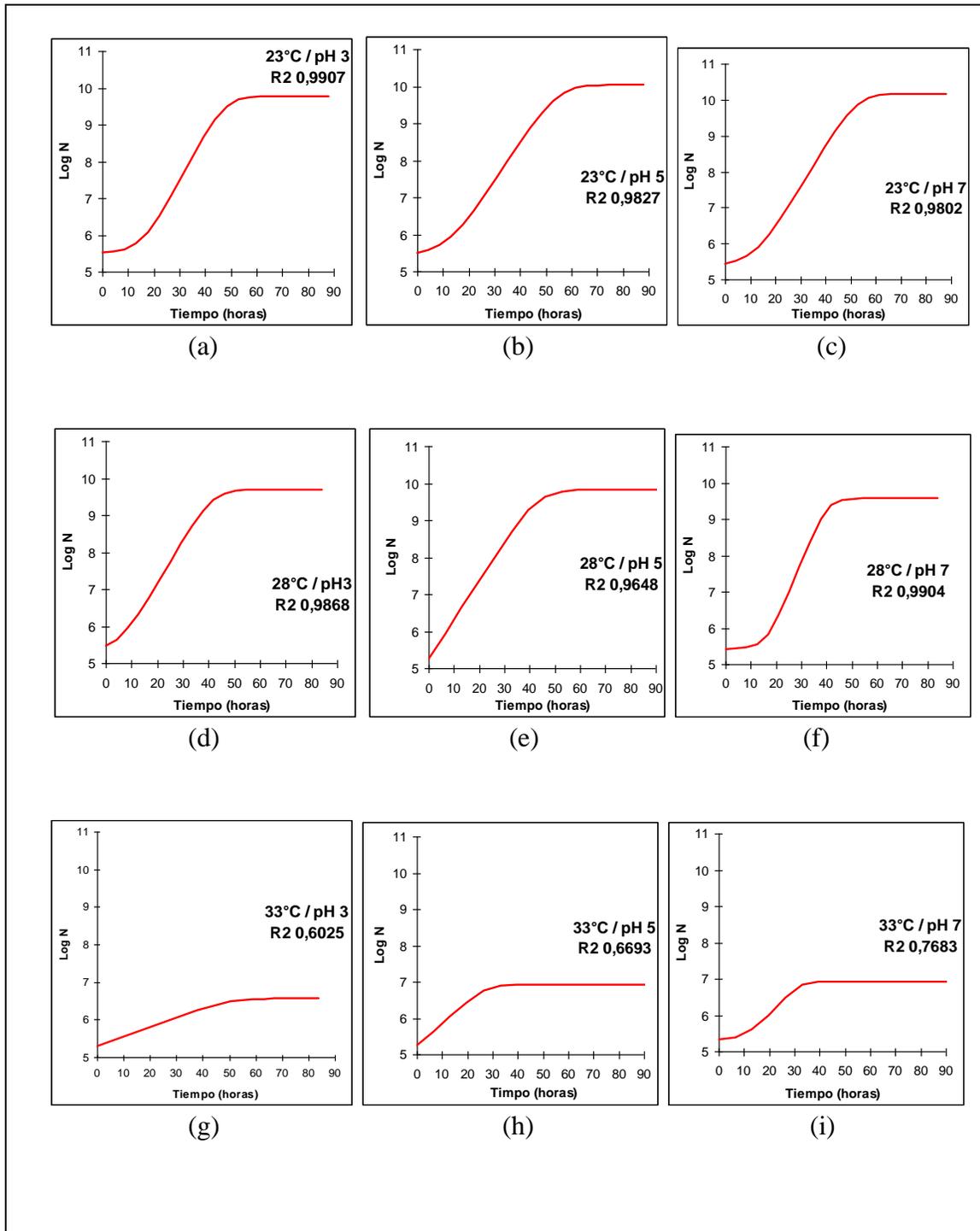


Figura 7: Curvas de crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* (AISLADO LMFIQ 33) en función de la Temperatura y el pH, procesadas con DMFit. (a) 23°C/pH=3; (b) 23°C/pH=5; (c) 23°C/pH=7; (d) 28°C/pH=3; (e) 28°C/pH=5; (f) 28°C/pH=7; (g) 33°C/pH=3; (h) 33°C/pH=5; (i) 33°C/pH=7.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las curvas (e), (g) y (h), se observa la casi desaparición de la fase de latencia, hecho descrito por Membre y col, 1999. A 28°C la rápida multiplicación celular hace que el crecimiento comience casi sin tiempo de adaptación, mientras que a 33°C, el proceso de adaptación se solapa con el de crecimiento debido a la lentitud con que se multiplica la levadura. Por otro lado, se observa un estiramiento de la fase lag en las curvas (a), (f) e (i), indicando un retraso en el inicio de la fase logarítmica de crecimiento, probablemente debido a cambios en el patrón genómico que provocan la síntesis de proteínas celulares complementarias que le otorgan características más estables a la célula como lo mencionaran también Brul y col en 2008.

En el caso del parámetro Tasa de Crecimiento (μ), no se observan grandes variaciones a las temperaturas 23°C y 28°C, reduciéndose notablemente a 33°C.

Pitt y Hocking en 1997 habían reportado crecimiento de *Z. rouxii* en el rango de pH que va de 1,8 a 8,0 en un medio con 46 % de glucosa, mientras que Martorell y col, 2007, determinaron una tolerancia de *Z. rouxii* a pHs de hasta 2,2 y Praphailong y Fleet, 1997 no obtuvieron crecimiento de esta especie a pH 8. En concordancia con estos trabajos se observa que el rango de pH a los cuales la levadura puede crecer es amplio, no afectando mayormente los valores de tasa de crecimiento y recuentos totales.

En el **Gráfico 1** se puede observar la combinación de las 9 curvas de crecimiento obtenidas. El mismo muestra una disminución en el desarrollo de las levaduras incubadas a una temperatura de 33°C. Tal como se demostrara en la evaluación estadística, las curvas a 23°C y 28°C poseen un comportamiento similar, con valores de logaritmos de recuentos máximos entre 9 y 10 y algunas variaciones en la fase lag y tasa de crecimiento, pero no tan notorias como sucede a 33°C.

En analogía con lo expresado por Baranyi y Roberts 2004, se puede ver que el factor ambiental más determinante en el crecimiento de un microorganismo es la temperatura, siguiendo por el pH y la actividad de agua (a_w) y luego la presencia de conservantes, antimicrobianos y la composición de la atmósfera.

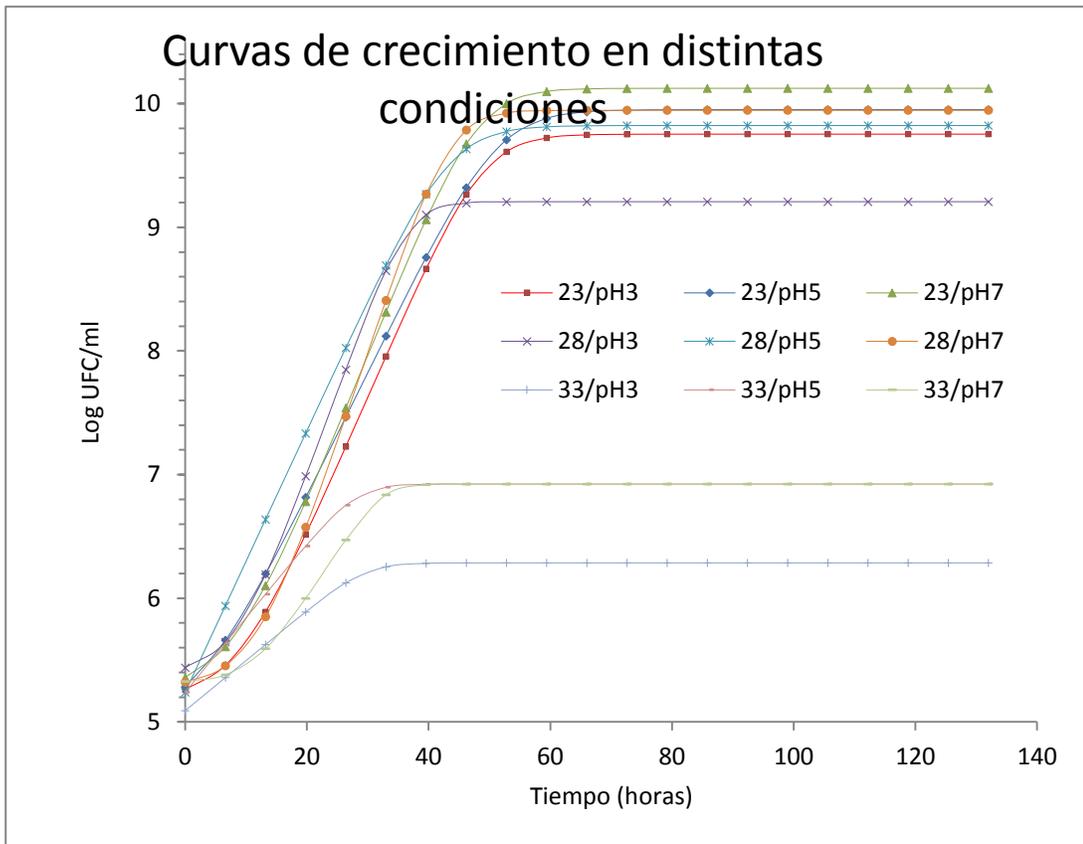


Gráfico 1: Curvas de crecimiento en distintas condiciones corridas con DMFit

Los parámetros de crecimiento que se obtuvieron se muestran junto con los de validación en la **Tabla 3**

T°	pH	Tasa (μ) (hs^{-1})	lag (λ) (hs)	$y_{m\acute{a}x.}$ (Log UFC/ml)	R^2	Bias	Precisi3n
23	3	0,1280	14,8420	9,7720	0,9908	1,0001	1,0157
	5	0,1056	11,6883	10,0380	0,9827	0,9999	1,0156
	7	0,1174	12,0934	10,1704	0,9802	0,9997	1,0227
28	3	0,1181	5,8662	9,6833	0,9868	0,9998	1,0164
	5	0,1058	2,91E-05	9,8227	0,9609	0,9993	1,0330
	7	0,1690	15,9748	9,5635	0,9905	0,9999	1,0162
33	3	0,0253	Np	6,5624	0,6025	0,9948	1,0515
	5	0,0601	Np	6,9249	0,6693	0,9986	1,0458
	7	0,0753	11,1350	6,9234	0,7683	0,9990	1,0372

Tabla 3: Parámetros de crecimiento y validación de las curvas realizadas con DMFit a diferentes temperaturas (23, 28 y 33°C) y pH (3, 5 y 7). (Np) No posee.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encuentran los valores más bajos de tasa de crecimiento a 33°C, con un valor mínimo a pH=3 (0,0253 hs⁻¹). El valor máximo observado para este parámetro es a 28°C y pH=7 (0,1690 hs⁻¹), mientras que el resto de los valores a 28°C y a 23°C para todos los pH ensayados se encuentran entre 0,10 hs⁻¹ y 0,13 hs⁻¹.

Con respecto a la fase lag (λ), a 23°C se obtuvo un promedio de 12,9 hs, sin mayores variaciones a los distintos pH. Lo contrario sucede a 28°C, donde la influencia del pH es notoria con un valor mínimo a pH=5 donde esta fase prácticamente desaparece, haciendo que el crecimiento sea casi instantáneo. Sin embargo a pH=7, el elevado valor de tasa de crecimiento se ve contrarrestado por el alargamiento de la fase de latencia, que es el más largo encontrado dentro de todas las variables ensayadas. A pH=3 se observa la aparición de la fase lag, no obstante con un valor mucho más bajo que los obtenidos a 23°C. A 33°C, y tal como se observa en las gráficas de desarrollo, esta fase desaparece al trabajar a pHs 3 y 5, debido a las críticas condiciones de desarrollo a esta temperatura que produce tasas de crecimiento extremadamente bajas.

Analizando el crecimiento máximo obtenido para cada par de variables, se notan valores similares para 23°C y 28°C a los distintos pH. Los Log N a dichas temperaturas van de 9,56 a 10,17. El crecimiento cae notoriamente a 33°C, observándose valores cercanos a 7, con un mínimo de 6,56 a pH=3 y un máximo de 6,92 a pHs 5 y 7.

Del análisis de los valores de validación obtenidos, se observa que tanto los valores de Bias como de Precisión muestran que no existen desvíos importantes entre los valores observados y los predichos. Los mismos se encuentran entre el 1 % y 5%. A su vez los R² presentan en general, valores cercanos a 0,9, indicando un buen ajuste en las curvas. No ocurre lo mismo a 33°C, donde existe mayor dispersión de valores obteniéndose R² bajos dificultando la obtención de curvas ajustadas.

Los ensayos realizados sobre *Zygosaccharomyces rouxii* (AISLADO LMFIQ 33) demuestran que existe una importante influencia tanto del pH como de la temperatura. Estas variables afectan a todos los parámetros analizados, modificando así las curvas de crecimiento del microorganismo.

IV.1.1 Evaluación estadística:

Para analizar el comportamiento de los parámetros de crecimiento se realizó un ANOVA simple usando STATGRAPHICS Centurion XV. Se partió de los parámetros de crecimiento obtenidos de cada ensayo. Los factores analizados fueron pH y Temperatura sobre cada parámetro (μ , lag e $y_{m\acute{a}x}$).

Inicialmente se comprobó la homogeneidad de varianza para cada uno de los tratamientos. Se utilizó la Prueba de Rangos Múltiples al 95 % con el Método LSD (Mínima Diferencia Significativa).

El análisis de los resultados se presenta en las **Tablas 4 y 5**. Los análisis estadísticos obtenidos se detallan en el **Anexo B: ANOVA** para parámetros de curvas de crecimiento.

En la **Tabla 4** se observa que no se encuentran diferencias significativas en las tasas de crecimiento entre los pH ensayados, lo cual concuerda con Jansen y col, 2003; no obstante la tasa es considerablemente menor a una temperatura de 33°C, no encontrándose diferencias entre las temperaturas 23°C y 28°C .

El ANOVA muestra con un nivel de confianza del 95% que la temperatura tiene una clara influencia en la tasa de crecimiento ($p < 0,5$). No se observa interacción entre los dos factores.

Con respecto a la fase lag, se observa tanto la influencia del pH como de la temperatura sobre este parámetro ($p < 0,5$ con el 95% de confianza). Existe un aumento estadísticamente significativo de la fase lag a pH 7 y lo mismo ocurre a una temperatura de incubación de 23°C. No se observa interacción entre los dos factores. Es evidente el estiramiento de la fase lag a bajas temperaturas (23°C), mientras que dicha fase prácticamente no se detecta a 33°C, pero esto se debe a la reducción general del crecimiento que se nota a esta temperatura.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4

	pH	Tasa (μ) (hs^{-1})		lag (λ) (hs)		$y_{max.}$ (Log UFC/ml)	
		Media	Grupos	Media	Grupos	Media	Grupos
23°C	3	0,1342	a	14,8742	a	9,7103	a
	5	0,1179	a	13,6755	a	9,8340	a
	7	0,1379	a	14,1060	a	10,0242	a
28°C	3	0,1125	a	4,8057	a	9,6577	a
	5	0,1146	ab	0,0000	b	9,8798	a
	7	0,1659	b	15,6072	c	9,6483	a
33°C	3	0,0309	a	0,0000	a	6,6058	a
	5	0,0571	a	#	#	6,9195	a
	7	0,0584	a	12,4555	b	7,3365	a

Tabla 5

	T (°C)	Tasa (μ) (hs^{-1})		lag (λ) (hs)		$y_{max.}$ (UFC/ml)	
		Media	Grupos	Media	Grupos	Media	Grupos
pH=3	23	0,1342	a	14,8742	a	9,7103	a
	28	0,1125	a	4,8057	b	9,6577	a
	33	0,0309	b	0,0000	c	6,6058	b
pH=5	23	0,1179	a	13,6755	a	9,8340	a
	28	0,1146	a	0,0000	b	9,8798	a
	33	0,0034	b	#	#	6,9195	b
pH=7	23	0,1379	a	14,1060	a	10,0242	a
	28	0,1659	a	15,6072	a	9,6483	a
	33	0,0571	b	12,4555	a	7,3365	b

Tabla 4: Parámetros (μ), (lag) y ($y_{m\acute{a}x.}$). Temperatura en funci3n del pH. Medias y diferencias grupales obtenidas en el an\`alisis con STATGRAPHICS Centuri3n XV.

Tabla 5: Parámetros (μ), (lag) y ($y_{m\acute{a}x.}$). pH en funci3n de la Temperatura. Medias y diferencias grupales obtenidas en el an\`alisis con STATGRAPHICS Centuri3n XV.

No se observan variaciones en el crecimiento m\`aximo encontrado con las modificaciones de pH, en concordancia con El Halouat y Debevere, 1996; aunque se

obtuvieron valores más elevados que dichos autores, lo que puede deberse, tal como ellos mismos mencionan en el trabajo, a diferencias en las condiciones experimentales, medios de cultivos usados, así como también a variaciones genéticas de las especies. No obstante, los valores máximos obtenidos fueron mayores a 1×10^8 UFC/ml, al igual que Membré y col, 1999. La evaluación estadística muestra una disminución significativa en la cantidad de células viables finales a 33°C, indicando la comprobada influencia de la temperatura sobre este parámetro. No existe interacción entre factores.

IV.1.2: Selección de las condiciones óptimas de crecimiento

De la evaluación de los resultados obtenidos, se observa una coincidencia con los distintos autores en los parámetros óptimos de crecimiento.

A una temperatura de 33°C los parámetros de crecimiento son desfavorables. Si bien la tasa de crecimiento es similar para 23°C y 28°C, a la temperatura menor se produce un incremento en la fase lag, retardando el comienzo de la fase de crecimiento exponencial, lo mismo sucede a 28°C y pH=7.

En base a estos criterios, se determinó que las condiciones óptimas de crecimiento son pH=5 y T= 28°C.

IV.2. Determinación de curvas de muerte frente a distintos sanitizantes

De los sanitizantes de uso habitual en la industria alimenticia se seleccionaron dos:

- Hipoclorito de sodio comercial de concentración 100 g/L (100.000 ppm).
- Ácido peracético comercial de concentración 15% (150.000 ppm)

IV.2.1 Screening inicial

A fin de determinar las concentraciones y tiempos de trabajo de cada uno de los sanitizantes, se realizó un ensayo inicial a manera de screening, evaluando el crecimiento/no crecimiento de la levadura posteriormente al tratamiento. Se

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

evaluaron 8 concentraciones y dos tiempos de acción utilizando el Test de Suspensión según lo expresado en el punto *III.4.3*.

Las concentraciones, tiempos y resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 6**.

Tiempo Concent.	Hipoclorito de sodio		Ácido Peracético	
	1 minuto	2 minutos	1 minuto	2 minutos
10000 ppm	(-)	(-)	(-)	(-)
5000 ppm	(-)	(-)	(-)	(-)
2000 ppm	(-)	(-)	(-)	(-)
1500 ppm	(-)	(-)	(-)	(-)
1000 ppm	(-)	(-)	(+)	(-)
500 ppm	(+)	(+)	(+)	(+)
100 ppm	(+)	(+)	(+)	(+)
20 ppm	(+)	(+)	(+)	(+)

Tabla 6: Resultados del screening crece/no crece para los distintos tratamientos.

No se observa crecimiento: (-) Se observa crecimiento: (+)

De los resultados del ensayo se puede observar que en las concentraciones más elevadas de los sanitizantes (entre 10.000 y 1.500 mg/L), no existe crecimiento de la levadura, por lo que la acción del sanitizante es efectiva en esas concentraciones tanto a 60 como 120 segundos.

En contraposición con esto, en concentraciones bajas del producto (de 20 a 500 mg/L), se observa desarrollo de la levadura posterior al tratamiento, indicando concentraciones subinhibitorias a ambos tiempos.

A una concentración de 1.000 ppm el hipoclorito de sodio posee actividad inhibitoria a ambos tiempos, mientras que el ácido peracético sólo lo es si el tiempo de contacto entre el sanitizante y el microorganismo es mayor a 1 minuto.

En función a los resultados obtenidos en el ensayo, se seleccionaron las siguientes concentraciones y tiempos de trabajo:

- Concentración: 1.000, 500 , 200 y 100 ppm
- Tiempo de contacto: 1, 3, 5, 7, 9 y 11 minutos

Como control se procesó un ensayo en las mismas condiciones pero sin el tratamiento con sanitizantes.

IV.2.2 Ensayos de inhibición

Los ensayos de inhibición se realizaron por triplicado a las concentraciones y tiempos seleccionados con la metodología indicada en **III.4.3**.

La tabla con los valores promedio de los recuentos obtenidos en los ensayos se detallan en el **ANEXO C: Promedio de los recuentos obtenidos en los ensayos de inhibición**.

Los valores de los recuentos fueron ingresados y procesados con GInaFiT, obteniendo las 10 posibles gráficas de muerte para cada uno de los sanitizantes en las concentraciones evaluadas:

1. Log-Linear Regression
2. Log-Linear + Shoulder
3. Log-Linear + Tail
4. Log-Linear + Shoulder + Tail
5. Weibull
6. Weibull, Fixed p-Parameter
7. Weibull + Tail
8. Double Weibull
9. Biphasic Model
10. Biphasic + Shoulder

De las mismas se obtuvieron valores de los parámetros de muerte:

D: Tiempo de reducción decimal (tiempo necesario para la reducción de 1 log en los recuentos celulares.

4D: Tiempo necesario para la reducción de 4 logaritmos en los recuentos celulares.

También la presencia /ausencia de errores en el ajuste de las curvas y los siguientes parámetros del sistema:

- **RMSSE:** Raíz Cuadrada del Error Cuadrático Medio (Root Mean Sum of Squared Errors)
- **R²:** Coeficiente de determinación
- **LSSE:** Suma Mínima de Errores al Cuadrado (Least Sum of Squared Error)

Para cada curva de inactivación se corrieron todos los modelos y se compararon los valores de RMSSE, considerado como un parámetro simple y que brinda información tanto en modelos lineales como no lineales (Geeraerd y col. 2005). El modelo que contiene el RSSME más pequeño es considerado el de mejor ajuste. Cuando dos modelos presentaban valores de RMSSE similares, se consideró que el modelo más simple era el que tenía un mejor ajuste.

También se evaluaron los estadísticos R² para la linealidad y LSSE para los desvíos obtenidos.

Del análisis y comparación de todos estos valores se obtuvo la curva con mejor ajuste para los sanitizantes en cada una de las concentraciones ensayadas.

El cuadro comparativo obtenido se muestra en el **ANEXO D:** Evaluación de los parámetros obtenidos con las distintas curvas en el Soft GInaFiT.

IV.2.3 Curvas de muerte con Ácido peracético:

La ecuación seleccionada para el tratamiento con Ácido peracético en concentraciones de 1000 ppm y 200 ppm fue la correspondiente a Weibull. La curva obtenida se muestra en el **Gráfico 2** y el modelo de inhibición identificado es:

$$\text{Log}_{10}(N) = \text{Log}_{10}(N_0) - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (\text{Mafart y col, 2002}), \text{ donde:}$$

N: Recuento celular a tiempo t	t: Tiempo
N₀: Recuento celular inicial (inóculo)	p: parámetro de forma
δ: Tiempo de la primera reducción decimal (D)	

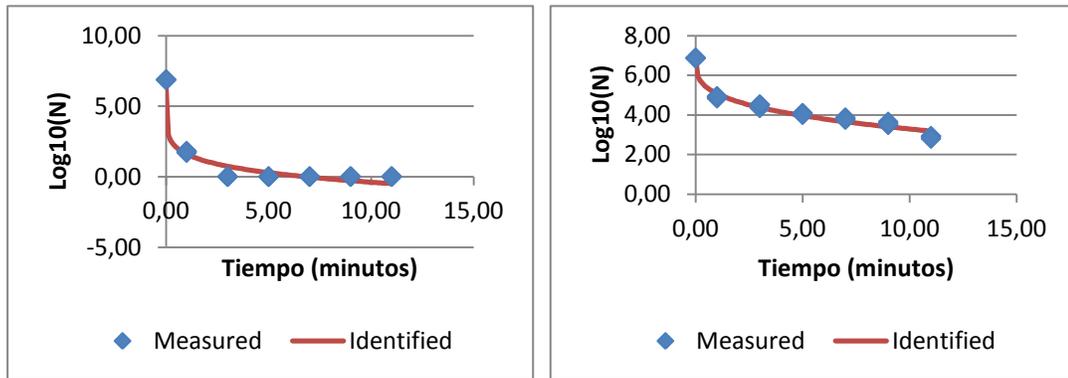


Gráfico 2: Curvas de muerte con Ácido peracético en concentraciones 1000 ppm (izquierda) y 200 ppm (derecha).

Para 500 ppm (**Gráfico 3**) la ecuación que mejor se ajusta es el Modelo Bifásico cuya ecuación es la siguiente:

$$Log10(N) = Log10(N_0) + Log10\left(f^{-k_{máx1}t} + (1-f)^{-k_{máx2}t}\right) \quad (\text{Cerf, 1977})$$

Como este modelo supone la presencia de 2 subpoblaciones diferentes, se presentan dos pendientes ($k_{máx1}$ y $k_{máx2}$) y un factor f que indica la fracción de subpoblación1 (la que presenta mayor sensibilidad) sobre la población total.

Mientras que para 100 ppm la ecuación que presenta el mejor ajuste es la que corresponde al modelo Double Weibull de Coroller y col, 2006.

$$Log10(N) = Log10\left\{10^{\left[\frac{N_0}{1+10^\alpha} \left(10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^\beta} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^\beta}\right)\right]}\right\}$$

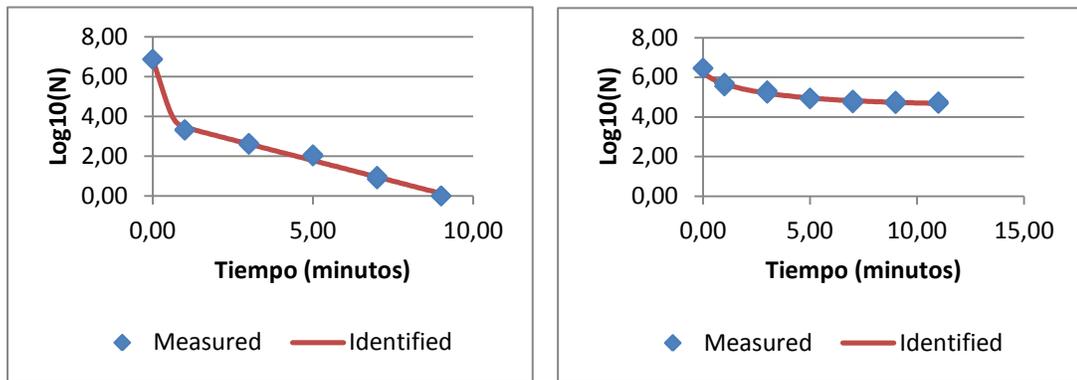


Gráfico 3: Curvas de muerte con Ácido peracético en concentraciones 500 ppm (izquierda) y 100 ppm (derecha).

Observando las curvas a distintas concentraciones se nota la reducción de actividad del sanitizante al disminuir su concentración, no logrando reducir 4 log el recuento de levaduras viables a partir de 200 ppm.

A 1000 ppm la reducción es rápida y efectiva, logrando a los 0,42 minutos reducir 4 log de recuento de células viables.

A diferencia de lo obtenido por Kyanko y col 2010, quienes no lograron una reducción significativa en esporas de mohos en un tratamiento de 30 minutos a una concentración de ácido peracético de 500 ppm, aquí se logra la reducción de 4 log en 2,43 minutos, lo que coincide más con Garmendia y Méndez, 2006, quienes lograron una reducción de esporas de *Penicillium expansum* sobre superficie de frutas de más de un logaritmo con un tratamiento de 30 segundos con ácido peracético 80 ppm.

A 100 ppm, la actividad del sanitizante es mucho menor, no obstante se logra la reducción de un log a los 1,48 minutos, pero no la reducción de dos logaritmos.

IV.2.4 Curvas de muerte con Hipoclorito de sodio:

Para la curva de muerte obtenida cuando se utilizaron concentraciones de 1000 ppm no se encontró un buen ajuste de ninguna de las ecuaciones. Esto se debe a que a estas concentraciones ocurrió la muerte de la levadura, aún con un contacto mínimo de tiempo (1 minuto), lo que dificulta el ajuste por no obtenerse en ninguno

de los tiempos un recuento positivo de células viables. A pesar de esto la ecuación de Weibull, si bien posee un R^2 bajo (0,68) es la que mejor interpreta los resultados y calcula un delta (reducción de un log) de $2,9 \times 10^{-5}$ minutos, no pudiendo calcular valores para una reducción de 4 log.

Para las otras concentraciones también la curva que presenta mayor ajuste es la de Weibull. Las mismas se muestran en los **Gráficos 4 y 5**.

En concentraciones de hipoclorito de 500 ppm la reducción de 4 log se logra antes de los 3 minutos.

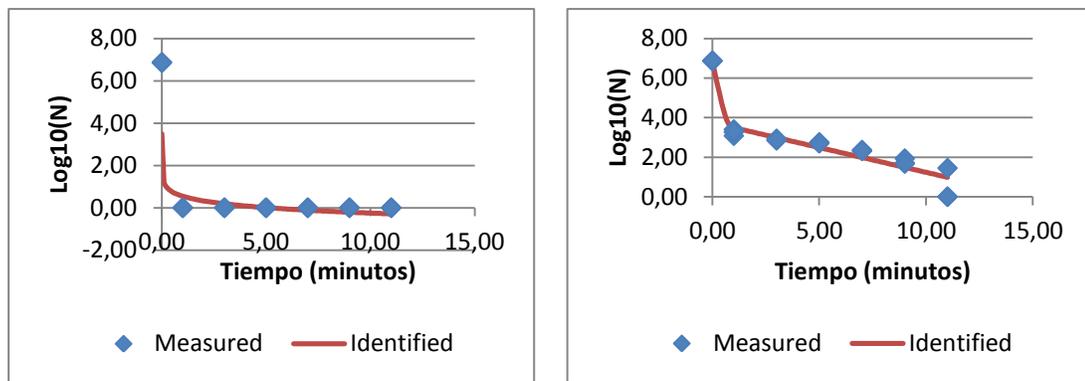


Gráfico 4: Curvas de muerte con Hipoclorito de sodio en concentraciones 1000 ppm (izquierda) y 500 ppm (derecha).

A 200 ppm, tanto el modelo Weibull, como el Double Weibull poseen un buen ajuste. Se seleccionó el primero por tener un RMSSE más bajo y un R^2 levemente superior. A pesar de esto, ambos arrojan idénticos valores de D y 4D. Ni a esta concentración, ni tampoco a 100 ppm se logra la reducción de 4 log de los recuentos (**Gráfico 5**), notándose una pérdida notable de actividad del sanitizante a la concentración más baja, donde necesita más de 7 minutos de contacto para poder reducir los recuentos en un logaritmo, valores similares a los obtenidos por Garmendia y Méndez, 2006, quienes obtuvieron una reducción de menos de un log en superficies de frutas con 30 segundos de contacto y menos de dos log a 200 ppm.

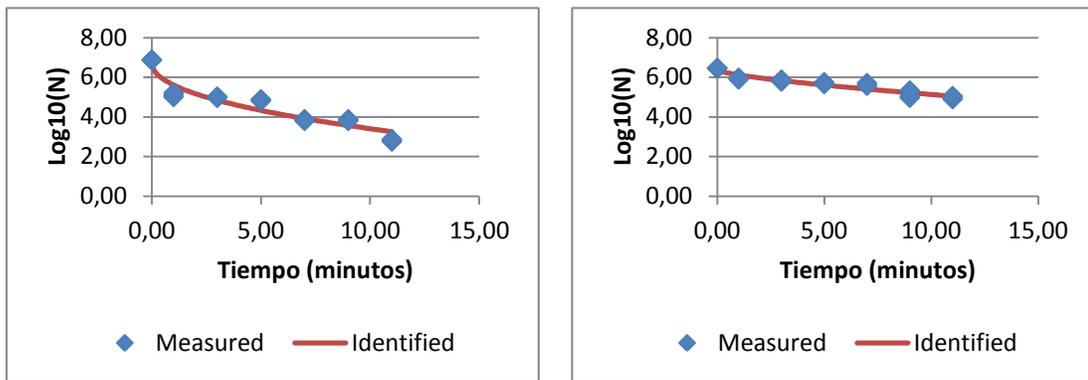


Gráfico 5: Curvas de muerte con Hipoclorito de sodio en concentraciones 200 ppm (izquierda) y 100 ppm (derecha).

Berbari y col demostraron que una concentración de cloro de 70 ppm confiere a la lechuga mínimamente procesada una vida útil de 6 días, mientras que si la concentración se encuentra entre los 100 y 130 ppm, dicha vida útil se alarga a 9 días. Ritenour y col recomiendan el mantenimiento de niveles de cloro libre entre 100 y 150 ppm y un pH entre 6,5 y 7,5 en el agua de lavado a fin de reducir la contaminación poscosecha.

IV.2.5 Comparación de las curvas de muerte:

En la **Tabla 7** se resume la actividad del ácido peracético y el hipoclorito de sodio sobre *Z. rouxii* según los valores correspondientes a las ecuaciones de muerte seleccionadas de los siguientes parámetros:

- **D:** Tiempo de reducción decimal.
- **4D:** Tiempo para lograr la reducción de 4 logaritmos decimales.

En la misma tabla se observa que las curvas obtenidas con ácido peracético presentan mejores ajustes, con R^2 entre 0,97 y 0,99. Las curvas para el hipoclorito también presentan buenos ajustes salvo la procesada para hipoclorito 1000 ppm.

Concent. (ppm)	ÁCIDO PERACÉTICO					HIPOCLORITO DE SODIO				
	D	4D	RMSSE	R ²	LSSE	D	4D	RMSSE	R ²	LSSE
1000	0,0023	0,42	0,0330	0,9999	0,0065	2,9E-05	NC	1,4016	0,6752	35,3582
500	0,0863	2,43	0,1504	0,9955	0,3167	0,0090	2,97	0,5593	0,9124	5,6312
200	0,1528	NI	0,1873	0,9762	0,6315	0,7486	NI	0,3750	0,9057	2,5318
100	1,4760	NI	0,0675	0,9877	0,0774	7,4498	NI	0,1608	0,8871	0,4652

Tabla7: Parámetros de muerte y del sistema obtenidos a distintas concentraciones de los sanitizantes ensayados. **NC:** No se obtiene cálculo. **NI:** No se produce reducción de 4 logaritmos

Se puede ver que ambos sanitizantes logran la reducción de un log antes de un minuto en concentraciones de 1000, 500 y 200 ppm, pero ninguno obtiene la reducción de 4 log a 200 y 100 ppm.

A concentraciones elevadas el hipoclorito de sodio muestra mayor actividad, lo cual se invierte a concentraciones más bajas donde el ácido peracético logra una reducción D a 1,47 minutos, mientras que el hipoclorito de sodio necesita más de siete minutos para lograr el mismo efecto. Esto coincide con Srebernich, 2007, quien demostró que un tratamiento con ácido peracético 80 ppm por cinco minutos puede reemplazar a uno realizado con hipoclorito de sodio 120 ppm por 15 minutos, produciendo similar inhibición tanto para hongos como para bacterias en general.

IV.2.6 Cálculo de la eficiencia de los sanitizantes

Para la evaluación de la eficiencia de los sanitizantes se utilizó la siguiente fórmula:

$$Eficiencia (\%) = \frac{N_0 - N_f}{N_0} \quad \text{donde}$$

N₀: Recuento inicial (UFC/ml)

N_f: Recuento final (UFC/ml)

A partir de esta ecuación se obtuvieron las eficiencias para cada sanitizante en todos los tiempos ensayados y los resultados se muestran en la **Tabla 8**.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A 1000 ppm ambos sanitizantes son eficientes a todos los tiempos ensayados, pero ya a 500 ppm necesitan un contacto mínimo de 3 minutos para lograr una reducción del 99,99%, mientras que a 200 ppm el tiempo de contacto se alarga a 11 minutos para lograr la misma eficiencia.

CONCENTRACIÓN (ppm)	PERACÉTICO		HIPOCLORITO	
	Tiempo	Eficiencia	Tiempo	Eficiencia
1000	1	100,00%	1	100,00%
	3	100,00%	3	100,00%
	5	100,00%	5	100,00%
	7	100,00%	7	100,00%
	9	100,00%	9	100,00%
	11	100,00%	11	100,00%
500	1	99,97%	1	99,97%
	3	99,99%	3	99,99%
	5	100,00%	5	99,99%
	7	100,00%	7	100,00%
	9	100,00%	9	100,00%
	11	100,00%	11	100,00%
200	1	98,92%	1	98,26%
	3	99,61%	3	98,67%
	5	99,84%	5	99,04%
	7	99,91%	7	99,91%
	9	99,95%	9	99,91%
	11	99,99%	11	99,99%
100	1	84,05%	1	70,12%
	3	93,57%	3	75,71%
	5	96,95%	5	82,38%
	7	97,79%	7	84,76%
	9	98,04%	9	95,11%
	11	98,17%	11	96,58%

Tabla 8: Eficiencias de ácido peracético e hipoclorito de sodio a las distintas concentraciones y tiempos ensayados.

A la concentración más baja ensayada, ninguno de los productos logra una eficiencia del 99,99%. No obstante, el ácido peracético posee mayor eficiencia logrando un valor de 98,17% contra un 96,58% del hipoclorito de sodio con un tiempo de contacto de 11 minutos.

CAPITULO V
CONCLUSIONES

V.1 Uso de microbiología predictiva en el crecimiento de *Z. rouxii*

Como lo mencionaban McMeekin y Ross en el año 2002, el valor de los modelos de microbiología predictiva en sistemas como HACCP, ISO 22000 y evaluación de riesgos, ya está reconocido, pero su aplicación aún no es demasiado extendida.

Zygosaccharomyces rouxii por sus características es un microorganismo importante en la industria alimenticia, ya que provoca contaminaciones que generan problemas en la misma. En lo que se refiere específicamente a *Zygosaccharomyces rouxii* (AISLADO LMFIQ 33), se realizó la evaluación de su comportamiento a distintas temperaturas y pHs. Si bien ambos tienen influencia sobre la curva, la temperatura de incubación es un factor fundamental a la hora de evaluar la posibilidad de crecimiento de la levadura, ya que en rangos de pH que oscilan entre 3 y 7, este último factor no es el de mayor influencia. No obstante esto, se demostró que el pH óptimo de crecimiento para el aislado es 5 y que la variación de este parámetro afecta a la fase lag (produciendo un alargamiento de la misma en valores subóptimos) más que a los valores de tasa y de recuentos finales.

A temperaturas cercanas a 33°C, se produce una inhibición en el crecimiento habitual de *Z. rouxii*, tanto en el valor de su tasa de crecimiento como en la cantidad de células viables. La temperatura y pH óptimos son 28°C y 5 respectivamente.

Las grandes variaciones en los valores de fase de latencia que se observan coinciden con el proceso de adaptación celular al stress causados por pH y temperaturas subóptimas.

Los parámetros de la curva de crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* (AISLADO LMFIQ 33) a distintos pHs y temperaturas muestran una curva ideal a pH=5 y 28°C de incubación, en coincidencia con lo expuesto por Douey y Wilson 2004.

El programa utilizado (DMFit) se comportó de manera apropiada y con los niveles de confianza esperados en la determinación de los parámetros de las curvas de crecimiento, por lo que puede ser utilizado para la evaluación de levaduras que posean comportamiento similar a *Z. rouxii*.

El uso de estos modelos predictivos terciarios, puede ayudar a la industria alimentaria que encuentra problemas asociados a contaminaciones con este tipo de microorganismo, a detectar ambientes propicios para el desarrollo de los mismos.

La utilización de este tipo de soft favorecería la predicción de contaminaciones indeseadas a partir de mediciones sencillas de ambientes relacionados con posibles contaminaciones y mejoraría la toma de decisiones si son evaluadas en puntos críticos de control en un sistema HACCP o en la implementación de ISO 22000.

Como desventaja se concluye que este tipo de evaluaciones se deberá realizar para cada microorganismo peligroso en cada una de las etapas del proceso sensibles a la contaminación, ya que cada especie produce respuestas diferentes a las distintas condiciones ambientales y que la manera en que estas condiciones interactúan entre sí afectando el crecimiento del microorganismo, también es compleja, requiriéndose el relevamiento de datos de crecimiento en un amplio rango de condiciones existentes para poder luego aplicar los modelos predictivos. El desafío sigue siendo convertir un problema microbiológico complejo en una toma de decisiones SI/NO, que deberá ser razonablemente sólida. Es aquí donde este tipo de herramientas bien utilizadas puede lograr un fortalecimiento de un sistema de seguridad alimentaria, mejorando este aspecto.

V.2 Evaluación de la inactivación/muerte de *Z. rouxii* con productos sanitizantes

El soft usado para evaluar el comportamiento de los sanitizantes sobre el aislado respondió adecuadamente al igual que el DMFit. A diferencia de este último (que puede usarse para la evaluación tanto de crecimiento como de muerte), se lo utiliza sólo para curvas de muerte. Es posible evaluar diversas ecuaciones con la ventaja obtener valores estadísticos que permiten valorar los distintos niveles de

ajuste de cada curva, marcando también la presencia de errores en caso que los hubiere. En la mayoría de las ecuaciones se obtiene directamente el D y 4D posibilitando un análisis rápido de los resultados.

Los sanitizantes demostraron tener rangos de actividades similares, pero el hipoclorito de sodio produce la muerte de la levadura más rápidamente que el ácido peracético a 1000 ppm. A una concentración de 500 ppm ambos mostraron poseer actividades similares con valores de 4D de 2,43 minutos para el ácido peracético y 2,97 minutos para el hipoclorito de sodio.

Tanto a 200 como a 100 ppm, los sanitizantes no logran una disminución de cuatro logaritmos en los recuentos, por lo que a esas concentraciones la actividad decae notoriamente para ambos. A estas concentraciones se aprecia la diferencia más notoria entre los sanitizantes, ya que el hipoclorito necesita más de siete minutos para lograr una disminución de un logaritmo, por lo que las industrias que utilizan este sanitizante deberían planificar tiempos de contacto mayores a 7 minutos para la eliminación de *Z. rouxii* lo que podría complicar el procedimiento de limpieza. No obstante ninguno de los dos son eficientes a 100 ppm, mientras que a 200 ppm recién serán eficientes (99,99% de reducción del microorganismo) si el tiempo de acción es al menos 11 minutos.

El ácido peracético sin embargo podría utilizarse dejándolo actuar 2 minutos si se desea una reducción decimal de la levadura, ya que produce ese efecto en 1,48 minutos.

Estas son consideraciones importantes, ya que además del proceso de higiene en superficies de contacto con alimentos, los sanitizantes en bajas concentraciones también son utilizados para la desinfección de alimentos a través del agregado del producto al agua de lavado.

V.3 Importancia de la microbiología predictiva en los sistemas de calidad

Si bien el uso de estas herramientas está en pleno crecimiento, ya existen muchos ejemplos de empresas que las están utilizando con éxito en sus sistemas de calidad y seguridad alimentaria. También la utilización de modelos matemáticos

puede ayudar a predecir la vida de anaquel, siempre teniendo en cuenta que los resultados obtenidos por los modelos utilizados, deben ser evaluados por expertos y usados sólo como guía.

La posibilidad actual de encontrar bases de datos donde buscar información acerca de microorganismos patógenos, está siendo complementada con otros que producen ya no enfermedad, pero sí alteración en los alimentos. En micología esto aún está en pleno desarrollo, es una posibilidad que tiene la industria alimenticia para mejorar la calidad y seguridad alimentaria.

La optimización de los procesos de limpieza y desinfección permitirá:

- o Reducir tiempos de limpieza
- o Optimizar el uso de químicos
- o Garantizar altos estándares de sanidad
- o Disminuir el gasto total en limpieza

En una industria alimenticia, la sanitización es la base fundamental para lograr alimentos seguros, saludables e inocuos. El fundamento son las BMP, luego la aplicación del sistema HACCP y, según decisiones gerenciales de las empresas, la aplicación y certificación de ISO 22000. Si bien es necesario el conocimiento y la capacitación de recursos humanos a fin de realizar un uso correcto, la aplicación de la microbiología predictiva como método, contribuiría en los procesos de sanitización a encontrar el mejor producto y sus tiempos de aplicación según el microorganismo predominante en cada tipo de industria, ya sean bacterias, mohos o levaduras.

BIBLIOGRAFÍA

- Aarnisalo, A.; Tallavaara, K.; Wirtanen, G.; Maijala, R.; Raaska, L.. 2006. The hygienic working practices of maintenance personnel and equipment hygiene in the Finnish food industry. *Food Control*. 17, 1001–1011.
- Ancasi E. G., Carrillo L., Benítez Ahrendts M. R.. 2006. Mohos y levaduras en agua envasada y bebidas sin alcohol. *Revista argentina de microbiología*. vol.38, n.2, pp. 93-96.
- Andrés, S. C.; Giannuzzi, L.; Zaritzky, N. E. 2002. Quality Parameters of Packaged Refrigerated Apple Cubes in Orange Juice. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie: Volume 35, Issue 8, Pages 670-679*.
- AOAC Suspension Test (Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis). Williams, S. (ed). AOAC, Arlington, 1984, p.70-71.
- Arias C. R., Burns J. K., Friedrich L. M., Goodrich R. M., Parish M. E.. 2002. Yeast Species Associated with Orange Juice: Evaluation of Different Identification Methods. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68, No. 4 p. 1955–1961.
- Arvanitoyannis I. S., Varzakas T. H.. 2009. Application of ISO 22000 and comparison with HACCP on industrial processing of common octopus (*Octopus vulgaris*). . vol. 44, No. 1, 58-78.
- Baranyi, J.; Roberts, T.A.. 1994. Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 26, 199-218.
- Baranyi, J.; Roberts T.A. 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology: Volume 26, Issue 2, Pages 199-218*.
- Baranyi, J.; Gibson A.M., Pitt J. I.; Eyles M. J.; Roberts, T.A.. 1996. Predictive models as means of measuring the relatedness of some *Aspergillus* species. *Food Microbiology*: 14, 347-351.

- Baranyi, J.. 1997. Simple is good as long as it is enough. *Food Microbiology*: 14, 189-192.
- Baranyi, J.; Pin C.; Ross C.. 1999. Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology*: 48, 159–166.
- Baranyi, J.; Roberts, T.A.. 2004. Predictive Microbiology – Quantitative Microbial Ecology. Institute of Food Research. http://www.ifr.ac.uk/safety/comicro/Culture_25.pdf.
- Basílico M.Z., Basílico J.C..1999. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 238-241.
- Bao, M.; Yüksel, M.; Çavuooflu, T.. 2007. Difficulties and barriers for the implementing of HACCP and food safety systems in food businesses in Turkey. *Food Control*. 18, 124–130.
- Beber de Souza J., Daniel L.A..2005. Comparison between sodium hipoclorite and peracetic acid for *E. coli*, *coliphages* and *C. perfringens* inactivation of high organic matter concentration water. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*. Vol.10 - Nº 2 - abr-jun, 111-117.
- Begot C., Desnier I., Daudin J., Labadie J., Lebert A.. 1996. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal Microbiology Methods*. 25, 225-232.
- BERBARI, S.A.; PASCHOALINO, J.E.; SILVEIRA, N.F. 2001. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alfase minimamente processada. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 21(2): 197-201.
- Berney M., Weilenmann H., Simonetti A., Egli T.. 2006. Efficacy of solar disinfection of *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella Typhimurium* and *Vibrio cholerae*. *Journal of Applied Microbiology*. 101-4, 828–836.
- Block, S.S.. 1991. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. 4 Edition. Ed Lea&Febiger. 18.

- Brul, S.; Mensonides, F.; Hellingwerf, K.; Teixeira de Mattos, J.. 2008. Microbial systems biology: New frontiers open to predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*. 128, 16–21.
- Bunge M.. 2004. *La investigación científica*. Ed Siglo XXI. 437.
- Calhelha R.C., Andrade J.V., Ferreira I.C., Estevinho L.M.. 2006. Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. *Food Microbiology*. 23, 393–398.
- Casas, E.; Ancos, B.; Valderrama, M.; Cano, P.; Peinado, J.. 2004. Pentadiene production from potassium sorbate by osmotolerant yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 94, 93– 96.
- Cayré, M.E.; Vignolo, G.M.; Garro, O.A.. 2007. Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre Emulsiones Cárnicas Cocidas. *Información Tecnológica-Vol 18 N°3*. 23-29.
- Cerf, O. 1977. Tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology*, 42, 1-19.
- Cerrutti, P., Alzamora, S.M.. 1996. Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purees. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 379– 386.
- Chowdhury B.R., Chakraborty R., Chaudhuri U.R.. 2005. Mathematical Modeling of Microbial Growth of Pretreated Refrigerated Minced Goat Meat (Black Bengal Variety). *Journal of Food Science*. M105-M111
- Codex Alimentarius, CAC/RCP 40-1993. Código de Prácticas de Higiene para Alimentos Poco Ácidos Elaborados y Envasados Asépticamente.
- Codex Alimentarius, CAC/RCP 1-1969, Rev 4 (2003). Código Internacional de Prácticas Recomendado – Principios Generales de Higiene de los Alimentos.
- Codex Alimentarius, CAC/GL 21-1997. Principios para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos a los alimentos.

- Código Alimentario Argentino, Capítulo II. Condiciones generales de las fábricas y comercio de alimentos.
- Cope S., Frewer L.J., Houghton J., Rowe G., Fischer A.R.H., Jonge J.. 2010. Consumer perceptions of best practice in food risk communication and management: Implications for risk analysis policy. *Food Policy*, Volume 35, Issue 4. 349-357.
- Cords B.R., Dychdala G.R., Richter F.R.. 2001. Sanitizing in milk production. *Applied Dairy Microbiology*. Ed New York. 562-572.
- Coroller L., Leguerinel I., Mettler E., Savy N., Mafart P. 2006. General Model Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6493-6502.
- Dalgaard P., Ross T., Kamperman L., Neumeyer K., McMeekin T.. 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable counts data. *International Journal of Food Microbiology*. 23, 391-404.
- Dalgaard P., Koutsoumanis K. 2001. Comparison of maximum specific growth rate and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal Microbiology Methods*. 43, 183-196.
- Dang, T.; Mertens, L.; Vermeulen, A.; Geeraerd, A.; Van Impe, J.; Debevere, J.; Devlieghere, F.. Modelling the growth/no growth boundary of *Zygosaccharomyces bailii* in acidic conditions: A contribution to the alternative method to preserve foods without using chemical preservatives. *International Journal of Food Microbiology*. 137, 1–12.
- Dantigny P., Guilmart A., Bensoussan M.. 2005. Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*. 100, 187-196.
- Dens E.J; Van Impe., J.F.. 2001. On the need for another type of predictive model in structured foods. *International Journal of Food Microbiology* 64, 247–260.
- Dychdala, G.R.. 1983. Chlorine and chlorine compounds in “Disinfection, Sterilization and Preservation”. Ed. Block SS 3° Ed. 157-182.

- Doménech E.; Escriche I.; Martorell S.. 2008. Assessing the effectiveness of critical control points to guarantee food safety. *Food Control* 19, 557–565.
- Douey D., Wilson P.. 2004. Enumeration of yeast and moulds in foods. *Food and Nutrition. Microbiological Methods. Volume 2.*
- Egan, M.B. ; Raats, M.M. ; Grubb, S.M. ; Eves, A. ; Lumbers, M.L. ; Dean, M.S.; Adams, M.R.. 2007. A review of food safety and food hygiene training studies - in the commercial sector. *Food Control*. 18, 1180–1190.
- El Halouat A., Gourama H., Uyttendaele M., Debevere J.M..1998. Effects of modified atmosphere packaging and preservatives on the shelf-life of high moisture prunes and raisins. *International Journal of Food Microbiology* 41, 177–184.
- Evans D.G., Everis L.K., Betts G.D.. 2004. Use of survival analysis and Classification and Regression Trees to model the growth/no growth boundary of spoilage yeasts as affected by alcohol, pH, sucrose, sorbate and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 92, 55– 67.
- Fares, M.; Rouviere, E.. 2010. The implementation mechanisms of voluntary food safety systems. *Food Policy*. Article in press.
- Fitzgerald, D.; Stratford, M.; Narbad, A.. 2003. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International Journal of Food Microbiology*. 86, 113–122.
- Gaaloul, I.; Riabi, S.; Ghorbel, R.E.. 2010. Implementation of ISO 22000 in cereal food industry “SMID” in Tunisia. *Food Control*. Accepted Manuscript.
- Garmendia, G. y S. Vero Méndez. 2006. Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. *Horticultura: Revista de frutas, hortalizas, flores, plantas ornamentales y de viveros*. ISSN 1132-2950, (en línea), N° 197, 18-27.
- Geeraerd, A.; Valdramidis, V.; Van Impe, J.. 2005. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*. 102, 1-25, 95-105.

- Gibson, A.; Hocking, A.. 1997. Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. *Trends in Food Science & Technology*. 8, 353-358.
- GInaFiT. Geeraed and Van Impe Inactivation model Fitting Tool. Developed by Annemie Geeraerd. Version 1.5. 2009.
- Gougouli, M.; Koutsoumanis, K.. 2010. Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 140, 254–262.
- Guajardo Garza E.. 2003. Administración de la Calidad Total. Conceptos y enseñanzas de los grandes maestros de la calidad. Ed Pax México. Pág.70.
- Guerola, P.M. 2006. Desarrollo y Aplicación de Sistemas Rápidos para la Detección, Identificación y Caracterización de Levaduras Alterantes de Alimentos. Departamento de Biotecnología – Universidad de Valencia – Tesis Doctoral. P 2.
- Guerra Lund, D.; Petrini, L.; Guimarães, J.; Valmor Rombaldi, A.. 2005. Uso de sanitizantes na redução da carga microbiana de mandioca minimamente processada. *Ciência Rural*. 35,6,1431-1435.
- Harrington, H.J.. 1990. El coste de la mala calidad. Ediciones Díaz de los Santos S.A.. 3, 25.
- Havelaar A. H., Brul S., Jong A., Jonge R., Zwietering M.H., Kuile B.H.. 2010. Future challenges to microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology* 139 (2010) S79–S94
- Houghton, J.R; Rowe, G. ; Frewer, L.J.; Van Kleef, E. ; Chrysoschoidis, G.; Kehagia, O.; Korzen-Bohr, S.; Lassen, J.; Pfenning, U.; Strada, A.. 2008. The quality of food risk management in Europe: Perspectives and priorities. *Food Policy*. 33, 13–26.
- Ingaramo E.A., Cayré M.E., Garro O.A. 1995. Influencia de la acidez y concentración de NaCl sobre el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* . Conservas alimenticias. Hersom A.C., Hulland E.D.. Ed. Acribia. 57-58.

- Ishikawa, K. 1989. Introducción al Control de Calidad. Ed. Díaz de Santos. 14,15,30,60,221,225,365,388.
- Jacxsens, L., Kussaga, J., Luning, P.A., Van der Spiegel, M., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., 2009. A microbial assessment scheme to support microbial performance measurements of food safety management systems. *International Journal of Food Microbiology*. 134, 113–125.
- Jacxsens, L.; Uyttendaele, M.; Devlieghere, F.; Rovira, J.; Osés Gomez, S.; Luning, P.. 2010. Food safety performance indicators to benchmark food safety output of food safety management systems. *International Journal of Food Microbiology*. ARTICLE IN PRESS
- Jansen, M.; Veurink, J.; Euverink, G.; Dijkhuizen, L.. 2003. Growth of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plates: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids. *FEMS Yeast Research*. 3, 313-318.
- Jasson, V.; Jacxsens, L.; Luning, P.; Rajkovic, A.; Uyttendaele, M.. 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*. 27, 710-730.
- Jay J., Loessner M., Golden D.. 2005. *Modern food microbiology*. 497.
- Judet-Correia, D.; Bollaert, S.; Duquenne, A.; Charpentier, C.; Bensoussan, M.; Dantigny, P.. 2010. Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries. *International Journal of Food Microbiology*. Article in press.
- Jurado, J.. 1993. The stability of disinfectants used in brewery CIP. *MBAA Technical Quarterly*. 30, 58-63.
- Juran J.M., Gryna F. M.. 1993. *Manual de Calidad 4º Ed. Volumen 1*. Ed. McGraw-Hill.
- Kornfeld, F.. (1966). Properties and techniques of application of biocidal ampholytic surfactants. *Food Manufacture*. 41. 39-46.

- Kunigk, L.; Almeida, M.. 2001. Action of peracetic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32, 38-41
- Kyanko, M.; Russo, M.; Fernández, M.; Pose, G.. 2010. Efectividad del Acido Peracético sobre la reducción de la carga de Esporas de Mohos causantes de Pudrición Poscosecha de Frutas y Hortalizas. *Información tecnológica*. Vol. 21(4), 125-130.
- Lahlali, R., Serrhini, M.N., Jijakli, M.H., 2005. Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *International Journal of Food Microbiology* 103, 315–322.
- Leaper, S.. 1984. Influence of temperature on the synergistic sporicidal effect of peracetic acid plus hydrogen peroxide on *Bacillus subtilis* SA (NCA 72- 52). *Food Microbiol.*, 1, 199-203.
- Legan, D. 2007. Application of models and other quantitative microbiology tools in predictive microbiology. *Modelling microorganisms in food*. Brul, Zwietering & Van Gerwen (Eds.). 82–109.
- López, L.; Romero, J.; Ureta, F.. 2002. Acción germicida in vitro de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. v.52 n.1.
- López-Malo, A.; Alzamora, S.; Palou, E.. 2005. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives. *International Journal of Food Microbiology*. 99, 119– 128.
- Loureiro, V.. 2000. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International*. 33, 247-256.
- Mafart, P.; Couvert, O.; Gaillard S. y Leguerinel, I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107-113.

- Mafart, P., 2005. Food engineering and predictive microbiology: on the necessity to combine biological and physical kinetics. *International Journal of Food Microbiology*. 100, 239–251.
- Magro, A., Carolino, M., Bastos M., Mexía, A. 2006. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*; 23: 176-178.
- Marín, S., Colom, C., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2009. Modelling of growth of aflatoxigenic *A. flavus* isolates from red chilli powder as a function of water availability. *International Journal of Food Microbiology* 128, 491–496.
- Martorell, P.; Fernández-Espinar, M.; Querol, A.. 2005. Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. *International Journal of Food Microbiology*. 101, 293–302.
- Martorell, P.; Stratford, M.; Steels, H.; Fernández-Espinar, M.; Querol, A.. 2007. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Int. Journal of Food Microbiology* 114 234-242.
- Marvin H.J.P; Kleter, G.A.; Frewer, L.J.; Cope, S.; Wentholt, M.T.; Rowe, G.. 2009. A working procedure for identifying emerging food safety issues at an early stage: Implications for European and international risk management practices. *Food Control*. 20, 345–356.
- Matan N., Rimkeeree H., Mawson A.J., Chompreeda P., Haruthaithanasan V., Parker M.. 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology* 107, 180 – 185.
- McMeekin, T.A., Olley, J., Ross, T., Ratkowsky, D.A., 1993. Predictive Microbiology: Theory and Application, Research bacterial growth. *Bacteriol. Rev.* 26, 95–107.
- McMeekin, T.A.; Ross, T. 2002. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*. 78, 133– 153.

- McMeekin, T.; Baranyi, J.; Bowman, J.; Dalgaard, P.; Kirk, M.; Ross, S.; Zwietering, M.. 2006. Schmid Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology*. 112, 181–194.
- McMeekin, T.. 2007. Predictive microbiology: Quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat Science*. 77, 17–27.
- McMeekin, T.; Bowman, J.; McQuestin, O.; Mellefont, L.; Ross, T.; Tamplin, M.. 2008. The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. *International Journal of Food Microbiology*. 128, 2–9.
- Membré J.M., Kabaczka M., Chené C.. 1999. Combined Effects of pH and Sugar on Growth Rate of *Zygosaccharomyces rouxii*, a Bakery Product Spoilage Yeast. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 4921-4925.
- Membré, J.; Lambert, R.. 2008. Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*. 128, 10–15.
- Meyer, B.. 2006. Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene. *International Journal of Food Microbiology*. 112, 275–279.
- Michanie S., Quevedo F.. 1990. Aplicación Del Sistema de Peligros Potenciales e Identificación y Control de los Puntos Críticos para Mejorar La Calidad de los Alimentos. *La Alimentación Latinoamericana*. 50-55. Basado en el III Taller OPS/OMS sobre Normalización de Alimentos y Salud para América Latina y El Caribe. La Habana 1987.
- Mossel, D.A.. 1977. *Microbiology of foods—occurrence, prevention and monitoring of hazards and deterioration*. The University of Utrecht.
- Niels, R. 2008. ISSO 22000 y HACCP: Desarrollo de Nuevos Estándares de Seguridad de Alimentos. *Mundo Alimentario*. Seguridad Alimentaria. Marzo/Abril 2008. 22-24.

- Nielsen, D.; Jacobsen, T.; Jespersen, L.; Koch, A.; Arneborg, N.. 2008. Occurrence and growth of yeasts in processed meat products – Implications for potential spoilage. *Meat Science*. 80, 919–926.
- Norma Internacional IRAM-ISO 22000:2007. Sistemas de gestión de inocuidad de alimentos. Requisitos para cualquier organización de la cadena alimentaria.
- Norma Internacional ISO 9000 Sistemas de gestión de la calidad —Fundamentos y vocabulario. 2005
- Norma Internacional ISO 9001 Sistemas de gestión de la calidad —Requisitos. 2008.
- Norma Internacional ISO 9004 Sistemas de gestión de la calidad — Directrices para la mejora del desempeño. 2000.
- Notermans S., Gallhoff G., Zwietering M.H., Mead G.C. 1995. The HACCP concept: specification of criteria using quantitative risk assessment. *Food Microbiology* 12, 81-90
- Organización Mundial de la Salud. 1956. Serie de Informes Técnicos N° 104. Higiene de los Alimentos. 4° Informe del Comité de Expertos en Saneamiento del Medio. 3-6.
- Panagou, E.Z., Skandamis, P.N., Nychas, G.-J.E., 2003. Modelling the combined effect of temperature, pH and aw on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. *Journal of Applied Microbiology* 94, 146–156.
- Panagou, E.Z., Kodogiannis, V., Nychas, G.J.-E., 2007. Modelling fungal growth using radial basis function neural networks: the case of the ascomycetous fungus *Monascus ruber* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology* 117, 276–286.
- Panisello P. J.; Quantick P. C.. 1998. Application of Food MicroModel predictive software in the development of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) systems. *Food Microbiology*, 15, 425-439.

- Pardo, E., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2005. Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based medium. *International Journal of Food Microbiology* 98, 1–9.
- Pardo, E., Malet, M., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2006. Effects of water activity and temperature on germination and growth profiles of ochratoxigenic *Penicillium verrucosum* isolates on barley meal extract agar. *International Journal of Food Microbiology* 106, 25–31.
- Perni S.; Andrew P.W. Shama G.. 2005. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. *Food Microbiology* 22, 491–495.
- Pin C.; Baranyi J.. 1998. Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 41, 59–72.
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D.. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Second edition. Blackie Academic & Professional.
- Plaza, P., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I., 2003. Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Applied Microbiology* 94, 549–554.
- Praphailong W. and Fleet G. H.. 1997. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology*, 14, 459–468.
- Publicación de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Boletín de difusión. Buenas Prácticas de Manufactura. Programa Calidad de los Alimentos Argentinos. 2006. www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/alimentos/index.php.
- Resolución Mercosur GMC N° 50/06 "Reglamento Técnico Mercosur para Productos con Acción Antimicrobiana. 2006
- Renard, A.; Gómez, P.; Egea-Cortines, M.; Weiss, J.. 2008 Application of whole genome amplification and quantitative PCR for detection and quantification of

- spoilage yeasts in orange juice. *International Journal of Food Microbiology*.126, 195–201.
- Reyns K. M., Soontjens C.F., Cornelis K., Weemaes C. A., Hendrickx M.E., Michiels C. W. 2000. Kinetic analysis and modelling of combined high-pressure–temperature inactivation of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology* 56, 199–210
 - Riba Romeva, C., 2002. *Diseño Concurrente*. Ed. UPC. 191.
 - Ritenour, M.; Sargent, S.; Bartz J.; Lon Kan, E.. 2007. *Uso del Cloro en las Líneas de Empacado de Productos Cosechados Frescos*. Departamento de Horticultural Ciencias, Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de la Florida. Documento HS1082.
 - Robbins, S.P., 2004. *Comportamiento organizacional*. 10 Ed. Pearson Educación.. 457
 - Roberts, T.; Jarvis, B. 1983. Predictive modelling of food safety with particular reference to *Clostridium botulinum* in model cured meat systems. *Food microbiology: Advances and prospects*. 89–95.
 - Ropkins, K. y Beck, A. J.. 2007. HACCP in the home: a framework for improving awareness of hygiene and safe food handling with respect to chemical risk. *Trends in Food Science & Technology*. 11, 105-114.
 - Ross,T.; McMeekin T. A. 1994. Predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*. 23, Issues 3-4, Pages 241-264.
 - Rosso L., Robinson T.P.. 2001. A Cardinal Model to Describe the Effect of Water Activity on the Growth of Molds. *International Journal of Food Microbiology*. 63. 265-273.
 - Ruiz Cruz, S.; Felix, E.; Díaz Cinco, M.; Osuna, M.; González Aguilar, G.. 2006. Efectividad de sanitizantes en la reducción microbiana y calidad de zanahoria fresco cortada. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29, 299-306.

- Russel A.D., Hugo W.B., Ayliffe G.A.J.. 1992. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. 2 Ed.. Blackwell Sc. Publications. 55-362-234.
- Samapundo, S.; Devlieghere, F.; Meulenaer, B.; Geeraerd, A.; Van Impe, J.; Debevere, J.. 2005. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. International Journal of Food Microbiology. 105, 35– 52.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., De Meulenaer, B., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2007. Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn. Food Microbiology 24, 517–529.
- Sancho,T.; Giménez-Jurado, G.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V.. 2002. Zymological indicators: a new concept applied to the detection of potential spoilage yeast species associated with fruit pulps and concentrates. Food Microbiology. Volume 17, Issue 6. 613-624.
- Sautour, M., Dantigny, P., Divies, C., Bensoussan, M., 2001. A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity. International Journal of Food Microbiology 67, 63–69.
- Scott, W.. 1937. The growth of microorganisms on ox muscle.II. The influence of temperature. Journal of the Council of Scientific and Industrial Research. 10, 338–350.
- Scheffler, R.. 2009. Maximizing sanitation efforts in food processing: the importance of conveyor hygiene. Trends in Food Science & Technology. 20, 40-43.
- Seaman, P.. 2010. Food hygiene training: Introducing the Food Hygiene Training Model. Food Control. 21, 381–387.
- Seaman, P.; Eves, A.. 2010. Efficacy of the theory of planned behaviour model in predicting safe food handling practices. Food Control. 21, 983–987.

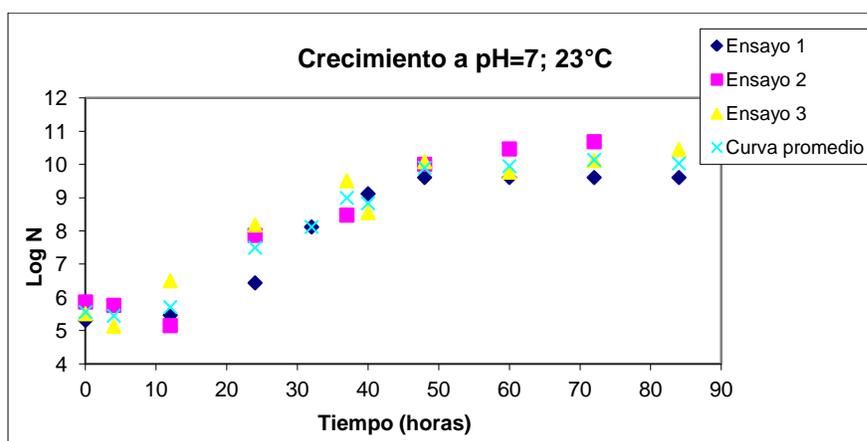
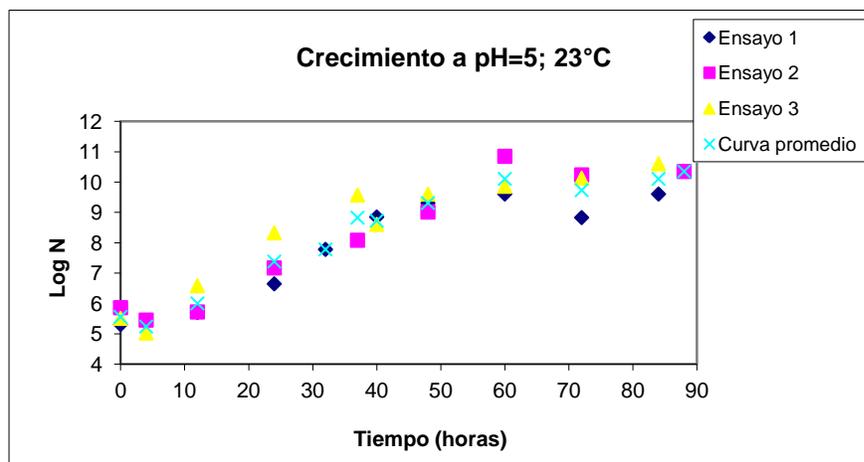
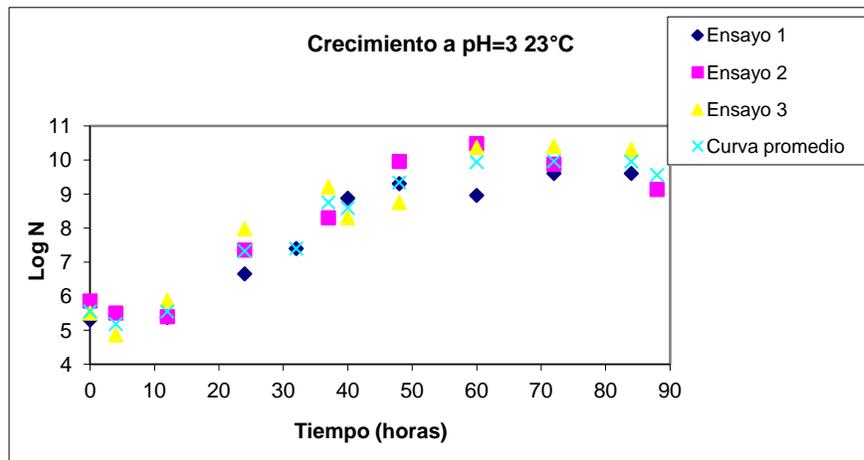
- Secilio, G.. 2005. La calidad en alimentos como barrera para-arancelaria. estudios y perspectivas. Oficina de la CEPAL en Buenos Aires. Naciones Unidas. 24, 25, 29, 30.
- S.E.N.A.S.A., Limpieza y desinfección - El ácido peracético (2006), <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=888&io=4117#>.
- Smits, G.; Brul, S.. 2005. Stress tolerance in fungi to kill a spoilage yeast. *Current Opinion in Biotechnology*. 16, 225–230.
- Srebernich S.M. 2007. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente procesado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 27 (4); 744-750.
- Stratford, M., Hofman, P.D. y Cole, M.B.. 2000. Fruit juices, fruit drinks and soft drinks. *The microbiological safety and quality of food*. Ed: B.M., Lund, A.C., Baird-Parker, y G.W., Gould. Aspen Publishers Inc, Gaithersburg, Maryland. pp: 836-869.
- Swinnen, I.A.; Bernaerts, K.; Dens, E.J.; Geeraerd, A. H.; Van Impe, J.F.2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 137– 159.
- Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Natskoulis, P., Magan, N., 2007. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of two ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from Greek wine grapes. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2267–2276.
- Tudor, E.A. y Board, R.G.. 1993. Food-spoilage yeasts. *The yeasts*, Vol. 5: Yeast Technology. Ed: A.H., Rose y J.S., Harrison. 2nd ed, Academic Press, London.
- San Diego New York Boston Sydney Tokyo Toronto. pp: 435-516.
- Tzortzakis, N.. 2008. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Article in press.
- Unites States Environmental Protection Agency. 1997. Fresh Fruit and Produce Sanitizing Wash: Questions. Scientific Advisory Panel. SAP Meeting.

- Unnevehr, L.J.; Jensen, H.H.. 1999. The economic implications of using HACCP as a food safety regulatory standard. *Food Policy*. 24, 625–635.
- Valik, L.; Baranyi, J.; Görner, F.. 1999. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology* 47. 141–146.
- Van Impe, J.F.; Poschet, F.; Geeraerd, A.H.; Vereecke K.M.. 2005. Towards a novel class of predictive microbial growth models. *International Journal of Food Microbiology* 100 97– 105.
- Vermeulen, A.; Dang, T.D.; Geeraerd, A.; Bernaerts, K., Debevere, J.; Van Impe, J., Devlieghere, F.. 2008. Modelling the unexpected effect of acetic and lactic acid in combination with pH and a_w on the growth/no growth interface of *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*. 124, 79-90.
- Wentholt, M.T.A.; Rowe, G.; König, A.; Marvin, H.J.P.; Frewer, L.J.. 2009. The views of key stakeholders on an evolving food risk governance framework: Results from a Delphi study. *Food Policy*. 34, 539–548.
- Whiting, R.C., Buchanan, R.L.. 1993. A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiology* 10, 175–177.
- Yaghlene, H.; Leguerinel, I.; Hamdi, M.; Mafart, P.. 2009. A new predictive dynamic model describing the effect of the ambient temperature and the convective heat transfer coefficient on bacterial growth. *International Journal of Food Microbiology*. 133, 48–61.
- Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., Van't Riet K.. 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied & Environmental Microbiology*. Vol. 56 N°6. 1875-1881.
- <http://www.cit.kuleuven.be/biotec/index.htm>
- <http://www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm>
- <http://pmp.arserrc.gov/PMPOnline.aspx>
- <http://www.ifr.ac.uk/safety/dmfit>

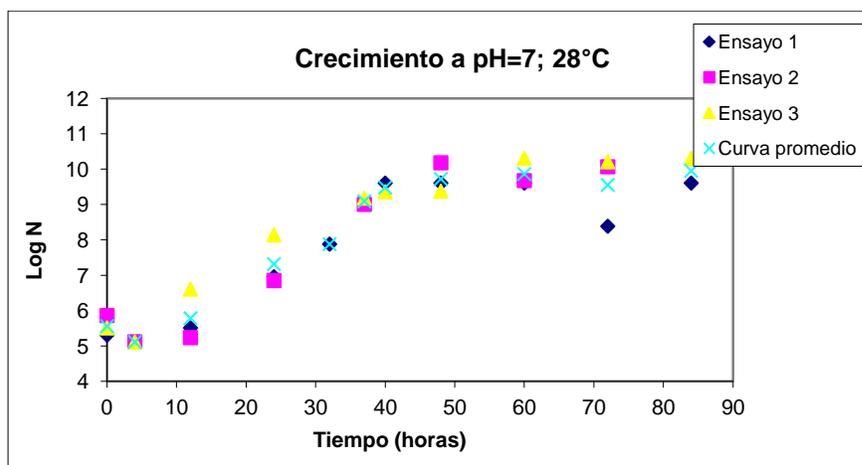
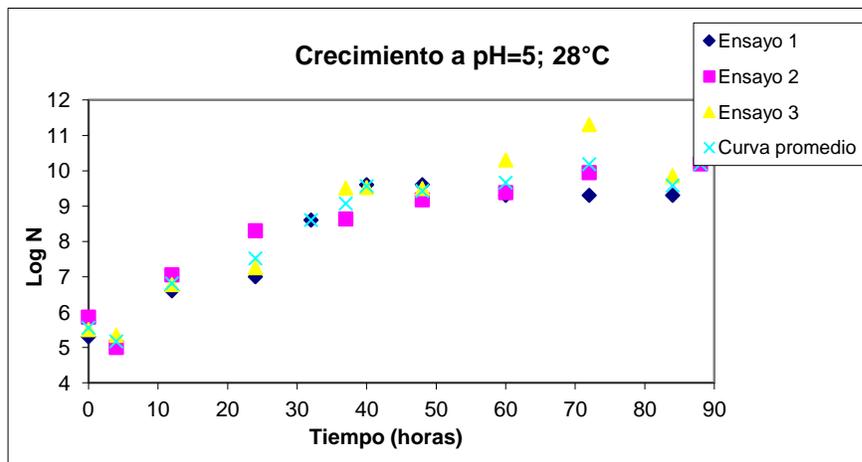
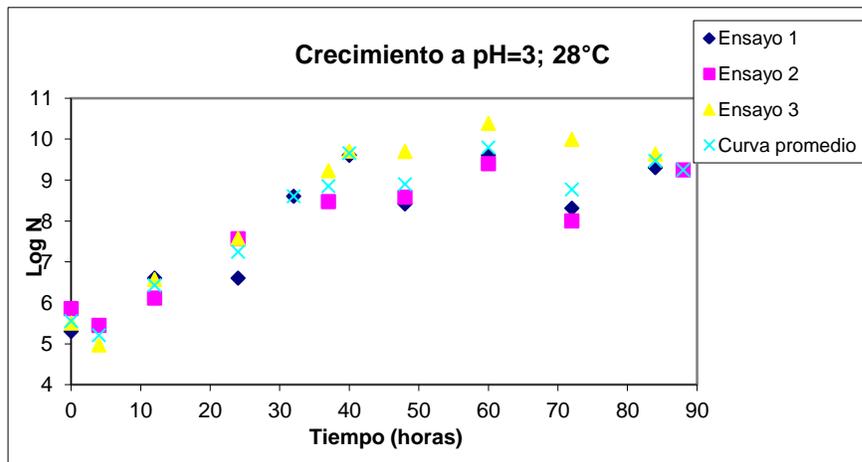
CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA

- <http://www.ifr.ac.uk/safety/growthpredictor>
- <http://www.combase.cc/>
- <http://www.codexalimentarius.net>
- http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidad/calidad/boletines/bolet_bpm.PDF
- www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm
- <http://www.ifeg.info/es>

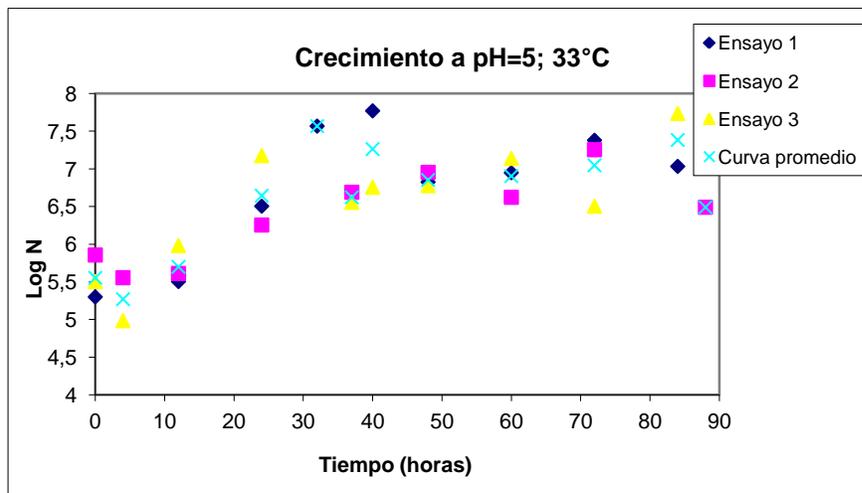
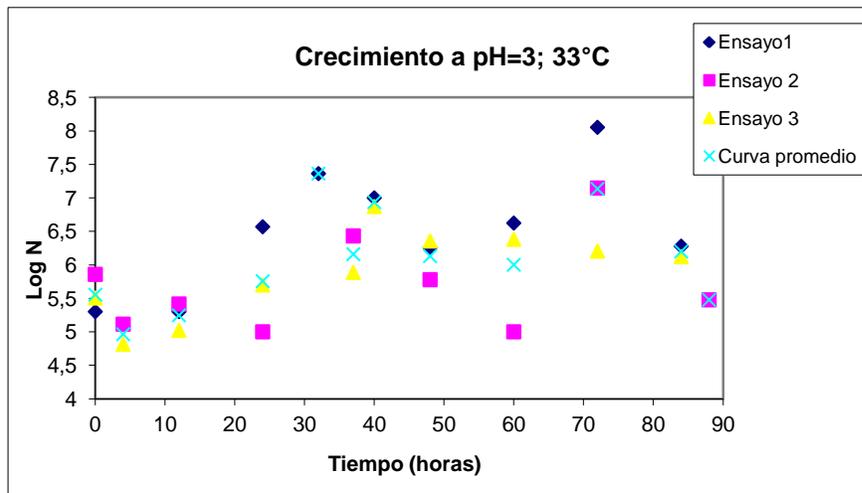
ANEXO A: Gráficas de crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* (AISLADO LMFIQ 33) en función de la Temperatura y el pH.



ANEXO A: Gráficas de crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* (AISLADO LMFIQ 33) en función de la Temperatura y el pH.



ANEXO A: Gráficas de crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* (AISLADO LMFIQ 33) en función de la Temperatura y el pH.



ANEXO B: Resumen de ANOVA obtenidos a partir de la evaluación de parámetros de las curvas de crecimiento

ANOVA Simple - Tasa por pH (Temperatura=23)

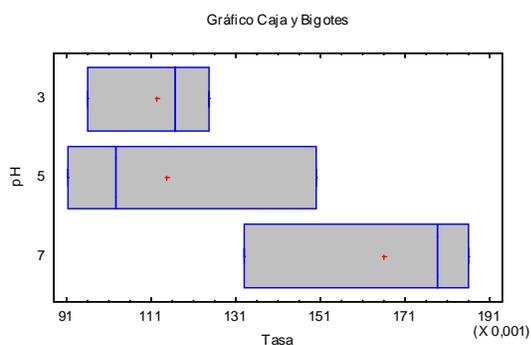
Variable dependiente: Tasa

Factor: pH

Selección de la Variable: Temperatura=23

Tabla ANOVA para Tasa por pH

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,000673749	2	0,000336875	0,40	0,6895
Intra grupos	0,00510766	6	0,000851276		
Total (Corr.)	0,0057814	8			



Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,609145	0,574315

Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
5	3	0,117949	X
3	3	0,13415	X
7	3	0,137883	X

ANEXO B: Resumen de ANOVA obtenidos a partir de la evaluación de parámetros de las curvas de crecimiento

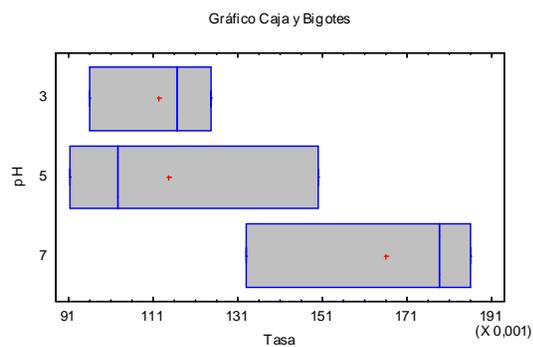
ANOVA Simple - Tasa por pH (Temperatura=28)

Variable dependiente: Tasa

Factor: pH

Tabla ANOVA para Tasa por pH

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,00549379	2	0,00274689	4,10	0,0753
Intra grupos	0,00401606	6	0,000669344		
Total (Corr.)	0,00950985	8			



Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,190729	0,831178

Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	3	0,112462	X
5	3	0,114569	XX
7	3	0,165895	X

ANEXO B: Resumen de ANOVA obtenidos a partir de la evaluación de parámetros de las curvas de crecimiento

ANOVA Simple - Tasa por pH (Temperatura=33)

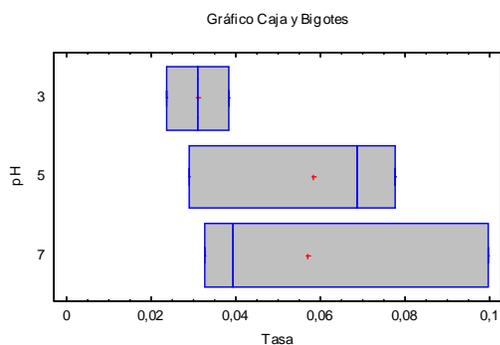
Variable dependiente: Tasa

Factor: pH

Selección de la Variable: Temperatura=33

Tabla ANOVA para Tasa por pH

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,00108513	2	0,000542567	0,65	0,5601
Intra grupos	0,00415831	5	0,000831661		
Total (Corr.)	0,00524344	7			



Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,216694	0,812357

Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	2	0,0309	X
7	3	0,0571333	X
5	3	0,0584	X

ANEXO B: Resumen de ANOVA obtenidos a partir de la evaluación de parámetros de las curvas de crecimiento

ANOVA Simple - Tasa por Temperatura (pH=3)

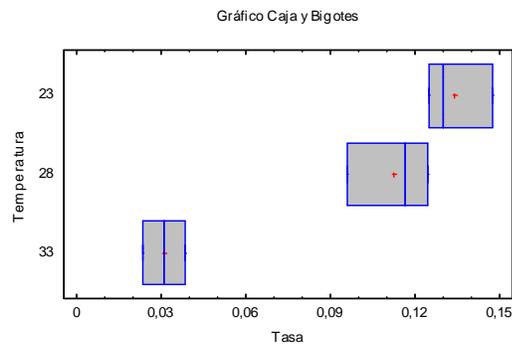
Variable dependiente: Tasa

Factor: Temperatura

Selección de la Variable: pH=3

Tabla ANOVA para Tasa por Temperatura

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,0135138	2	0,00675691	40,98	0,0008
Intra grupos	0,000824368	5	0,000164874		
Total (Corr.)	0,0143382	7			



Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,0586344	0,943689

Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
33	2	0,0309	X
28	3	0,112462	X
23	3	0,13415	X

ANEXO B: Resumen de ANOVA obtenidos a partir de la evaluación de parámetros de las curvas de crecimiento

ANOVA Simple - Tasa por Temperatura (pH=5)

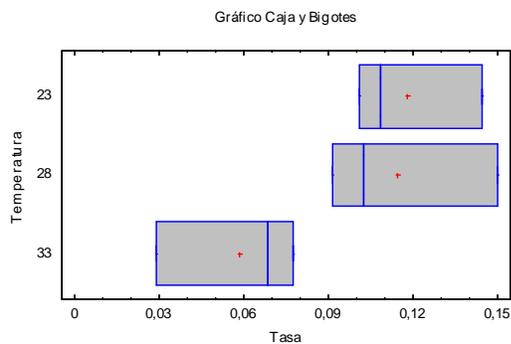
Variable dependiente: Tasa

Factor: Temperatura

Selección de la Variable: pH=5

Tabla ANOVA para Tasa por Temperatura

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,00671255	2	0,00335628	4,63	0,0609
Intra grupos	0,00435321	6	0,000725534		
Total (Corr.)	0,0110658	8			



Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,0411416	0,959962

Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
33	3	0,0584	X
28	3	0,114569	X
23	3	0,117949	X

ANEXO B: Resumen de ANOVA obtenidos a partir de la evaluación de parámetros de las curvas de crecimiento

ANOVA Simple - Tasa por Temperatura (pH=7)

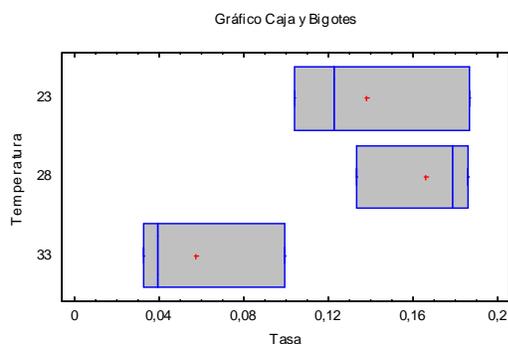
Variable dependiente: Tasa

Factor: Temperatura

Selección de la Variable: pH=7

Tabla ANOVA para Tasa por Temperatura

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,0191342	2	0,0095671	7,08	0,0263
Intra grupos	0,00810445	6	0,00135074		
Total (Corr.)	0,0272387	8			



Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,0782949	0,925621

Pruebas de Múltiple Rangos para Tasa por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
33	3	0,0571333	X
23	3	0,137883	X
28	3	0,165895	X

ANEXO C: Promedio de los recuentos obtenidos en los ensayos de inhibición.

SANITIZANTE: HIPOCLORITO DE SODIO							
Conc (1000 ppm)		Conc (500 ppm)		Conc (200 ppm)		Conc (100 ppm)	
Tpo (min)	Rec UFC/ml	Tpo (min)	Rec UFC/ml	Tpo (min)	Rec UFC/ml	Tpo (min)	Rec UFC/ml
0	7,30E+06	0	7,30E+06	0	7,30E+06	0	2,80E+06
0	7,30E+06	0	7,30E+06	0	7,30E+06	0	2,80E+06
0	7,30E+06	0	7,30E+06	0	7,30E+06	0	2,80E+06
1	S/C	1	1,20E+03	1	1,23E+05	1	9,30E+05
1	S/C	1	2,50E+03	1	1,00E+05	1	7,80E+05
1	S/C	1	1,87E+03	1	1,58E+05	1	8,00E+05
3	S/C	3	8,50E+02	3	1,02E+05	3	7,40E+05
3	S/C	3	7,00E+02	3	9,00E+04	3	6,00E+05
3	S/C	3	7,50E+02	3	1,00E+05	3	7,00E+05
5	S/C	5	5,60E+02	5	7,50E+04	5	4,80E+05
5	S/C	5	5,00E+02	5	6,30E+04	5	5,50E+05
5	S/C	5	5,20E+02	5	7,20E+04	5	4,50E+05
7	S/C	7	2,30E+02	7	7,40E+03	7	5,00E+05
7	S/C	7	2,07E+02	7	7,00E+03	7	4,10E+05
7	S/C	7	2,11E+02	7	6,20E+03	7	3,70E+05
9	S/C	9	50	9	7,40E+03	9	9,10E+04
9	S/C	9	85	9	7,00E+03	9	1,10E+05
9	S/C	9	47	9	6,20E+03	9	2,10E+05
11	S/C	11	S/C	11	5,68E+02	11	7,80E+04
11	S/C	11	S/C	11	7,21E+02	11	9,90E+04
11	S/C	11	28	11	6,80E+02	11	1,10E+05
S/C: sin crecimiento							

ANEXO C: Promedio de los recuentos obtenidos en los ensayos de inhibición.

SANITIZANTE: ÁCIDO PERACÉTICO

Conc (1000 ppm)	
Tpo (min)	Rec UFC/ml
0	7,30E+06
0	7,30E+06
0	7,30E+06
1	50
1	65
1	58
3	S/C
3	S/C
3	S/C
5	S/C
5	S/C
5	S/C
7	S/C
7	S/C
7	S/C
9	S/C
9	S/C
9	S/C
11	S/C
11	S/C
11	S/C

Conc (500 ppm)	
Tpo (min)	Rec UFC/ml
0	7,30E+06
0	7,30E+06
0	7,30E+06
1	1,97E+03
1	2,10E+03
1	2,17E+03
3	3,80E+02
3	4,20E+02
3	4,50E+02
5	1,20E+02
5	1,00E+02
5	1,10E+02
7	10
7	7
7	9
9	S/C
9	S/C
9	S/C
11	S/C
11	S/C
11	S/C

Conc (200 ppm)	
Tpo (min)	Rec UFC/ml
0	7,30E+06
0	7,30E+06
0	7,30E+06
1	8,50E+04
1	6,80E+04
1	8,30E+04
3	3,20E+04
3	2,22E+04
3	3,23E+04
5	1,20E+04
5	1,20E+04
5	1,00E+04
7	6,40E+03
7	7,20E+03
7	5,70E+03
9	4,40E+03
9	3,10E+03
9	3,60E+03
11	8,40E+02
11	8,00E+02
11	6,30E+02

Conc (100 ppm)	
Tpo (min)	Rec UFC/ml
0	2,80E+06
0	2,80E+06
0	2,80E+06
1	3,50E+05
1	4,80E+05
1	5,10E+05
3	2,10E+05
3	1,80E+05
3	1,50E+05
5	7,80E+04
5	9,00E+04
5	8,80E+04
7	4,90E+04
7	6,60E+04
7	7,10E+04
9	4,50E+04
9	5,70E+04
9	6,30E+04
11	4,60E+04
11	5,00E+04
11	5,80E+04

S/C: sin crecimiento

ANEXO D: Evaluación de los parámetros obtenidos con las distintas curvas en el Soft GInaFit

HIPOCLORITO	PARÁMETROS								ESTADÍSTICOS			ERRORES	
	1000 ppm	f	Kmáx1	SE(K1)	Kmáx2	SE(K2)	p	D	4Dred	RMSSE	R2 Ajust	LSSE	NVSL
1	N	0,8053	0,2783	N	N	N	1,2417	N	2,1022	0,2694	83,9629	N	N
2	N	0,0605	0,1122	N	N	N	16,5233	0,11	0,3955	0,9741	0,0065	S	N
3	N	24,5709	0,2357	N	N	N	0,0407	0,44	2,50E-05	1,0000	1,12E-08	N	S
4	N	7,7657	N	N	N	N	0,1288	N	N	N	N	S	S
5	N	N	N	N	N	0,1035	2,89E-05	N	1,4016	0,6752	35,3582	N	N
6	N	N	N	N	N	0,5000	6,00E-02	0,99	5,3924	-3,8073	523,412	N	N
7	N	N	N	N	N	6,2678	0,6729	0,88	1,27E-06	1,0000	0,0000	N	N
8	N	N	N	N	N	4,0000	0,3365	0,55	N	N	N	N	N
9	0,9999	1,6108	0,9882	0,4034	18,149	N	0,6208	5,83	3,6689	-1,2254	228,8359	N	N
10	1,0000	1,6108	1,5E+00	0,4034	20,808	N	0,6208	5,83	3,7822	-1,3649	228,8755	N	N

HIPOCLORITO	PARÁMETROS								ESTADÍSTICOS			ERRORES	
	500 ppm%	f	Kmáx1	SE(K1)	Kmáx2	SE(K2)	p	D	4Dred	RMSSE	R2 Ajust	LSSE	NVSL
1	N	0,9441	0,1377	N	N	N	1,0592	9,79	1,0404	0,6969	20,5654	N	N
2	N	0,5175	0,0858	N	N	N	1,9323	3,30	0,4671	0,9389	3,9271	S	N
3	N	8,3841	1,6371	N	N	N	0,1193	1,21	8,43E-01	0,8012	1,28E+01	N	N
4	N	0,5175	1,78E-01	N	N	N	1,9324	3,30	0,4806	0,9353	3,9271	S	S
5	N	N	N	N	N	0,2403	8,97E-03	2,97	0,5593	0,9124	5,6312	N	N
6	N	N	N	N	N	N	6,00E-02	1,32	4,4216	-4,4780	351,911	N	N
7	N	N	N	N	N	1,8890	0,5045	1,10	8,67E-01	0,7895	12,7798	N	N
8	N	N	N	N	N	0,2405	0,0090	2,97	0,5756	0,9072	5,6328	N	N
9	0,9992	11,2561	28,4045	0,5771	0,092	N	0,0888	3,63	0,4365	0,9467	3,2385	N	N
10	0,9992	11,2566	N	0,5769	0,095	N	0,0888	3,63	0,4499	0,9433	3,2385	N	N

1	Log-Linear Regression
2	Log-Linear + Shoulder
3	Log-Linear + Tail
4	Log-Linear + Shoulder + Tail
5	Weibull
6	Weibull, Fixed p parameter
7	Weibull + Tail
8	Double Weibull
9	Biphasic model
10	Biphasic + Shoulder

SE: Estándar Error (error estándar)

D: Tiempo de reducción decimal

D4: Tiempo para lograr la reducción de 4 logaritmos

RMSSE: Root Mean Sum of Squared Error

LSSE: Least Sum of Squared Error

NVSL: Negative Value for the Shoulder Length (ausencia de hombro)

Less: No se puede procesar el modelo con cola por log10 bajo

N: No se registra valor

S: Presencia de error

ANEXO D: Evaluación de los parámetros obtenidos con las distintas curvas en el Soft GInaFiT

HIPOCLORITO	PARÁMETROS								ESTADÍSTICOS			ERRORES	
	200 ppm%	f	Kmáx1	SE(K1)	Kmáx2	SE(K2)	p	D	4Dred	RMSSE	R2 Ajust	LSSE	NVSL
1	N	0,6709	0,0619	N	N	N	1,4906	N	0,4675	0,8535	4,1518	N	N
2	N	0,4576	0,0632	N	N	N	2,1854	N	0,3295	0,9272	1,9548	S	N
3	N	0,6709	0,0998	N	N	N	1,4906	N	4,80E-01	0,8454	4,15E+00	N	S
4	N	0,4576	1,43E-01	N	N	N	2,1854	N	0,3391	0,9229	1,9548	S	S
5	N	N	N	N	N	0,4655	7,49E-01	N	0,3750	0,9057	2,5318	N	N
6	N	N	N	N	N	1,02	6,00E-02	0,33	119,1518	-9516,0214	255549	N	N
7	N	N	N	N	N	0,4655	0,7486	N	3,86E-01	0,9002	2,5318	N	S
8	N	N	N	N	N	0,4655	0,7486	N	0,3859	0,9002	2,5318	N	N
9	0,9460	13,3589	11372	0,5221	0,058	N	0,0749	N	0,2750	0,9493	1,2854	N	N
10	0,9460	13,3589	7,1E+07	0,5221	0,060	N	0,0749	N	0,2834	0,9461	1,2854	N	N

HIPOCLORITO	PARÁMETROS								ESTADÍSTICOS			ERRORES	
	100 ppm%	f	Kmáx1	SE(K1)	Kmáx2	SE(K2)	p	D	4Dred	RMSSE	R2 Ajust	LSSE	NVSL
1	N	0,2671	0,0217	N	N	N	3,7444	N	0,1637	0,8829	0,5095	N	N
2	N	0,2124	0,0602	N	N	N	4,7091	N	0,1656	0,8803	0,4935	S	N
3	N	0,2671	0,0600	N	N	N	3,7444	N	1,68E-01	0,8764	5,09E-01	N	S
4	N	0,2123	2,93E-01	N	N	N	4,7106	N	0,1704	0,8732	0,4935	S	S
5	N	N	N	N	N	0,7035	7,4498	N	0,1608	0,8871	0,4652	N	N
6	N	N	N	N	N	0,7035	6,00E-02	0,44	19,6683	-1688,3407	6963,165	N	N
7	N	N	N	N	N	0,7035	7,4498	N	1,65E-01	0,8805	0,4652	N	S
8	N	N	N	N	N	0,7035	7,4498	N	0,1654	0,8805	0,4652	N	N
9	0,5268	10,9624	10906	0,2289	0,029	N	0,0912	N	0,1374	0,9175	0,3210	N	N
10	0,5268	10,9624	N	0,2289	0,030	N	0,0912	N	0,1416	0,9124	0,3210	N	N

1	Log-Linear Regression
2	Log-Linear + Shoulder
3	Log-Linear + Tail
4	Log-Linear + Shoulder + Tail
5	Weibull
6	Weibull, Fixed p parameter
7	Weibull + Tail
8	Double Weibull
9	Biphasic model
10	Biphasic + Shoulder

SE: Estándar Error (error estándar)

D: Tiempo de reducción decimal

D4: Tiempo para lograr la reducción de 4 logaritmos

RMSSE: Root Mean Sum of Squared Error

LSSE: Least Sum of Squared Error

NVSL: Negative Value for the Shoulder Length (ausencia de hombro)

Less: No se puede procesar el modelo con cola por log10 bajo

N: No se registra valor

S: Presencia de error

ANEXO D: Evaluación de los parámetros obtenidos con las distintas curvas en el Soft GInaFit

PERACÉTICO	PARÁMETROS								ESTADÍSTICOS			ERRORES	
	1000 ppm	f	Kmáx1	SE(K1)	Kmáx2	SE(K2)	p	D	4Dred	RMSSE	R2 Ajust	LSSE	NVSL
1	N	4,8009	0,9106	N	N	N	1,0296	1,92	1,4797	0,7701	15,3276	N	N
2	N	1,9437	0,0337	N	N	N	8,8184	0,21	0,0330	0,9999	0,0065	S	N
3	N	11,7722	0,0626	N	N	N	0,0849	0,81	0,0330	0,9999	0,0065	N	S
4	N	6,3155	8,01E+01	N	N	N	0,1583	0,66	0,0196	0,9999	0,0065	S	S
5	N	N	N	N	N	0,2689	0,0023	0,42	0,0330	0,9999	0,0065	N	N
6	N	N	N	N	N	0,2000	7,00E-06	0,03	4,3757	-1,0105	114,882	N	N
7	N	N	N	N	N	1,1563	0,0559	0,21	0,9614	0,9029	4,6219	N	N
8	N	N	N	N	N	1,6366	0,1115	0,27	0,0361	0,9999	0,0065	N	N
9	0,9999	10,3196	N	1,8975	N	N	0,0969	2,43	0,4246	0,9811	0,9015	N	N
10	1,0000	10,3196	7,7E+07	1,8975	N	N	0,0969	0,90	0,5992	0,9623	1,4362	S	N

PERACÉTICO	PARÁMETROS								ESTADÍSTICOS			ERRORES	
	500 ppm	f	Kmáx1	SE(K1)	Kmáx2	SE(K2)	p	D	4Dred	RMSSE	R2 Ajust	LSSE	NVSL
1	N	1,4305	0,1657	N	N	N	0,6990	6,48	0,9723	0,8122	15,1267	N	N
2	N	0,9089	0,0423	N	N	N	1,1003	2,34	0,1858	0,9931	0,5178	S	N
3	N	1,7709	0,3169	N	N	N	0,5647	5,31	0,9578	0,8177	13,7617	N	N
4	N	0,9089	7,52E-02	N	N	N	1,1003	2,34	0,1923	0,9927	0,5178	S	S
5	N	N	N	N	N	0,3328	0,0338	2,25	0,3602	0,9742	1,9457	N	N
6	N	N	N	N	N	0,4500	1,49E-01	3,33	0,4501	0,9598	3,039	N	N
7	N	N	N	N	N	0,3328	0,0338	2,25	0,3728	0,9724	1,9459	N	S
8	N	N	N	N	N	0,3328	0,0338	2,25	0,3728	0,9724	1,9457	N	N
9	0,9990	11,5836	13,0912	0,9554	0,0447	N	0,0863	2,43	0,1504	0,9955	0,3167	N	N
10	0,9990	11,5851	N	0,9552	0,0464	N	0,0863	2,43	0,1561	0,9952	0,3167	S	N

1	Log-Linear Regression
2	Log-Linear + Shoulder
3	Log-Linear + Tail
4	Log-Linear + Shoulder + Tail
5	Weibull
6	Weibull, Fixed p parameter
7	Weibull + Tail
8	Double Weibull
9	Biphasic model
10	Biphasic + Shoulder

SE: Estándar Error (error estándar)

D: Tiempo de reducción decimal

D4: Tiempo para lograr la reducción de 4 logaritmos

RMSSE: Root Mean Sum of Squared Error

LSSE: Least Sum of Squared Error

NVSL: Negative Value for the Shoulder Length (ausencia de hombro)

Less: No se puede procesar el modelo con cola por log10 bajo

N: No se registra valor

S: Presencia de error

ANEXO D: Evaluación de los parámetros obtenidos con las distintas curvas en el Soft GInaFit

PERACÉTICO	PARÁMETROS								ESTADÍSTICOS			ERRORES	
	200 ppm%	f	Kmáx1	SE(K1)	Kmáx2	SE(K2)	p	D	4Dred	RMSSE	R2 Ajust	LSSE	NVSL
1	N	0,6401	0,0748	N	N	N	1,5624	N	0,5652	0,7830	6,0698	N	N
2	N	0,3258	0,0307	N	N	N	3,0694	N	0,1493	0,9849	0,4014	S	N
3	N	1,6158	0,3454	N	N	N	2,8956	N	0,5114	0,8224	4,7083	N	N
4	N	0,3258	9,16E-02	N	N	N	3,0691	N	0,1537	0,9840	0,4014	S	S
5	N	N	N	N	N	0,3029	0,1528	N	0,1873	0,9762	0,6315	N	N
6	N	N	N	N	N	0,4000	4,48E-01	N	0,2313	0,9637	0,963	N	N
7	N	N	N	N	N	0,3029	0,1528	N	0,1927	0,9748	0,6315	N	S
8	N	N	N	N	N	0,3029	0,1528	N	0,1927	0,9748	0,6315	N	N
9	0,9770	1,7972	0,6372	0,2896	0,1162	N	0,5564	N	0,4021	0,8902	2,7484	N	N
10	0,9855	6,7341	3,2E+05	0,4196	0,0359	N	0,1485	N	0,1211	0,9900	0,2346	N	N

PERACÉTICO	PARÁMETROS								ESTADÍSTICOS			ERRORES	
	100 ppm%	f	Kmáx1	SE(K1)	Kmáx2	SE(K2)	p	D	4Dred	RMSSE	R2 Ajust	LSSE	NVSL
1	N	0,3142	0,0406	N	N	N	3,1829	N	0,3068	0,7463	1,7885	N	N
2	N	0,0355	0,0255	N	N	N	28,1746	N	0,0788	0,9833	0,1118	S	N
3	N	1,0158	0,1162	N	N	N	0,9844	N	0,1378	0,9488	0,3418	N	N
4	N	0,3438	1,05E-01	N	N	N	2,9088	N	0,0673	0,9878	0,0769	S	S
5	N	N	N	N	N	0,3118	1,5674	N	0,0866	0,9798	0,1350	N	N
6	N	N	N	N	N	1,02	6,00E-02	±0,33	120,0582	N	259451	N	N
7	N	N	N	N	N	0,4779	1,5525	N	0,0662	0,9882	0,0745	N	S
8	N	N	N	N	N	0,4939	1,4760	N	0,0675	0,9877	0,0774	N	N
9	0,9256	2,2270	0,2715	0,1428	0,0211	N	0,4490	N	0,0968	0,9748	0,1593	N	N
10	0,9256	2,2271	4,8E+00	0,1428	0,0304	N	0,4490	N	0,0998	0,9732	0,1593	N	N

1	Log-Linear Regression
2	Log-Linear + Shoulder
3	Log-Linear + Tail
4	Log-Linear + Shoulder + Tail
5	Weibull
6	Weibull, Fixed p parameter
7	Weibull + Tail
8	Double Weibull
9	Biphasic model
10	Biphasic + Shoulder

SE: Estándar Error (error estándar)

D: Tiempo de reducción decimal

D4: Tiempo para lograr la reducción de 4 logaritmos

RMSSE: Root Mean Sum of Squared Error

LSSE: Least Sum of Squared Error

NVSL: Negative Value for the Shoulder Length (ausencia de hombro)

Less: No se puede procesar el modelo con cola por log10 bajo

N: No se registra valor

S: Presencia de error

ANEXO E: Eficiencias obtenidas en cada ensayo para el ácido peracético a las distintas concentraciones ensayadas

PERACÉTICO 0,1			
Tiempo (minutos)	Rcto inicial (UFC/ml)	Rcto final (UFC/ml)	Eficiencia
1	7,30E+06	50	100,00%
1	7,30E+06	65	100,00%
1	7,30E+06	58	100,00%
3	7,30E+06	1,01	100,00%
3	7,30E+06	1,01	100,00%
3	7,30E+06	1,01	100,00%
5	7,30E+06	1,01	100,00%
5	7,30E+06	1,01	100,00%
5	7,30E+06	1,01	100,00%
7	7,30E+06	1,01	100,00%
7	7,30E+06	1,01	100,00%
7	7,30E+06	1,01	100,00%
9	7,30E+06	1,01	100,00%
9	7,30E+06	1,01	100,00%
9	7,30E+06	1,01	100,00%
11	7,30E+06	1,01	100,00%
11	7,30E+06	1,01	100,00%
11	7,30E+06	1,01	100,00%

PERACÉTICO 0,05			
Tiempo (minutos)	Rcto inicial (UFC/ml)	Rcto final (UFC/ml)	Eficiencia
1	7,30E+06	1970	99,97%
1	7,30E+06	2100	99,97%
1	7,30E+06	2170	99,97%
3	7,30E+06	380	99,99%
3	7,30E+06	420	99,99%
3	7,30E+06	450	99,99%
5	7,30E+06	120	100,00%
5	7,30E+06	100	100,00%
5	7,30E+06	110	100,00%
7	7,30E+06	10	100,00%
7	7,30E+06	7	100,00%
7	7,30E+06	9	100,00%
9	7,30E+06	1,01	100,00%
9	7,30E+06	1,01	100,00%
9	7,30E+06	1,01	100,00%
11	7,30E+06	1,01	100,00%
11	7,30E+06	1,01	100,00%
11	7,30E+06	1,01	100,00%

ANEXO E: Eficiencias obtenidas en cada ensayo para el ácido peracético a las distintas concentraciones ensayadas

PERACÉTICO 0,02			
Tiempo (minutos)	Rcto inicial (UFC/ml)	Rcto final (UFC/ml)	Eficiencia
1	7,30E+06	8,50E+04	98,84%
1	7,30E+06	6,80E+04	99,07%
1	7,30E+06	8,30E+04	98,86%
3	7,30E+06	3,20E+04	99,56%
3	7,30E+06	2,22E+04	99,70%
3	7,30E+06	3,23E+04	99,56%
5	7,30E+06	1,20E+04	99,84%
5	7,30E+06	1,20E+04	99,84%
5	7,30E+06	1,00E+04	99,86%
7	7,30E+06	6,40E+03	99,91%
7	7,30E+06	7,20E+03	99,90%
7	7,30E+06	5,70E+03	99,92%
9	7,30E+06	4,40E+03	99,94%
9	7,30E+06	3,10E+03	99,96%
9	7,30E+06	3,60E+03	99,95%
11	7,30E+06	8,40E+02	99,99%
11	7,30E+06	8,00E+02	99,99%
11	7,30E+06	6,30E+02	99,99%

PERACÉTICO 0,01			
Tiempo (minutos)	Rcto inicial (UFC/ml)	Rcto final (UFC/ml)	Eficiencia
1	2,80E+06	3,50E+05	87,50%
1	2,80E+06	4,80E+05	82,86%
1	2,80E+06	5,10E+05	81,79%
3	2,80E+06	2,10E+05	92,50%
3	2,80E+06	1,80E+05	93,57%
3	2,80E+06	1,50E+05	94,64%
5	2,80E+06	7,80E+04	97,21%
5	2,80E+06	9,00E+04	96,79%
5	2,80E+06	8,80E+04	96,86%
7	2,80E+06	4,90E+04	98,25%
7	2,80E+06	6,60E+04	97,64%
7	2,80E+06	7,10E+04	97,46%
9	2,80E+06	4,50E+04	98,39%
9	2,80E+06	5,70E+04	97,96%
9	2,80E+06	6,30E+04	97,75%
11	2,80E+06	4,60E+04	98,36%
11	2,80E+06	5,00E+04	98,21%
11	2,80E+06	5,80E+04	97,93%

ANEXO F: Eficiencias obtenidas en cada ensayo para el hipoclorito de sodio a las distintas concentraciones ensayadas

HIPOCLORITO DE SODIO 0,1			
Tiempo	Rcto inicial	UFC/ml	Eficiencia
1	7,30E+06	1	100,00%
1	7,30E+06	1	100,00%
1	7,30E+06	1	100,00%
3	7,30E+06	1	100,00%
3	7,30E+06	1	100,00%
3	7,30E+06	1	100,00%
5	7,30E+06	1	100,00%
5	7,30E+06	1	100,00%
5	7,30E+06	1	100,00%
7	7,30E+06	1	100,00%
7	7,30E+06	1	100,00%
7	7,30E+06	1	100,00%
9	7,30E+06	1	100,00%
9	7,30E+06	1	100,00%
9	7,30E+06	1	100,00%
11	7,30E+06	1	100,00%
11	7,30E+06	1	100,00%
11	7,30E+06	1	100,00%

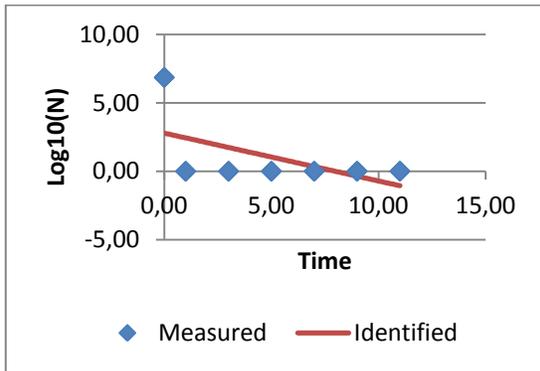
HIPOCLORITO DE SODIO 0,05			
Tiempo	Rcto inicial	UFC/ml	Eficiencia
1	7,30E+06	1200	99,98%
1	7,30E+06	2500	99,97%
1	7,30E+06	1870	99,97%
3	7,30E+06	850	99,99%
3	7,30E+06	700	99,99%
3	7,30E+06	750	99,99%
5	7,30E+06	560	99,99%
5	7,30E+06	500	99,99%
5	7,30E+06	520	99,99%
7	7,30E+06	230	100,00%
7	7,30E+06	207	100,00%
7	7,30E+06	211	100,00%
9	7,30E+06	50	100,00%
9	7,30E+06	85	100,00%
9	7,30E+06	47	100,00%
11	7,30E+06	1	100,00%
11	7,30E+06	1	100,00%
11	7,30E+06	28	100,00%

ANEXO F: Eficiencias obtenidas en cada ensayo para el hipoclorito de sodio a las distintas concentraciones ensayadas

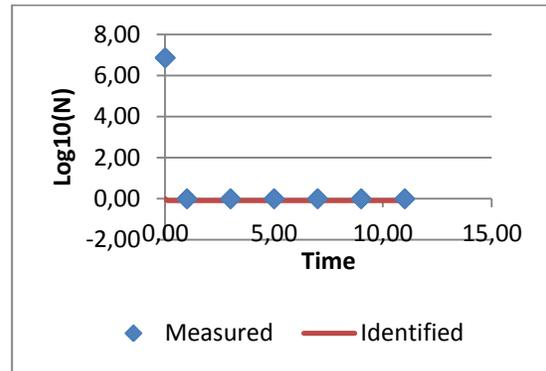
HIPOCLORITO DE SODIO 0,02			
Tiempo	Rcto inicial	UFC/ml	Eficiencia
1	7,30E+06	1,23E+05	98,32%
1	7,30E+06	1,00E+05	98,63%
1	7,30E+06	1,58E+05	97,84%
3	7,30E+06	1,02E+05	98,60%
3	7,30E+06	9,00E+04	98,77%
3	7,30E+06	1,00E+05	98,63%
5	7,30E+06	7,50E+04	98,97%
5	7,30E+06	6,30E+04	99,14%
5	7,30E+06	7,20E+04	99,01%
7	7,30E+06	7,40E+03	99,90%
7	7,30E+06	7,00E+03	99,90%
7	7,30E+06	6,20E+03	99,92%
9	7,30E+06	7,40E+03	99,90%
9	7,30E+06	7,00E+03	99,90%
9	7,30E+06	6,20E+03	99,92%
11	7,30E+06	5,68E+02	99,99%
11	7,30E+06	7,21E+02	99,99%
11	7,30E+06	6,80E+02	99,99%

HIPOCLORITO DE SODIO 0,01			
Tiempo	Rcto inicial	UFC/ml	Eficiencia
1	2,80E+06	9,30E+05	66,79%
1	2,80E+06	7,80E+05	72,14%
1	2,80E+06	8,00E+05	71,43%
3	2,80E+06	7,40E+05	73,57%
3	2,80E+06	6,00E+05	78,57%
3	2,80E+06	7,00E+05	75,00%
5	2,80E+06	4,80E+05	82,86%
5	2,80E+06	5,50E+05	80,36%
5	2,80E+06	4,50E+05	83,93%
7	2,80E+06	5,00E+05	82,14%
7	2,80E+06	4,10E+05	85,36%
7	2,80E+06	3,70E+05	86,79%
9	2,80E+06	9,10E+04	96,75%
9	2,80E+06	1,10E+05	96,07%
9	2,80E+06	2,10E+05	92,50%
11	2,80E+06	7,80E+04	97,21%
11	2,80E+06	9,90E+04	96,46%
11	2,80E+06	1,10E+05	96,07%

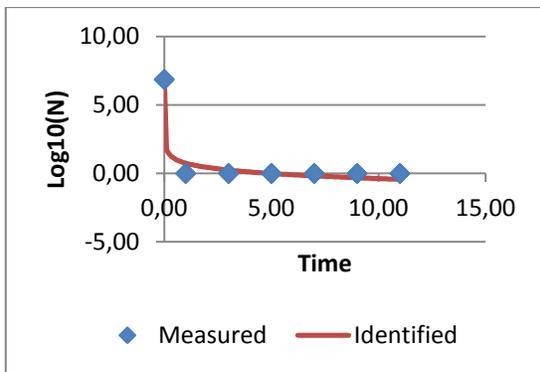
Hipoclorito de sodio 1000 ppm



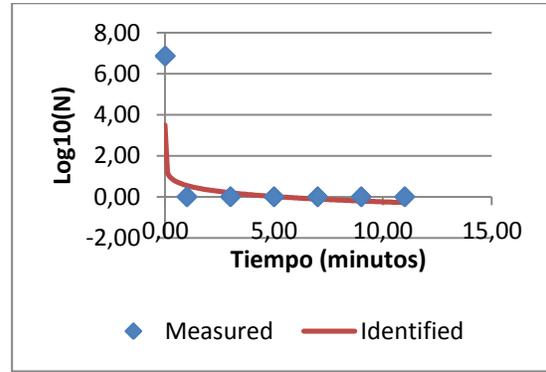
Log_Linear



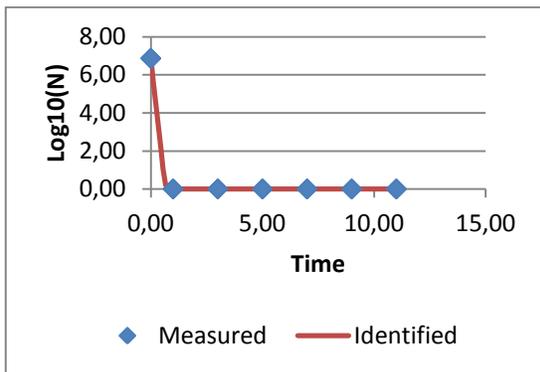
Geeraerd_Shoulder_Tail



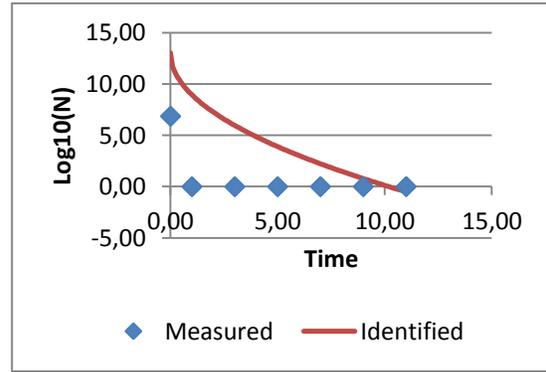
Geeraerd_Shoulder



Weibull

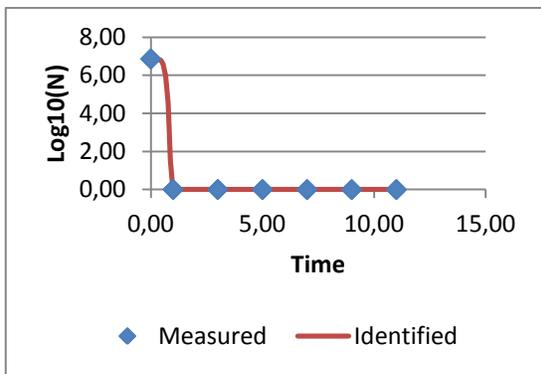


Geeraerd_Tail

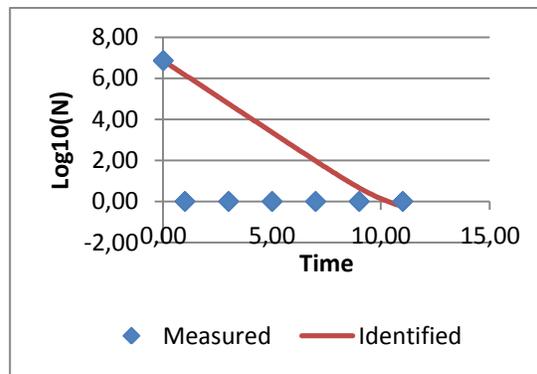


Weibull_Fixed

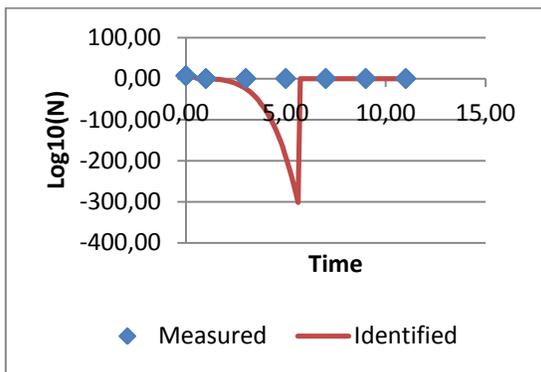
ANEXO G: Curvas de muerte para cada concentración de sanitizante con GInaFiT.



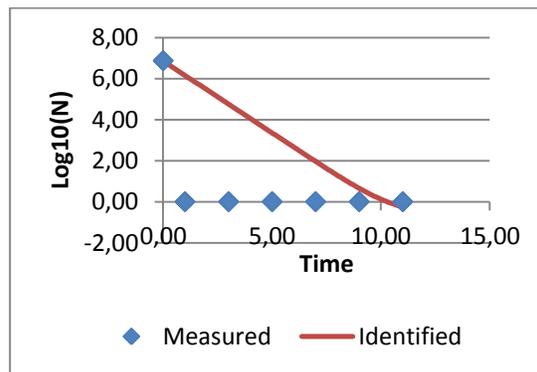
Albert



Biphasic

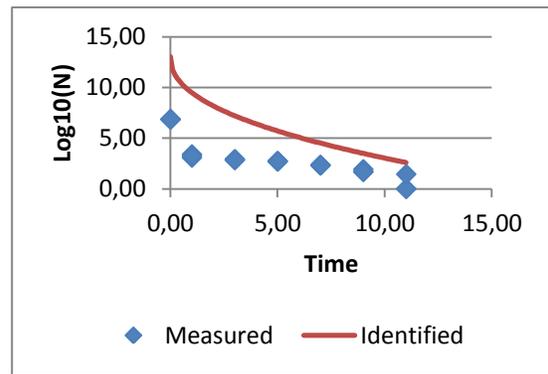
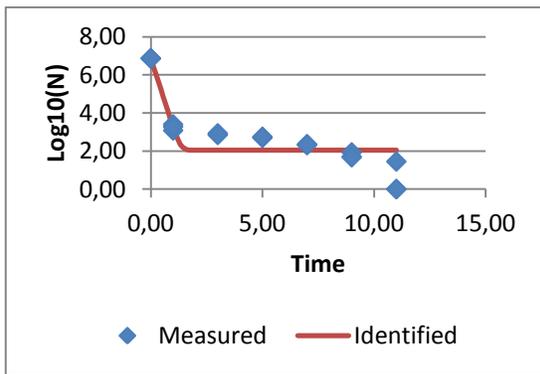
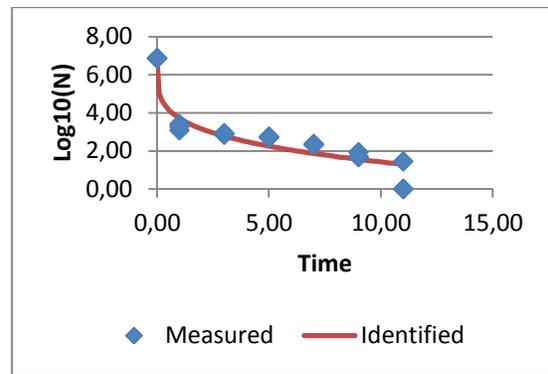
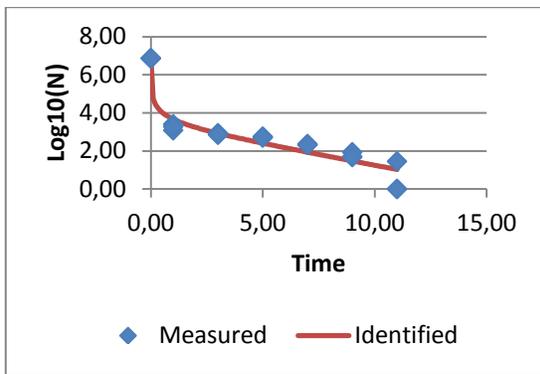
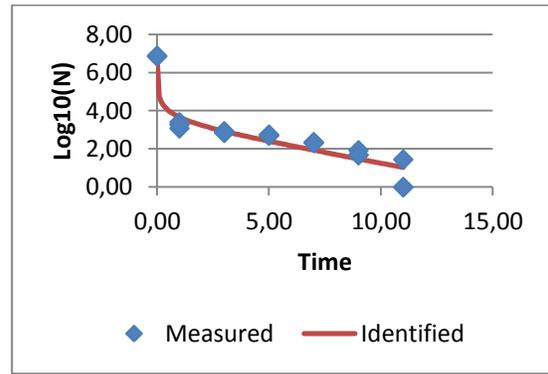
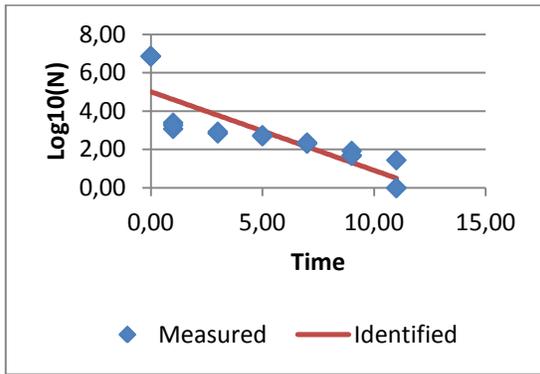


Corroler

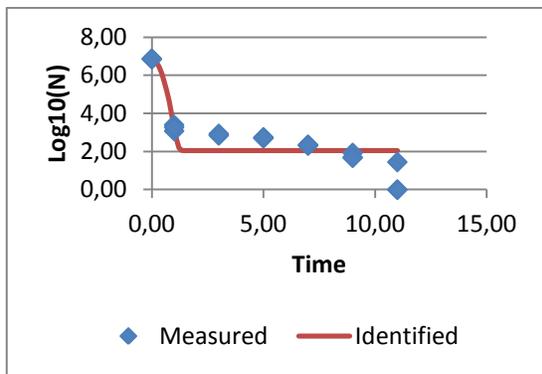


BiphasicShoulder

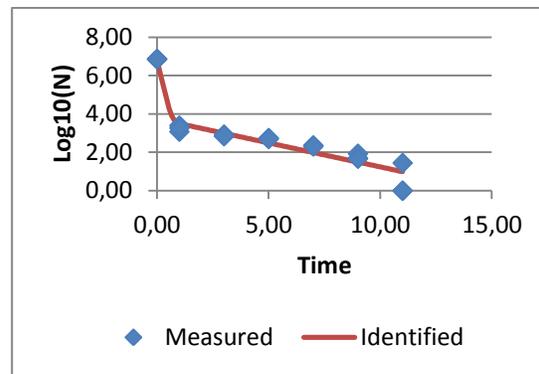
Hipoclorito de sodio 500 ppm



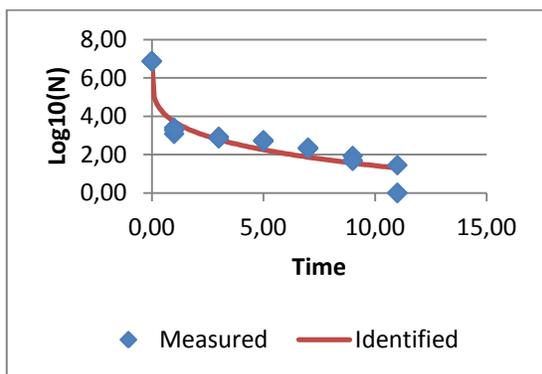
ANEXO G: Curvas de muerte para cada concentración de sanitizante con GInaFiT.



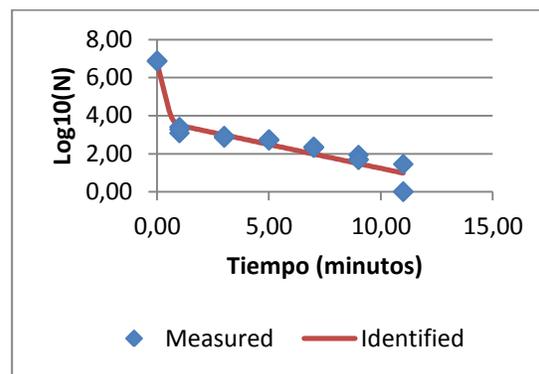
Albert



Biphasic

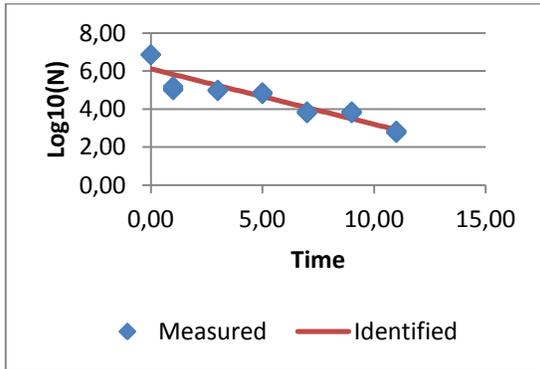


Corroler

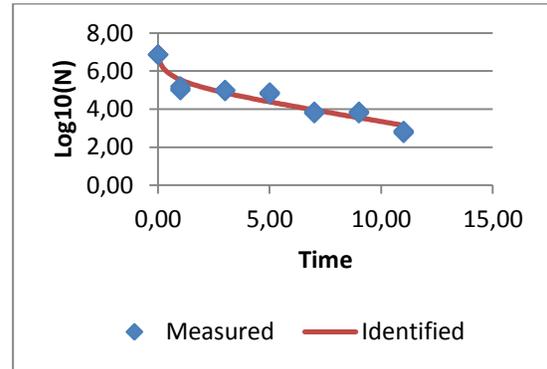


BiphasicShoulder

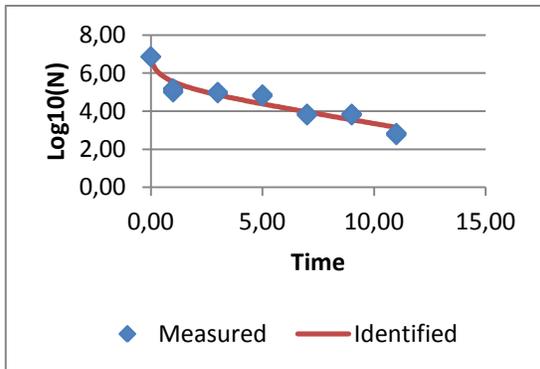
Hipoclorito de sodio 200 ppm



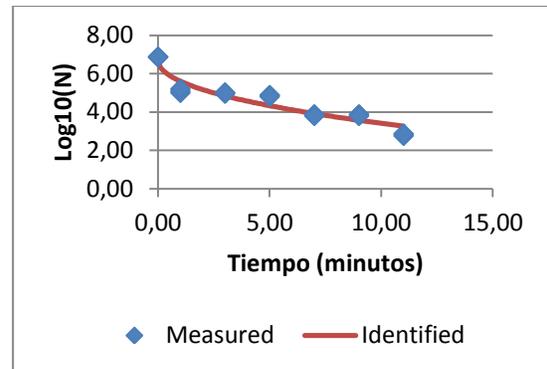
Log_Linear



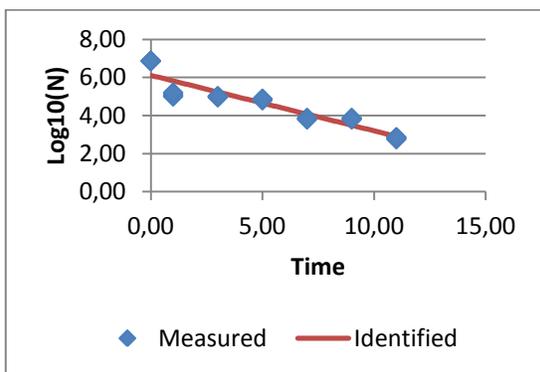
Geeraerd_Shoulder_Tail



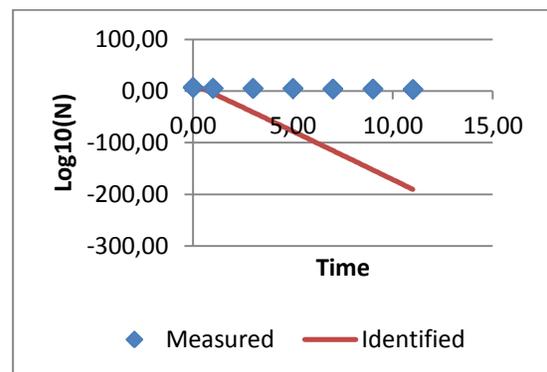
Geeraerd_Shoulder



Weibull

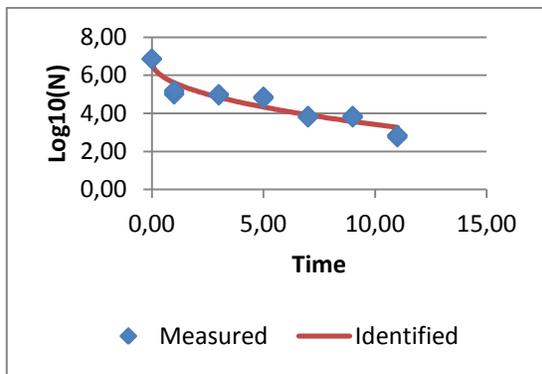


Geeraerd_Tail

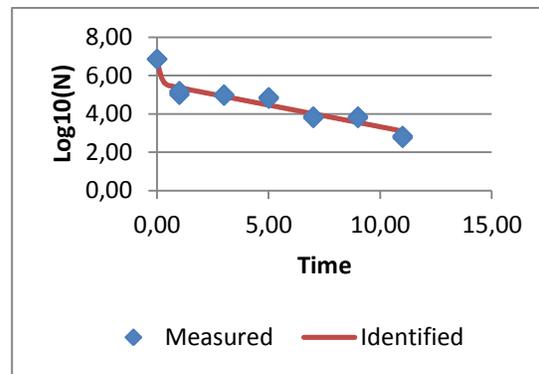


Weibull_Fixed

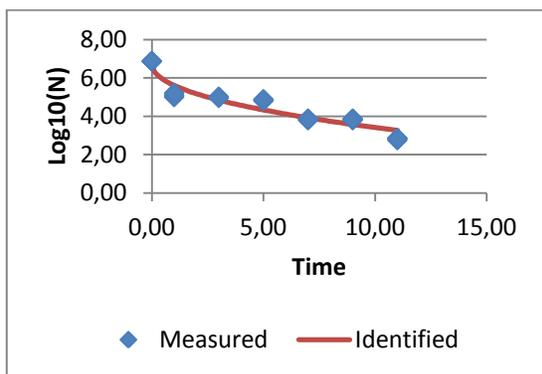
ANEXO G: Curvas de muerte para cada concentración de sanitizante con GInaFiT.



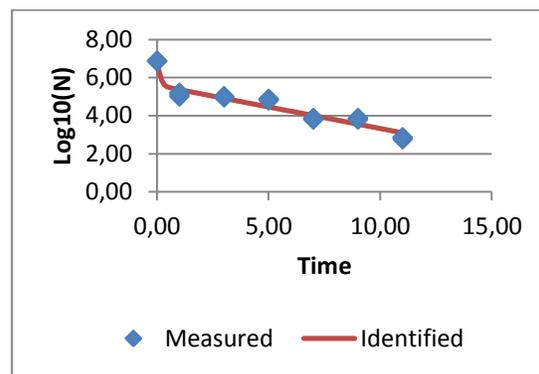
Albert



Biphasic

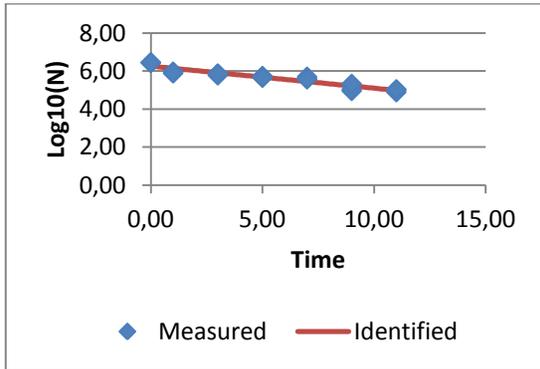


Corroler

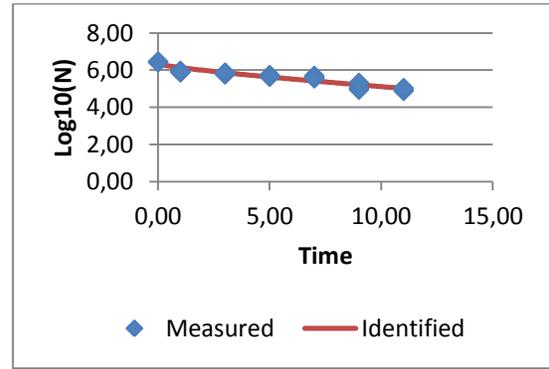


BiphasicShoulder

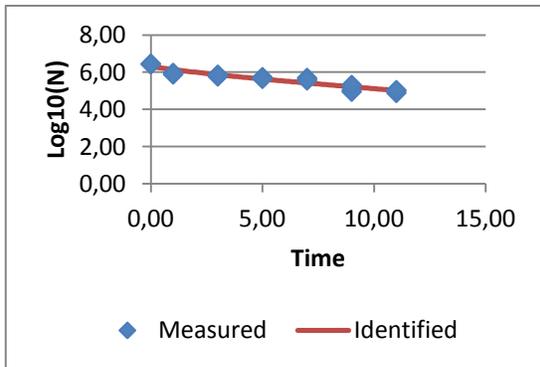
Hipoclorito de sodio 100 ppm



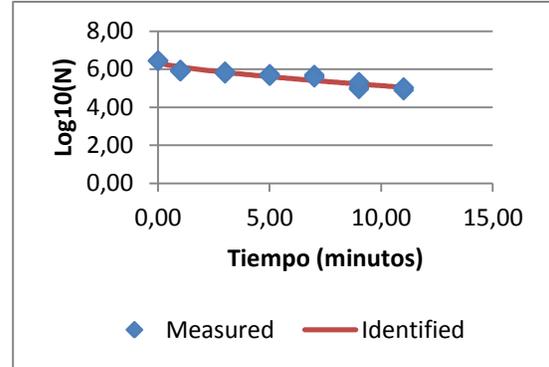
Log_Linear



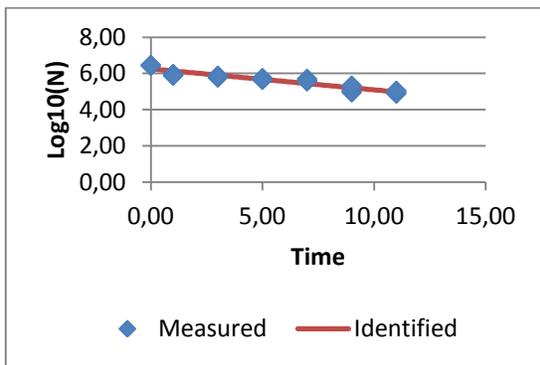
Geeraerd_Shoulder_Tail



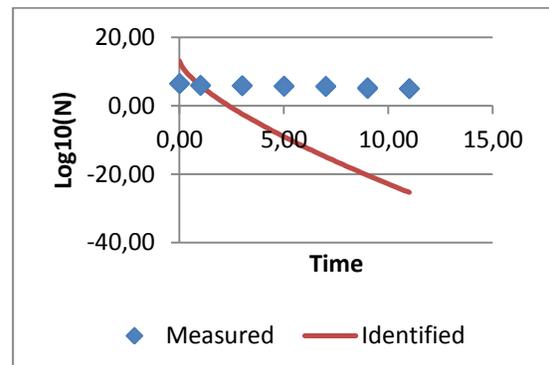
Geeraerd_Shoulder



Weibull

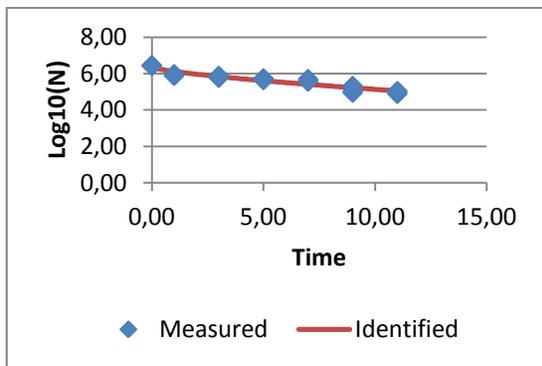


Geeraerd_Tail

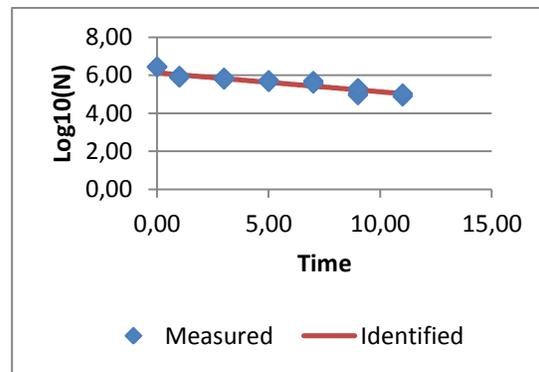


Weibull_Fixed

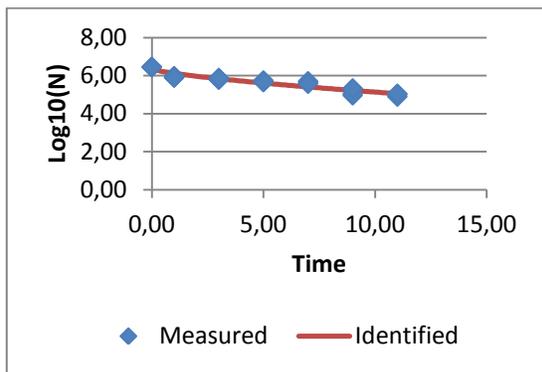
ANEXO G: Curvas de muerte para cada concentración de sanitizante con GInaFiT.



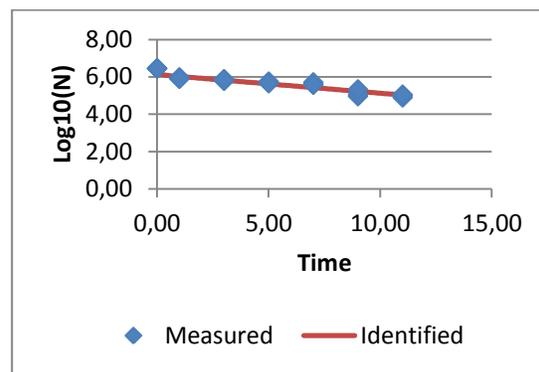
Albert



Biphasic

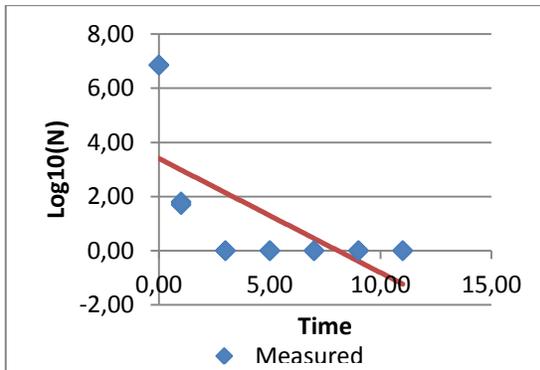


Corroler

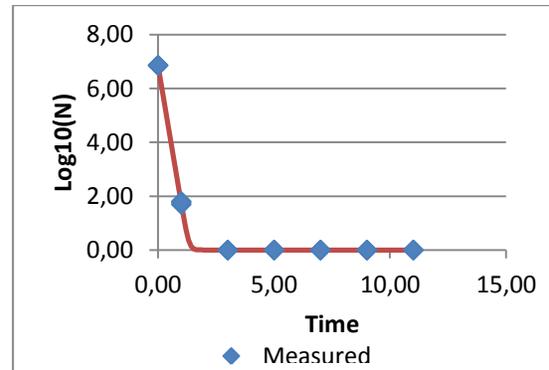


BiphasicShoulder

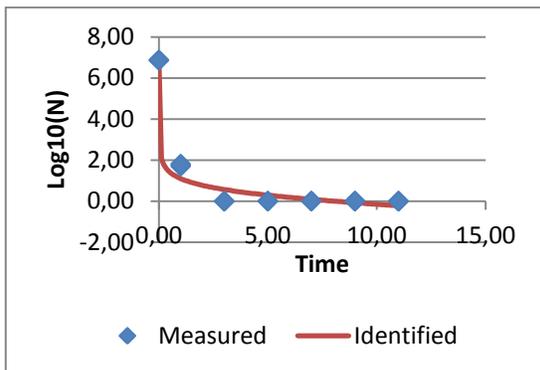
Ácido peracético 1000 ppm



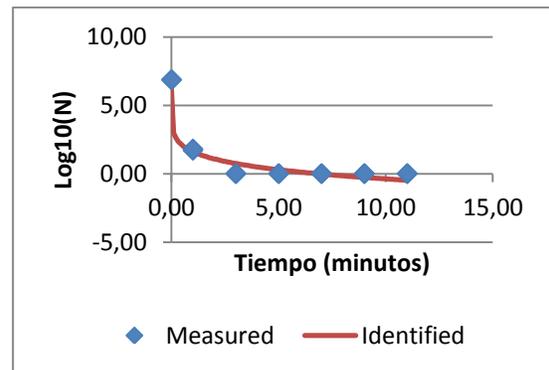
Log_Linear



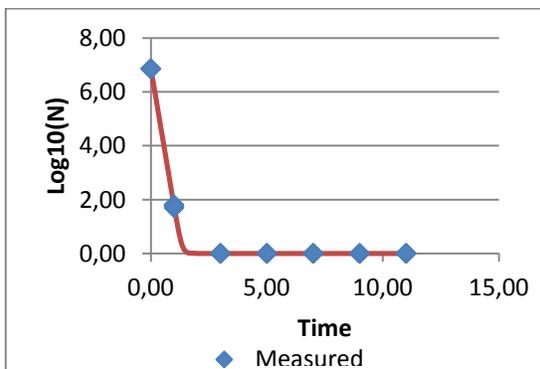
Geeraerd_Shoulder_Tail



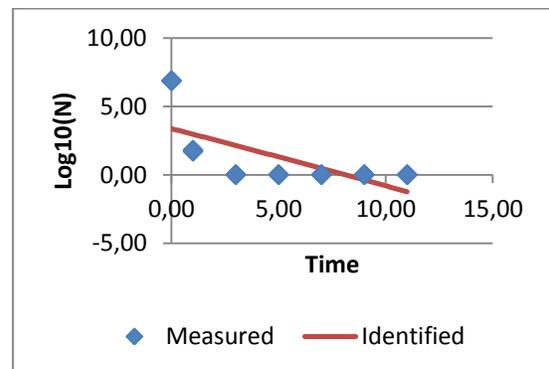
Geeraerd_Shoulder



Weibull

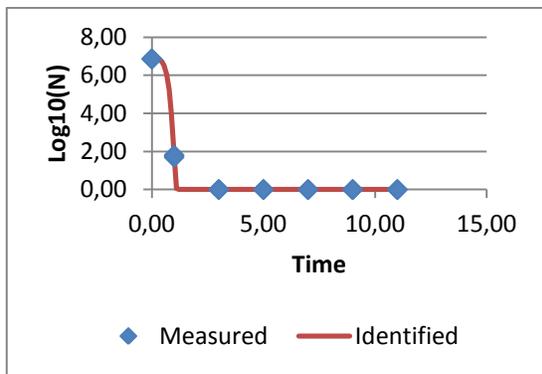


Geeraerd_Tail

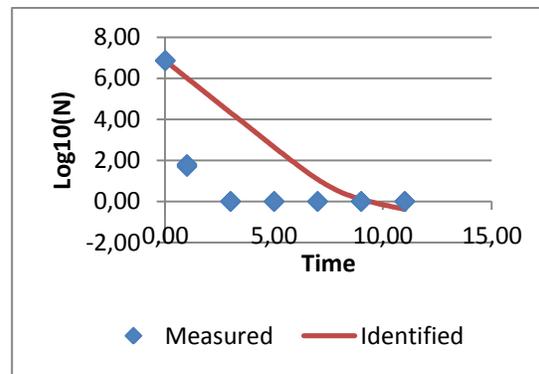


Weibull_Fixed

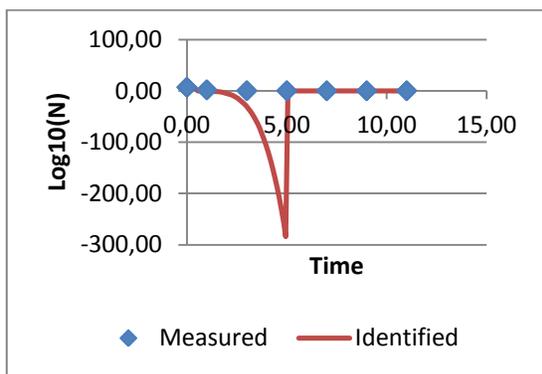
ANEXO G: Curvas de muerte para cada concentración de sanitizante con GInaFiT.



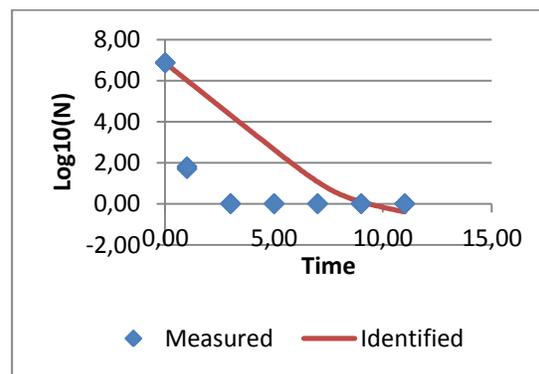
Albert



Biphasic

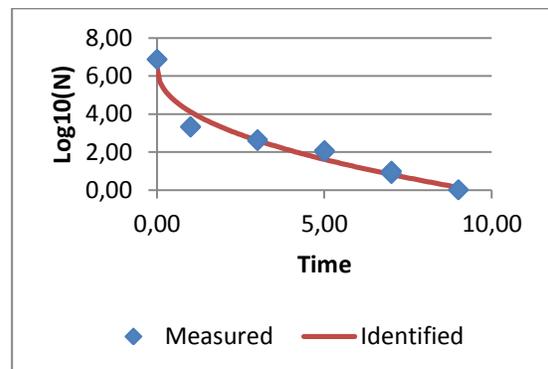
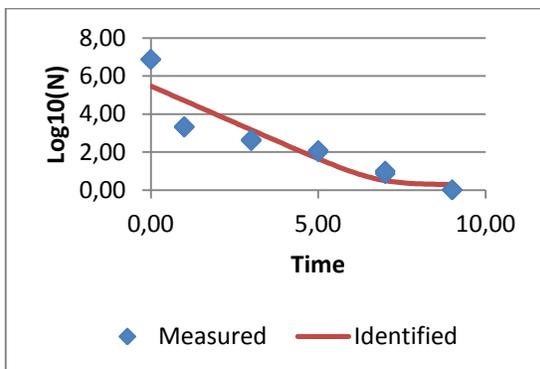
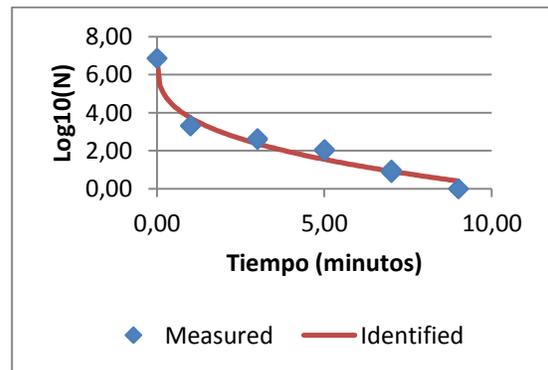
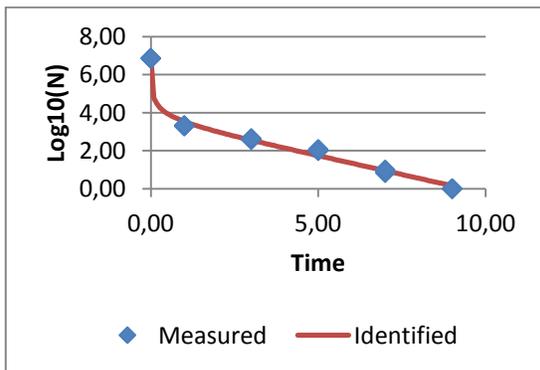
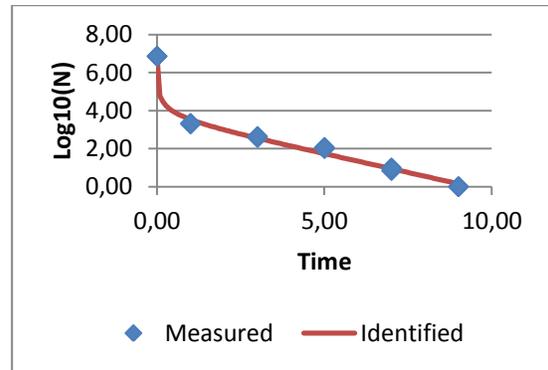
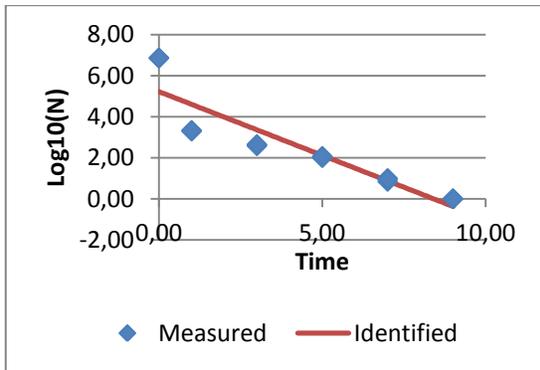


Corroller

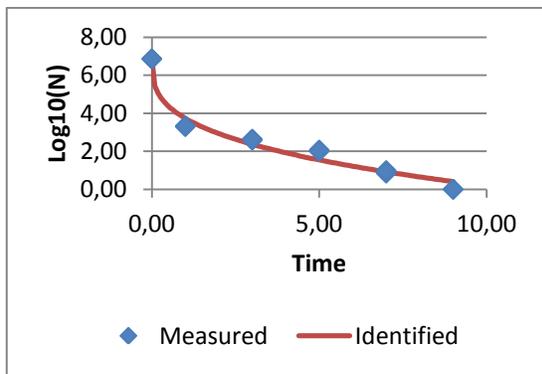


BiphasicShoulder

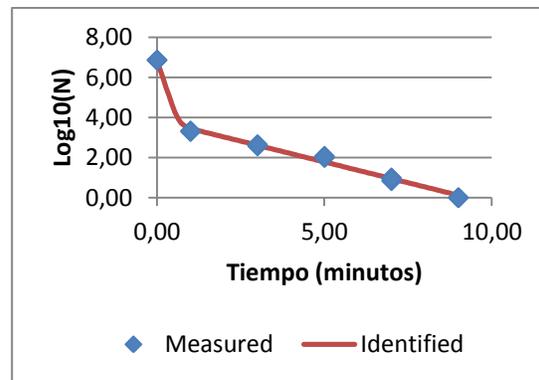
Ácido peracético 500 ppm



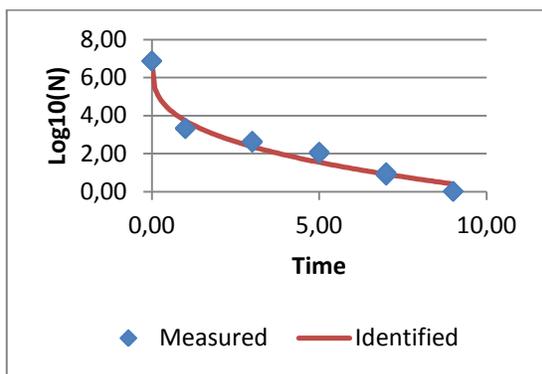
ANEXO G: Curvas de muerte para cada concentración de sanitizante con GInaFiT.



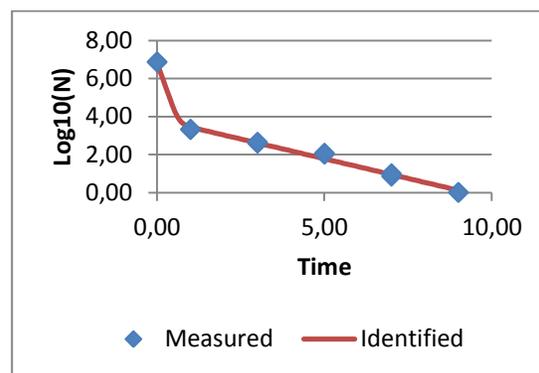
Albert



Biphasic

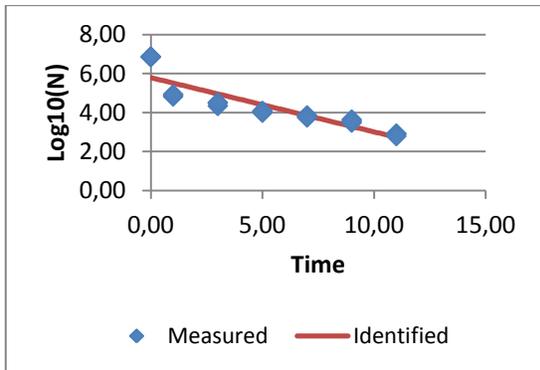


Corroler

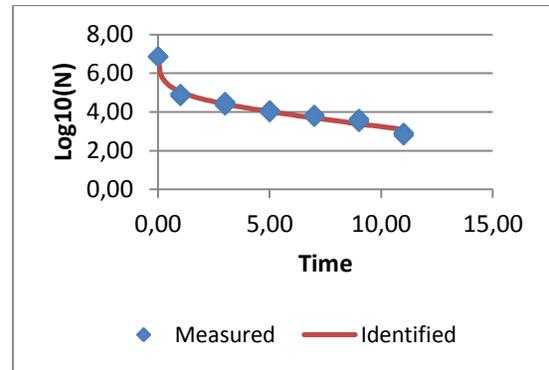


BiphasicShoulder

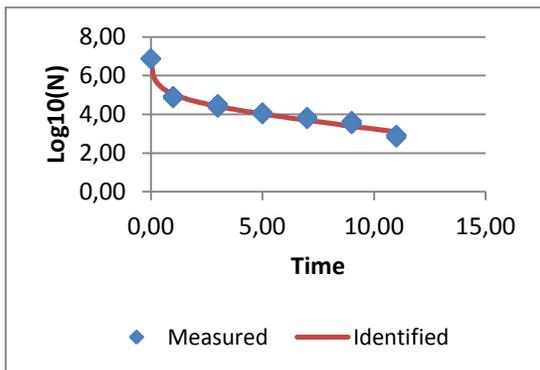
Ácido peracético 200 ppm



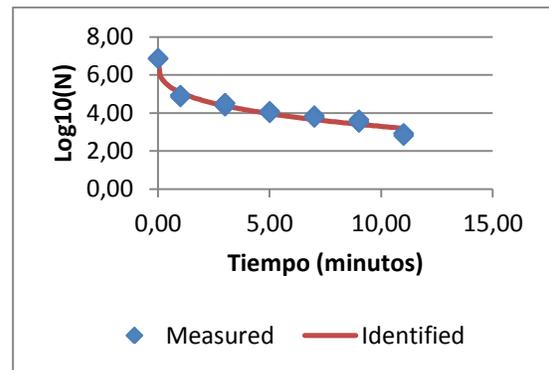
Log_Linear



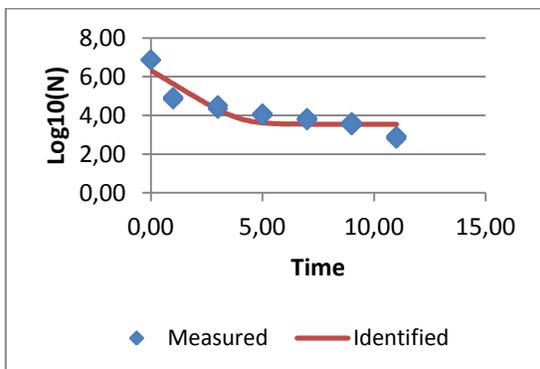
Geeraerd_Shoulder_Tail



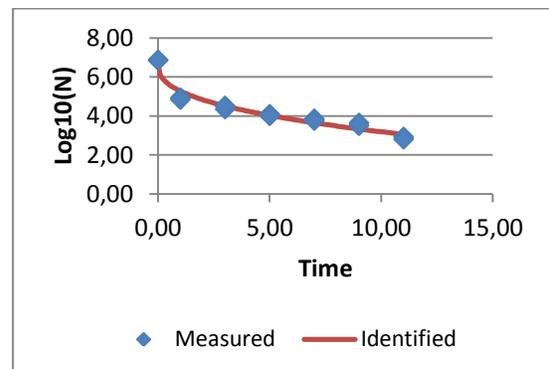
Geeraerd_Shoulder



Weibull

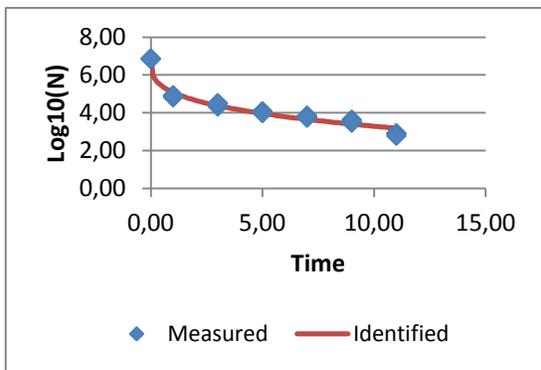


Geeraerd_Tail

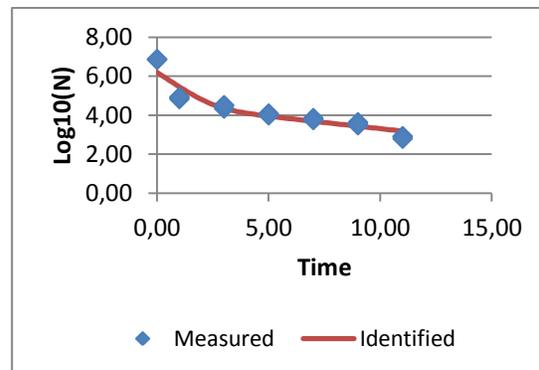


Weibull_Fixed

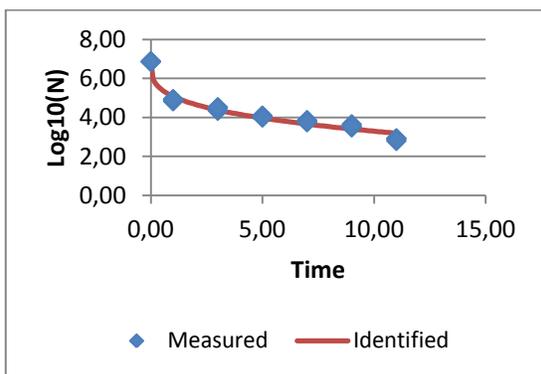
ANEXO G: Curvas de muerte para cada concentración de sanitizante con GInaFiT.



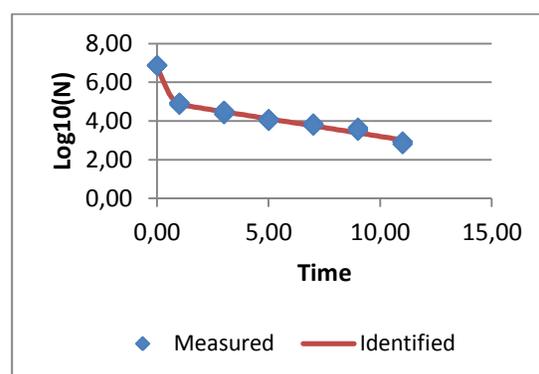
Albert



Biphasic

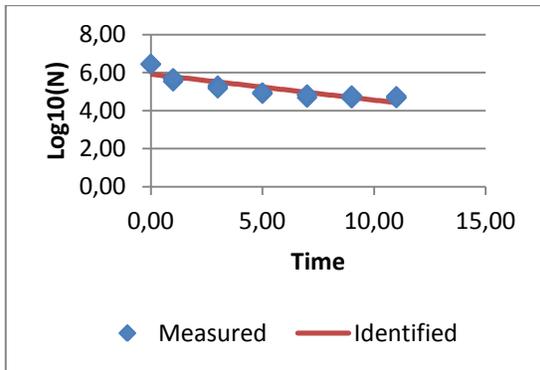


Corroler

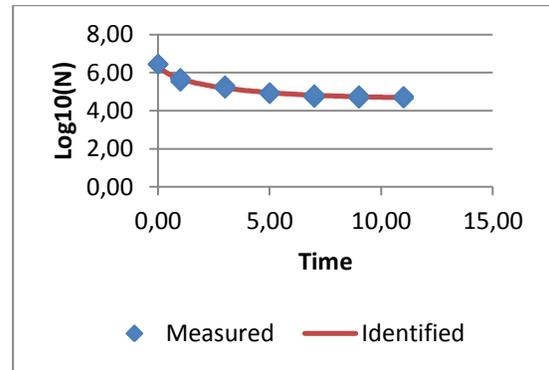


BiphasicShoulder

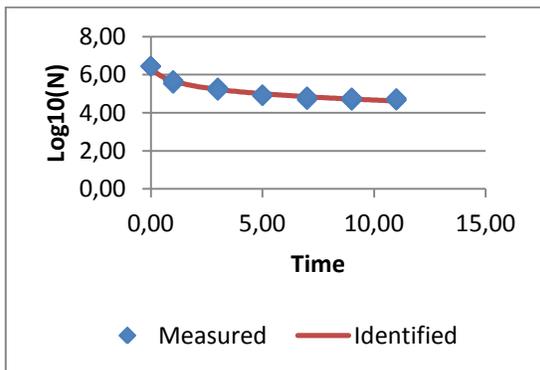
Ácido peracético 100 ppm



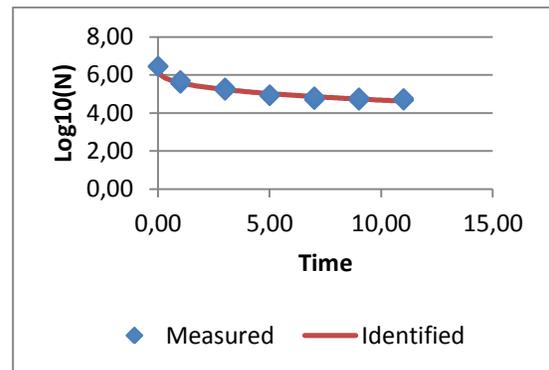
Log_Linear



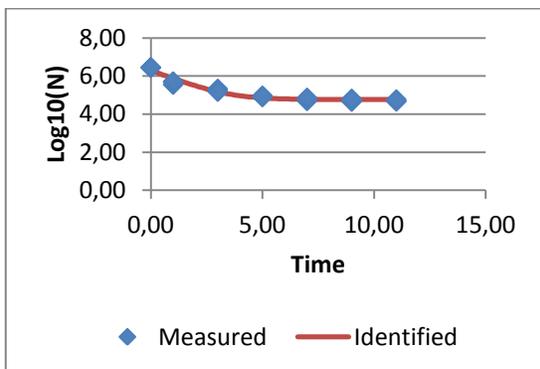
Geeraerd_Shoulder_Tail



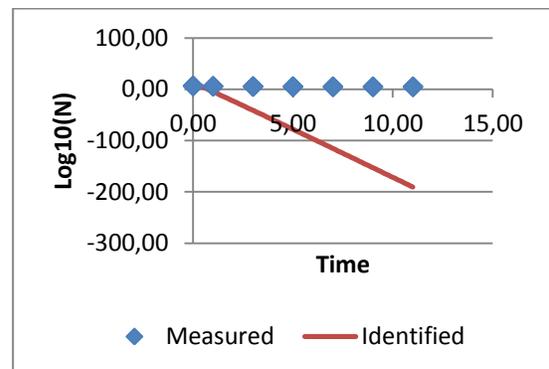
Geeraerd_Shoulder



Weibull

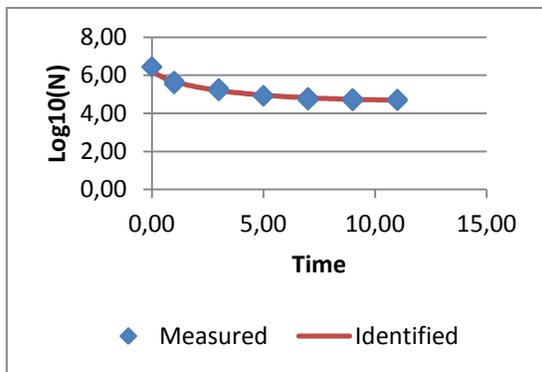


Geeraerd_Tail

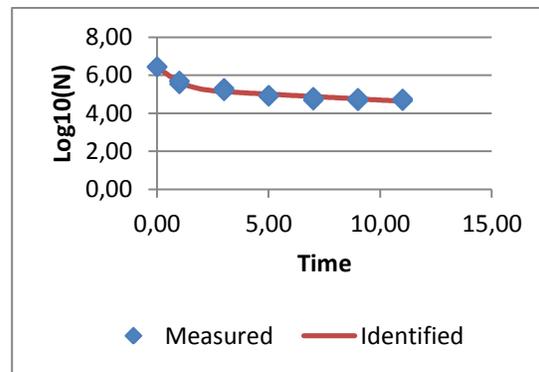


Weibull_Fixed

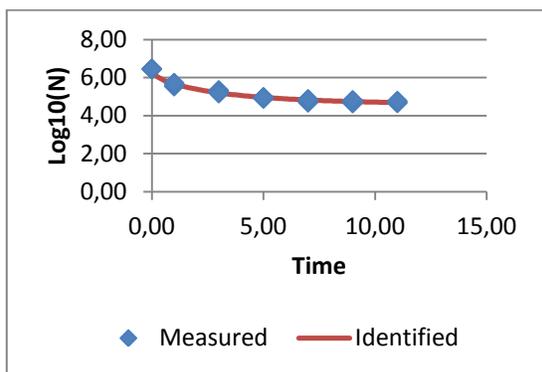
ANEXO G: Curvas de muerte para cada concentración de sanitizante con GInaFiT.



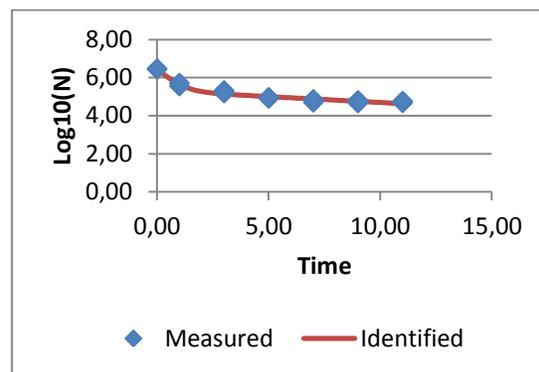
Albert



Biphasic



Corroler



BiphasicShoulder