



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE
QUESOS FRESCOS COMERCIALIZADOS EN UN MERCADO DE
LA PROVINCIA DEL GUAYAS Y PRODUCIDOS EN UNA
QUESERA ARTESANAL DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

AUTORAS: EVELYN JARITZA BAQUE LÓPEZ

KATINA PAMELA CHUGCHILAN VEINTIMILLA

DIRECTORA: Ing. PAOLA FERNANDA ARGUELLO HERNÁNDEZ M.Sc.

RIOBAMBA – ECUADOR

2019

@2019, Evelyn Jaritza Baque López; Katina Pamela Chugchilán Veintimilla

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: “**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE QUESOS FRESCOS COMERCIALIZADOS EN UN MERCADO DE LA PROVINCIA DEL GUAYAS Y PRODUCIDOS EN UNA QUESERA ARTESANAL DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO**”, de responsabilidad de las señoritas Evelyn Jaritza Baque López y Katina Pamela Chugchilán Veintimilla, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. Paola Fernanda Arguello Hernández

**DIRECTORA DEL TRABAJO
DE TITULACION**

Dra. Janneth María Gallegos Núñez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Nosotras, Evelyn Jaritza Baque López y Katina Pamela Chugchilán Veintimilla, somos responsables de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Evelyn Jaritza Baque López
Katina Pamela Chugchilán Veintimilla

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a familia quienes han sido parte importante de mi desarrollo académico y personal, pero principalmente quiero dedicarlo a mi madre, padre y a mi tía Edita, por su paciencia, por confiar en mí, en mis anhelos y continuar apoyándome en cada aspecto de mi vida.

A Xiomara y Andrea quienes siempre me levantan el ánimo y llenan mi vida de risas pintándole color a mis días grises.

A Sebastián, por su cariño y apoyo durante los momentos de crisis y porque sé que tú puedes también.

A todos quienes cumplen sus sueños y continúan soñando

Evelyn

A mi Madre que fue una mujer que me llenó de orgullo, fortaleza y disciplina, te amo y no habrá manera de devolver todo lo que me brindaste. Aunque después de tu partida todo parecía derrumbarse, pero en esos momentos comprendí que el amor de una madre va más allá de la muerte, esta tesis representa un homenaje a la mejor mujer, madre y amiga, hoy puedo decir con orgullo lo logramos mi amada Judith, gracias por creer en mí.

Katina

AGRADECIMIENTO

Los maestros son pilares importantes durante la formación profesional, capaces de marcar huellas en el desarrollo humano del estudiante, no obstante, la gratitud es un término poco asociado cuando se trata de valorar la dedicación puesta en su trabajo. Por ello, agradecemos infinitamente a nuestra directora, Ing. Paola Arguello, su paciencia y permitirnos formar parte de esta maravillosa experiencia, pero sobre todo por inspirarnos a ser mejores cada día.

Agradecemos también a la Dra. Janneth Gallegos, por su inmenso aporte de conocimientos, así como a los miembros del grupo de investigación SAGID por el apoyo y colaboración brindado durante cada etapa hasta la culminación de esta investigación.

A nuestros padres y familiares quienes comprenden la ausencia que muchas veces está ligada a alcanzar y cumplir las metas. Por darnos alas y enseñarnos que cuando se trata de soñar, el límite es el cielo, pero que el arduo esfuerzo es ese aliado silencioso que nos acompaña a conseguirlos un paso a la vez. Éste es el primero de tantos.

A todos quienes hicieron esto posible ¡Muchas gracias!

Evelyn y Katina

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

SUMMARY

INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	3
Objetivo General	3
Objetivos Específicos:	3

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Bases teóricas	4
1.1.1 Leche	4
1.1.2 Derivados lácteos.....	4
1.1.3 Quesos frescos	4
1.1.3.1 Composición química del queso fresco	5
1.1.3.2 Proceso de elaboración de quesos frescos	5
1.1.3.3 Calidad de los quesos frescos	6
1.1.3.4 Requisitos y microbiológicos	7
1.1.3.5 Factores que modifican las propiedades del queso fresco	8
1.1.4 Alimentos perecederos	9
1.1.5 Condiciones de transporte y almacenamiento del queso	10
1.1.5.1 Almacenamiento.....	10
1.1.5.2 Alimentos de alto riesgo.....	10
1.1.6 Influencia de la cadena de frío.....	11
1.1.6.1 Mantenimiento de la cadena frío	11
1.1.6.2 Trazabilidad.....	11
1.1.7 Enfermedades de transmisión alimentaria	12
1.1.7.1 Intoxicaciones alimentarias	12
1.1.7.2 Infecciones alimentarias	12
1.1.7.3 Factores causantes de la aparición de las ETA.....	13
1.1.7.4 Principales agentes causantes	13
1.1.7.5 Microorganismos indicadores de la calidad sanitaria de alimentos.....	13
1.1.7.6 ETA: un problema de salud	14

1.1.8	Queseras artesanales en el Ecuador	15
1.1.9	Seguridad alimentaria	16

CAPÍTULO II

2.	METODOLOGÍA.....	18
2.1	Lugar de la investigación.....	18
2.2	Factores de estudio	18
2.2.1	Población	18
2.2.2	Muestra	18
2.3	Materiales, equipos y reactivos	19
2.3.1	Materia prima	19
2.3.2	Análisis físico-químicos	19
2.3.3	Análisis microbiológico.....	20
2.4	Técnicas y métodos	21
2.5	Análisis físico-químicos	21
2.5.1	Análisis de pH	21
2.5.2	Análisis de acidez titulable	21
2.5.3	Actividad de agua	22
2.5.4	Temperatura.....	22
2.6	Análisis microbiológicos	23
2.6.1	Preparación de las muestras.....	23
2.6.2	Preparación de las diluciones decimales.....	23
2.6.3	Determinación de bacterias <i>E. coli</i> /coliformes, Enterobacterias y <i>Staphylococcus aureus</i> por la técnica de Petrifilm según 3M	23
2.6.3.1	Inoculación de las muestras	23
2.6.3.2	Lectura e interpretación	24

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	25
3.1	Flujograma de proceso de elaboración de queso	25
3.2	Resultados de los análisis físico-químicos de quesos frescos desde su producción en planta, el transporte al lugar de expendio y comercialización	27
3.3	Resultados del análisis microbiológico de quesos frescos desde su producción en planta, el transporte al lugar de expendio y comercialización.....	30
3.3.1	Relación crecimiento microbiano-temperatura-tiempo	30

3.3.2	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
3.3.3	Recuento de Enterobacteriaceas	32
3.3.4	Recuento de Coliformes totales.....	34
3.3.5	Recuento de <i>Escherichia coli</i>	34
	CONCLUSIONES	36
	RECOMENDACIONES	37
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación y designación de los quesos.....	5
Tabla 2-1: Composición nutricional del queso blanco.....	5
Tabla 3-1: Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados.....	7
Tabla 4-1: Alimentos de alto riesgo.....	10
Tabla 5-1: Beneficios que aporta el sistema de trazabilidad.....	12
Tabla 1-2: Condiciones de incubación de acuerdo con el microorganismo.....	24
Tabla 1-3: Puntos de contaminación, tiempo transcurrido y potenciales factores de contaminación durante la elaboración de queso fresco.	26
Tabla 2-3: Resultados de análisis físico-químicos en quesos frescos durante 3 etapas	28
Tabla 3-3: Análisis microbiológico de quesos frescos desde su producción en planta, el transporte al lugar de expendio y comercialización	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Proceso general de elaboración de quesos frescos	6
Figura 1-2: Proceso general de toma de muestra en los tres puntos de evaluación.....	19
Figura 1-3: Elaboración de queso para ser comercializado en la ciudad de Milagro, desde la recepción de la leche hasta su comercialización.....	25

INDICE DE ANEXOS

Anexo A. Recuento microbiano de *S. aureus*

Anexo B. Recuento microbiano de Enterobacterias

Anexo C. Recuento microbiano de *E. coli*/Coliformes totales

Anexo D. Análisis fisicoquímicos

Anexo E. Condiciones de transporte y expendio de las muestras

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la calidad microbiológica de quesos frescos comercializados en un mercado de la provincia del Guayas y producidos en una quesera artesanal de la provincia de Chimborazo. Se evaluaron 72 muestras de quesos frescos de 700 g, los puntos de muestreo fueron: la planta de producción, el camión de transporte a su arribo al Mercado Popular ubicado en el cantón Milagro-Guayas y en local de comercialización. Se midieron los parámetros físico químicos (pH, acidez, a_w , temperatura) y los recuentos microbiológicos de indicadores de calidad (*Coliformes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacterias*) utilizando placas Petrifilm. Se determinó los potenciales puntos de contaminación en las diferentes etapas y el tiempo transcurrido entre las mismas, a través de la observación directa del proceso desde la recepción de la materia prima hasta la comercialización del producto final. Los resultados del recuento de *Staphylococcus aureus* ($5.07 \pm 0.06 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$) en planta fueron mayores a lo encontrado en la misma etapa para Enterobacterias ($4.33 \pm 0.06 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$), seguido de coliformes ($4.27 \pm 0.03 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$) y finalmente *E. coli* ($4.03 \pm 0.03 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$), los cuales presentaron incrementos en las etapas consecutivas, corroborándose con los resultados de acidez y pH debido a las condiciones de temperatura de almacenamiento a la que son sometidos los quesos a lo largo de la cadena productiva así como la manipulación deficiente. En conclusión, los productos evaluados en esta investigación no cumplen con los requisitos de calidad microbiológica estipulados en la NTE INEN 1528, por lo que se recomienda mejorar los procesos de manufactura en la quesera y favorecer su transporte en refrigeración hasta los diferentes sitios de comercialización.

PALABRAS CLAVES: <BIOQUÍMICA>, <MICROBIOLOGÍA>, <CALIDAD MICROBIOLÓGICA>, <QUESERA ARTESANAL>, <SEGURIDAD ALIMENTARIA>, <ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO>, <ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO>, <QUÍMAG (PARROQUIA)>, <RIOBAMBA (CANTÓN)>.

SUMMARY

The objective of this research work was to evaluate the microbiological quality of fresh cheeses marketed in a Guayas- Province Market, which were produced in an artisanal cheese industry of the Chimborazo Province. 72 samples of 700g fresh cheeses were evaluated, the sampling points were: the production plant, the delivery truck to the popular market located in the Milagro-Guayas Canton and the local marketing. The Chemical Physical parameters were measured (pH, acidity, a, temperature) and counts quality indicators (coliforms, *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteria*) using Petrifilm plates. It was determined the potential contamination points in the different stages and time elapsed between them, through direct observation from the process the beginning of the raw material until the final product is marketed. The count results of *Staphylococcus aureus* ($5.07 \pm 0.06 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$) in plant were greater what was found in the same stage for *Enterobacterias* ($4.33 \pm 0.06 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$), followed by coliforms ($4.27 \pm 0.03 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$) and finally *E. coli* ($4.03 \pm 0.03 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$), which showed increases in the consecutive stages, corroborating with the acidity results and pH due to the temperatura conditions of storage to which the cheeses are subjected throughout the productive chain as well as poor handling. In conclusion, the products evaluated in this research don't meet the requirements of microbiological quality stipulated in the NTE INEN 1528, so it is recommended to improve the manufacturing processes in the cheese and favor refrigerated transportation to marketed places.

KEY WORDS: <BIOCHEMISTRY>, <MICROBIOLOGY>, <MICROBIOLOGICAL QUALITY>, <ARTISAN CHEESE INDUSTRY>, <FOOD SECURITY>, <MICROBIOLOGICAL ANALYSIS>, <PHYSICAL-CHEMICAL ANALYSIS>, <QIMIAG (PARISH)>, <RIOBAMBA (CANTON)>

INTRODUCCIÓN

Por definición, la leche es considerada un alimento completo debido a la cantidad y calidad de los nutrientes que posee (Agudelo y Bedoya 2008, p.38). Sin embargo, este tipo de productos es susceptible de sufrir contaminación microbiana procedente de procesos como el ordeño, el transporte y la elaboración de subproductos. Las queseras con categoría artesanal en el país que cuentan con notificación sanitaria para cada uno de sus productos, han demostrado que cumplen con los requisitos microbiológicos para permitir su comercialización y consumo una vez que ha concluido el proceso de manufactura y empaçado, pero muchas veces estos productos son expendidos en diferentes zonas del país sin contar con las condiciones de transporte adecuados (Robalino 2014, p.14).

No es lo mismo evaluar la carga microbiana de los alimentos en la planta de origen que en los mercados, centros comerciales, tiendas y en otros lugares de expendio y adquisición cotidiana, pues en el primer caso, los productores cuidan y controlan los procesos de elaboración, mientras que, en el segundo caso las condiciones propias del medio pueden hacer que esta carga microbiana contraste con la primera (Muñoz, Rosero y Cabrera 2010, p.70).

El queso fresco, principal subproducto de la leche, por su origen animal representa el medio idóneo para el crecimiento y proliferación de gérmenes patógenos que pueden atentar contra la salud de los consumidores. La presencia o ausencia de estos, constituye un factor determinante de la calidad higiénico-sanitaria de los productos lácteos y consecuentemente de la posible aparición de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Cristobal y Maurtua 2003, p.159).

La mayoría de las ETAs son enfermedades agudas, es decir, se curan por si mismas y tienen corta duración, pero pueden ser consideradas graves en dependencia del agente causal siendo, para los productos lácteos, *E. coli*, *S. aureus*, *Brucella abortus*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* los principales responsables. Los síntomas que el individuo presenta varían de acuerdo con la causa, la duración de exposición y la cantidad del alimento consumido. La disentería, deshidratación, malestar abdominal, náuseas y vómitos son los primeros síntomas en aparecer (Kopper et al. 2009, pp.5-6).

Para evitar la transmisión de enfermedades por alimentos como la salmonelosis, listeriosis y brucelosis es fundamental evaluar la calidad de los productos que llegan a miles de hogares día con día, pues los consumidores tienen derecho a recibir productos de calidad, nutritivos, homogéneos, seguros independientemente de su producción (Hombre, Alvis-Bermudez y Garcia 2017, p.141).

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

En Ecuador, la norma NTE INEN 1528 (2012), establece los requisitos técnicos, específicos, microbiológicos necesarios para la producción del queso fresco, así como los requisitos complementarios del almacenamiento, distribución, comercialización y transporte de los mismos. El queso fresco, también conocido como queso blanco, por sus condiciones de manufactura está listo para su consumo inmediato pues no necesita someterse a un proceso previo de escaldado o maduración. Debido a estas características, el queso blanco precisa ser distribuido y transportado a su lugar de comercialización bajo condiciones de temperatura apropiadas para evitar la modificación tanto de sus características organolépticas como microbiológicas, aspectos que son fundamentales en la salud de los consumidores (Ramírez y Vélez 2014, pp.131-132) .

Por desconocimiento o aumento en los costos, las queseras artesanales suelen prescindir de la implementación de la llamada “cadena de frío”, proporcionando de esta manera las condiciones necesarias para la proliferación de microorganismos siendo de especial atención aquellos con capacidad patógena, lo que a su vez podría influir en el recuento de microbios benéficos como *Lactobacillus* y *Lactococcus* (Yoon, Lee y Choi 2016, P-202).

Es necesario considerar que algunas bacterias como *E. coli* pueden encontrarse presentes dentro del recuento máximo permitido y otras como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* deben estar completamente ausentes en el producto final (Ramírez y Vélez 2014, p-160).

Es importante entonces conocer la carga microbiana con la que los productos llegan a su sitio de comercialización, así como aquella que poseen antes de ser transportados, pues la evaluación de estos parámetros proporcionaría información útil para los organismos de control y así contribuiría a la disminución de la incidencia y efectos de ETAs.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

Evaluar la calidad microbiológica de quesos frescos comercializados en un mercado de la provincia del Guayas y producidos en una quesera artesanal de la provincia de Chimborazo.

Objetivos Específicos:

- Levantar el flujograma de proceso desde la recepción de la leche hasta la comercialización del producto terminado en un mercado de la ciudad de Milagro determinando los potenciales factores de contaminación y el tiempo transcurrido en las tres etapas de evaluación.
- Determinar las características fisicoquímicas: temperatura, actividad de agua, pH y acidez, en el producto terminado en la planta, después del transporte y en el lugar de comercialización permitiendo su comparación en función del tiempo.
- Cuantificar los microorganismos indicadores de calidad higiénica de los alimentos durante las tres etapas relativas a la investigación permitiendo su comparación en función del tiempo.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Bases teóricas

1.1.1 Leche

Es el producto de la secreción normal de las glándulas mamarias de animales bovinos sanos, obtenida mediante ordeños diarios, que además aporta nutrientes básicos para la alimentación humana (Agudelo y Bedoya 2008, p.38).

Cuando no es indicada la especie animal de la cual procede, se hace referencia a la leche de ganado bovino, mientras que la leche proveniente de una hembra lechera, ajena a la especie mencionada debe designarse por la denominación “leche” seguida de la especie animal de la cual proviene (Agudelo y Bedoya 2005, p.138).

1.1.2 Derivados lácteos

Son aquellos elaborados a partir de la leche entera, descremada o semi descremada usando procesos tecnológicos que mejoran y conservan las características sensoriales y nutrimentales de la materia prima empleando aditivos, emulsificantes o espesantes en su formulación para restituir o añadir consistencia al producto resultante. En dependencia del tipo de subproducto que se requiera obtener, el valor nutricional puede variar (Franklin et al. 2011, p.36).

1.1.3 Quesos frescos

Es el producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo (renina) o pepsina extraídas del estómago de bovinos y porcinos. (Franklin et al. 2011, p.36).

Son conocidos también como quesos blandos y se caracterizan por poseer un alto porcentaje de humedad y por lo tanto una vida de anaquel corta en ausencia de refrigeración (Franklin et al. 2011, p.36).

Tabla 1-1: Clasificación y designación de los quesos

De acuerdo con su dureza	Porcentaje de humedad sin materia grasa
Duros	≤ 55%
Semiduros	mayor de 55 % y menor de 65%
Blandos	≥ 65%
De acuerdo con el contenido de materia grasa	Porcentaje de grasa en el extracto seco
Ricos en grasa	≥ 60%
Extragrasos	menor que 60% y mayor o igual a 45%
Semigrasos	menor a 45% y mayor o igual de 25%
Pobres en grasa	menor a 25% y mayor a 10%
Desnatados	igual o menor a 10%.

Fuente: NTE INEN 0062:74. Quesos. Clasificación y designaciones

Realizado por: Evelyn Baque, 2018

1.1.3.1 Composición química del queso fresco

El queso se caracteriza por su importante aporte de proteínas de elevado valor nutricional, materia grasa, minerales como el sodio y calcio, además de un bajo contenido de lactosa (Astiazarán et al. 2003, pp. 16-17).

Tabla 2-1: Composición nutricional del queso blanco

Queso Por 100 g	Kcal	Proteínas (g)	Glúcidos (g)	Grasas (g)	Agua (g)
Queso fresco	121	8.2	3.1	8.0	77.9
Queso cottage	96	13.6	1.4	4.0	78.8
Queso cheddar	412	25.5	0.08	34.4	37.5
Parmesano	449	38.6	-	32.7	18.4

Fuente: Astiazarán et. al. 2003

1.1.3.2 Proceso de elaboración de quesos frescos

La transformación de la leche en queso involucra cambios bioquímicos y físicos complejos, llevado a cabo fundamentalmente en dos fases: la obtención de la cuajada y su maduración.

Estos procesos a su vez se pueden dividir en tres pasos esenciales:

- a) Formación del gel de caseína consiste en el cuajado o coagulación de la leche

- b) Deshidratación parcial de este gel por sinéresis, es decir, por contracción de las micelas que la forman.
- c) Desuerado de la cuajada

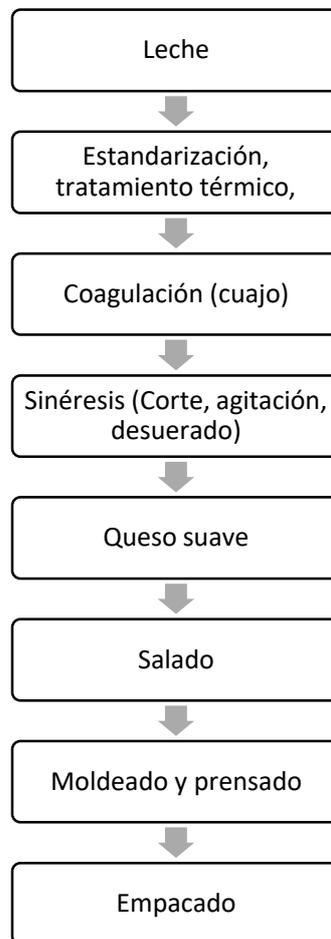


Figura 1-1: Proceso general de elaboración de quesos frescos

Fuente: Ramírez, Vélez 2012 (Procesos de elaboración de quesos frescos)

En la fabricación artesanal la cuajada se obtiene añadiendo el cuajo directamente a pequeños volúmenes de leche cruda pasteurizada. Las bacterias lácticas encontradas en la microbiota de la materia prima se encargan de la producción de ácido láctico a partir de la lactosa. Este ácido promueve la formación y desuerado de la cuajada, evita que crezcan en ésta microorganismos patógenos debido a que disminuye el pH a 5,0-5,2 y le confiere sabor ácido y aroma característicos (Parra 2010, p. 94).

Además, las bacterias contribuyen a la maduración del producto mediante la proteólisis y lipólisis (Gonzalez 2002, p.5).

1.1.3.3 Calidad de los quesos frescos

Cuando se trata de alimentos, la calidad no responde a criterios únicos sino a un extenso número de atributos y aspectos variables que incluyen las características físicas, químicas, organolépticas

e higiénico-sanitarias que satisfagan los requerimientos exigidos por normativas y consumidores (Ares [sin fecha], p.133).

Para obtener un producto de calidad, es necesario que se trabaje con materias primas inocuas, libre de contaminantes, atendiendo los requerimientos de la norma pertinente en el país (Villacís 2017, p.20). El proceso de elaboración debe también realizarse bajo un control estricto, que limite el crecimiento de microorganismos que representen un riesgo potencial a la salud de los consumidores (Agudelo y Bedoya 2008, p.38).

El control de la calidad e inocuidad de los alimentos es de obligatorio cumplimiento para los productores, ya que estos son controlados por los gobiernos como forma de prevenir las enfermedades de transmisión alimentaria (Martínez et al. 2013, p.211).

1.1.3.4 Requisitos y microbiológicos

Dependiendo de la naturaleza del producto pueden ser susceptibles de contaminarse con diferentes tipos de agentes que pueden alterar o no sus características sensoriales y microbiológicas. Para evitar riesgos de salud pública es importante la evaluación y control de alimentos de consumo popular y masivo como el queso fresco (Cristobal y Mautua 2003, p.159).

Los alimentos comercializados en cualquier establecimiento autorizado deben cumplir todas las normas higiénicas y sanitarias establecidas por las autoridades competentes. En el Ecuador la NTE INEN 1528 se encarga de regular los requisitos técnicos que deben cumplir estos productos, previo a ser distribuidos y comercializados.

Tabla 3-1: Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados

Requisito	N	m	M	c	Método de ensayo
<i>Enterobacteriaceas</i> , UFC/g	5	2x10 ²	10 ³	1	NTE INEN 1529-13
<i>Escherichia coli</i> , UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g	5	10	10 ²	1	NTE INEN 1529-14
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	AUSENCIA	-		ISO 11290-1
<i>Salmonella</i> en 25g	5	AUSENCIA	-	0	NTE INEN 1529-15

Fuente: Instituto ecuatoriano de normalización (NTE INEN 1528)

Donde

n= Número de muestras que deben analizarse.

c = Número de muestras que se permite que tengan un recuento mayor que m pero no mayor que M.

m= Recuento máximo recomendado.

M= Recuento máximo permitido.

1.1.3.5 Factores que modifican las propiedades del queso fresco

La interacción de las moléculas de caseína determina las propiedades de los quesos frescos, que pueden ser alteradas por factores como la distribución de la grasa y la humedad, el contenido de sal, la actividad de agua, el pH, la acidez e incluso condiciones de temperatura.

El uso de cuajo artesanal con propiedades proteolíticas mayores al de un cuajo comercial también es un factor significativo (Ramírez y Vélez 2014, p.140)

a. Cambios bioquímicos

La firmeza característica del queso y obtenida durante el proceso de coagulación puede verse afectada principalmente por dos factores: por acción de enzimas proteolíticas y por la pérdida de humedad.

En el primer caso, las enzimas actúan sobre la caseína provocando, además de la pérdida de firmeza, variación de características como el color, la textura y la elasticidad. Las concentraciones altas de cloruro de sodio en el alimento provocan un efecto similar. En cuanto a la pérdida de humedad, las proteínas tienden a perder hidratación, provocando que la firmeza de la matriz proteica del alimento registre un incremento.

La grasa y su correspondiente lisis provocan que el queso adopte una textura más firme, dura y rígida, pero si es agregado a la formulación de forma intencional, el queso presentará menor firmeza. La oxidación de las grasas, por exposición del alimento a la luz provoca cambios de coloración y aparición de aromas extraños (Ramírez y Vélez 2014, pp.141-142).

El pH también tiene efecto sobre la red de proteínas; si su valor es próximo al punto isoeléctrico, la red de proteínas se compacta dando lugar a un queso duro. No obstante, si el pH es mayor, los agregados de proteínas se repelen, lo que se traduce en un queso menos compacto y con mayor contenido de humedad (Ramírez y Vélez 2014, p.143).

Las bacterias patógenas y otros microorganismos asociados con el deterioro de los quesos crecen de manera óptima a valores de a_w entre 0,980 y 0,995, por lo que el valor mínimo de a_w para el crecimiento microbiano y la producción de toxinas se considera junto con la temperatura, como uno de los factores más importante en tecnología de conservación de alimentos.

La cantidad de agua disponible en el queso se evapora de manera continua, con lentitud y a medida que se pierde agua, disminuye la relación entre el contenido del agua y el de sólidos no solubles, promoviendo interacciones agua-caseína. Estas interacciones disminuyen la relación entre el agua libre y el agua no disponible; por lo tanto, disminuye la actividad de agua (Portal Lechero, 2005).

b. Cambios causados por microorganismos

El queso fresco es un alimento clasificado como de alto contenido microbiano, pues provienen tanto de la flora autóctona como del medio en que se encuentra el producto. La cantidad de proteínas y carbohidratos que posee, constituyen un sustrato favorable para el desarrollo de los microorganismos (Kopper et al. 2009, p.18).

Una contaminación mínima de estos alimentos los puede transformar, con una temperatura favorable y un tiempo de incubación adecuado, en un alimento infeccioso o intoxicante. El uso de microorganismos como iniciadores de la fermentación, también afecta a la textura y características funcionales del queso, provocando mayor producción de ácido capaz de afectar a la red de proteínas y con ello a su capacidad de retener agua (Ramirez y Vélez 2014, p.143).

1.1.4 Alimentos perecederos

Son llamados alimentos perecederos aquellos que por sus características requieren condiciones especiales para su conservación en los periodos de almacenamiento y transporte.

Los alimentos perecederos inician su descomposición de manera rápida por lo que necesitan ser transportados en vehículos a temperatura controlada y deben ser consumidos en un periodo determinado, pues por su composición química relativamente alta en humedad son fácilmente afectados por microorganismos capaces de deteriorar sus características físicas, químicas y nutricionales (Manteca 2003, p.3).

1.1.5 Condiciones de transporte y almacenamiento del queso

Se debe tener presente que en los lácteos no tiene sentido la fecha de caducidad, si no se la asocia a su historia térmica y trazabilidad (Domínguez, García y Arias 2009, p.2).

El transporte es sin duda el eslabón más delicado de la cadena del frío. En el caso de productos congelados deben tomarse medidas diferentes en función de los productos, los embalados suelen tener pocos problemas, salvo los desescarches que se tienden a acortar su tiempo y programarlos por diferencias de presión del aire en las baterías de enfriamiento. Los productos alimenticios transportados a granel, pueden tener ciertos problemas, sobre todo con alimentos de grandes dimensiones (Domínguez, García y Arias 2009, p.7).

En algunos productos refrigerados puede haber problemas durante el transporte por la incompatibilidad de los productos, por contaminación de olores o por aceleraciones de la maduración o por fragilidad de los propios productos (Domínguez, García y Arias 2009, p.7).

1.1.5.1 Almacenamiento

Almacenar de manera correcta los productos alimenticios garantiza el mantenimiento de las características del producto, además de evitar una posible contaminación cruzada, contaminación química y aumento en el crecimiento microbiano. La contaminación cruzada se puede dar cuando un agente patógeno es transportado por parte de los manipuladores a los alimentos y también de forma directa de alimento contaminado a otro no contaminado (García 2013, p.174).

1.1.5.2 Alimentos de alto riesgo

Son aquellos que, por su composición o forma de preparación, se consideran caldos de cultivo para colonización y multiplicación microbiana además se deterioran fácilmente, por lo que se recomienda tener precauciones con dichos alimentos en todas sus fases (García 2013, p.130).

Tabla 4-1: Alimentos de alto riesgo

Tipos de alimentos	Ejemplos
Leche y algunos derivados lácteos	Quesos frescos, requesón, cuajada, yogur, nata
Carnes y derivados	Pollo, pavo, pato, ternera o cerdo, carnes rojas
Hortalizas y verduras crudas	Lechuga, tomate, pepino
Pescados y mariscos	Ostras, moluscos.

Fuente: García, 2013

1.1.6 Influencia de la cadena de frío

El control de la cadena de frío, se define como la continuidad sucesiva para mantener una temperatura de almacenamiento adecuada de los alimentos, el cual garantiza la calidad y la inocuidad de productos alimenticios refrigerados durante todo el procesamiento, transporte, almacenamiento y distribución (Baldera et al. 2016, p.4).

Las primeras etapas que involucran la cadena de frío (procesamiento y distribución) en la mayoría de los casos se mantienen bajo control exitosamente, no obstante, a nivel minorista se ha evidenciado la mayor cantidad de abusos de temperatura, considerando uno de los puntos más débiles de controlar (Baldera et al. 2016, p.4).

Se considera importante mantener la temperatura de refrigeración en todas las etapas desde la recepción de la materia prima hasta la venta al consumidor final, tienen responsabilidad de asegurar que el producto llegue en excelentes condiciones al consumidor. El transporte es un eslabón importante en la cadena de frío y el transportista debe conocer el producto que transporta y la manera de transportarlo adecuadamente actuando en todo momento con profesionalidad (Manteca 2003, p.2).

1.1.6.1 Mantenimiento de la cadena frío

Los productos semielaborados, materias primas y productos terminados necesitan ser conservados a una temperatura adecuada, para impedir la proliferación de microorganismos perjudiciales y la producción de las toxinas en los alimentos, por lo cual es esencial el mantenimiento de la cadena de frío desde el momento de la elaboración de los productos hasta su llegada al consumidor, aunque en determinado momento se permita su ruptura momentánea por aspectos de manipulación siempre y cuando no se ponga en riesgo la salud.

En este sentido es importante mantener el control de los equipos de refrigeración, para prevenir posibles daños evitando que se rompa la cadena de frío (García 2013, p.174).

1.1.6.2 Trazabilidad

Como parte del aseguramiento de políticas alimentarias eficaces, es necesario la implementación de un sistema de trazabilidad o rastreabilidad de los alimentos, con el objetivo de dar seguimiento a un alimento a través de la cadena alimentaria, desde la recepción de la materia prima hasta la posterior distribución del producto (García 2013, p.129).

Tabla 5-1: Beneficios que aporta el sistema de trazabilidad

Para el operador para o empresa	Para el consumidor	Para las autoridades
Control de procesos	Aumento de la confianza	Facilitar el control oficial
Productos de calidad	Transparencia	Mayor eficacia en la gestión de incidencias
Servir de ayuda ante reclamaciones	Mayor información	Racionalización de recursos

Fuente: García, 2013

Por lo tanto, la trazabilidad permite localizar en cualquier momento, el recorrido y la ubicación del alimento, consolidándose como un mecanismo de control para la empresa, el consumidor y las autoridades sanitarias que, al detectar problemas con el producto fácilmente procederán a localizarlo y retirarlo del mercado (García 2013, p.130).

1.1.7 Enfermedades de transmisión alimentaria

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) se originan por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con agentes etiológicos en cantidades que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva (García 2013, p.142).

Se manifiesta mediante cuadros de diarreas y vómitos, aunque son capaces de provocar otros síntomas como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etc. Se clasifican en intoxicaciones e infecciones (Flores y Herrera 2005, p.2).

1.1.7.1 Intoxicaciones alimentarias

Son el resultado de la ingestión de toxinas, sustancias químicas o productos metabólicos provenientes de microorganismos incorporados a los alimentos de forma accidental o intencionada en cualquier etapa de la cadena productiva (García 2013, p.142).

1.1.7.2 Infecciones alimentarias

Se producen tras la ingesta de alimentos y/o bebidas contaminados con agentes infecciosos específicos con capacidad para multiplicarse en el intestino e invadirlo, dando lugar a un periodo de incubación prolongado (García 2013, p.142).

Algunos de los factores que favorecen a la aparición de ETAS son el enfriamiento inadecuado, preparación de alimentos con demasiada anticipación a su consumo, almacenamiento inadecuado,

conservación a temperatura ambiente, aplicación de un tratamiento térmico insuficiente, contaminación cruzada, adición de ingredientes de origen dudoso o desconocido (García 2013, p.144).

1.1.7.3 Factores causantes de la aparición de las ETA

Los factores que intervienen en la aparición de enfermedades alimentarias se relacionan con la preparación de alimentos mucho tiempo antes de ser consumidos y que son almacenados a temperaturas ambientales sin temperaturas de refrigeración que promueve el crecimiento de los microorganismos. Así mismo estas enfermedades pueden originarse debido a la deficiente manipulación de los alimentos como al déficit de buenas prácticas de higiene durante su procesado (García 2013, p.142).

1.1.7.4 Principales agentes causantes

En la actualidad se han identificado más de 250 ETA y en la mayoría de los casos se trata de infecciones de origen bacteriano, viral y parasitario, que representan riesgos a la salud humana y que generalmente están presentes en derivados lácteos, son *Escherichia coli* O157:H7 y otros coliformes fecales, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* tipo emético, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, entre otras. Su presencia en el queso va a depender de la calidad y del tratamiento térmico de la leche, de la limpieza en general de la quesera, de la calidad de los cultivos, del manejo de la cuajada durante el procesamiento, de la temperatura de almacenamiento y del transporte y distribución del queso. No obstante, los alimentos también se pueden contaminar en los distintos eslabones de la cadena alimentaria, incluidos los hogares y expendios de alimentos preparados para el consumo (Sánchez et al. 2016, p.2).

1.1.7.5 Microorganismos indicadores de la calidad sanitaria de alimentos

- A) *Escherichia coli*: Es considerado un huésped continuo del intestino humano y está presente en agua no potables y contaminadas con excrementos. Se usa generalmente como indicador de contaminación fecal de los alimentos. Pueden contaminar carnes, productos lácteos, frutas y verduras, pescados ahumados (García 2013, p.145).

Se han identificado varias cepas patógenas entre las que se destaca: *E. coli* enterotoxígena, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena (García 2013, p.145).

Para la prevención de contaminación por *E. coli* se debe llevar las siguientes medidas:

Uso de agua potable, buenas prácticas en el matadero, correcto lavado de manos, cocinar bien los alimentos, mantener en refrigeración los alimentos, pasteurizar la leche y evitar la contaminación cruzada (García 2013, p.145).

B) Staphylococcus aureus

El hombre es la fuente más común de contaminación, pero también puede encontrarse en vacas, perros y aves de corral. En las personas se pueden encontrar en la nariz, garganta y las manos, se presenta con vómitos, diarreas, deshidratación, dolores abdominales y debilidad. La enfermedad la produce una enterotoxina producida por el estafilococo en el alimento. La bacteria se destruye con el calor, pero sus enterotoxinas son termorresistentes pudiendo resistir 100°C durante 30 minutos. La mayor parte de los brotes por dichos microorganismos son causados por la contaminación de alimentos debido a malas prácticas de elaboración de los mismos (García 2013, p.148).

Para prevenir la contaminación de la contaminación por *Staphylococcus aureus* se debe implementar buenas prácticas higiénicas en la elaboración de los alimentos: tratamiento térmico correcto, enfriamiento rápido y refrigeración adecuada, correcta higiene personal: lavado correcto de manos y procurar no toser sobre los alimentos (García 2013, p.149).

1.1.7.6 ETA: un problema de salud

Las ETA constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan. La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, y se ha demostrado que la contaminación de éstos puede ocurrir durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada, pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado (Flores y Herrera 2005, p.2).

El control de los microorganismos causantes de ETA, por parte tanto de las autoridades sanitarias como de las plantas procesadoras de alimentos, depende en cierta medida del método analítico que se utiliza para su detección. La detección y la investigación de los brotes de ETA constituye uno de los principales retos para el Sistema de Salud Pública, pues requiere obtener, de manera oportuna y eficaz, información médica (datos personales, síntomas, etc.) y análisis de laboratorio

de los restos de alimentos o de las materias primas empleadas en su elaboración e, incluso, de las manos de las personas involucradas en la manipulación del alimento (Flores y Herrera 2005, p.2).

Un alto porcentaje de los casos de ETA no puede asociarse con algún alimento en particular o no es factible identificar al patógeno responsable, debido, fundamentalmente, a que los resultados de los análisis bacteriológicos demoran; asimismo, el vehículo alimentario implicado ya no se encuentra disponible para su análisis, lo que sugiere la necesidad de establecer métodos rápidos y eficientes de detección del agente causal (Flores y Herrera 2005, p.2).

Consumir alimentos contaminados, principalmente con materia fecal, provoca enfermedades gastrointestinales; las infecciones agudas del tracto gastrointestinal figuran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes como gastroenteritis, salmonelosis, tifoidea, cólera y rotavirus las cuales representan un severo problema de salud pública, cuyas manifestaciones clínicas más frecuentes son fiebre, vómito, dolor abdominal y diarrea moderada o intensa (Sánchez-Valdés et al. 2016, p.2).

En los últimos años los quesos blancos de fabricación artesanal han estado involucrados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y de acuerdo con estudios sobre su calidad microbiológica en más del 98% de las muestras analizadas, las poblaciones de *S. aureus* están por encima de los límites aceptables. Las causas se atribuyen al empleo de leche cruda y las fallas en la manufactura, transporte y almacenamiento, por lo que estos productos son considerados riesgosos para la salud de los consumidores (Rodríguez, Caldas y Ogeerally 2009, p.2).

1.1.8 Queseras artesanales en el Ecuador

El queso artesanal se elabora a partir de leche cruda, por lo general de vacas criollas, con fermentación espontánea, uso de renina y corta maduración, utilizando metodologías muy rudimentarias, todavía sin estandarizar.

El queso fresco es el que cuenta con mayor número de microorganismos patógenos al momento de ser comercializado. Por esta razón se le asocia con mayor frecuencia con brotes de intoxicación alimentaria. En los quesos frescos, los hongos representan una forma de alteración; su crecimiento origina problemas de tipo comercial (producen olores indeseables y cambios en la textura y en el interior de los quesos, lo que se traduce en pérdida de categoría e, incluso, en el rechazo total del producto) y sanitario por la posible producción de metabolitos tóxicos.

Su presencia en el queso depende de la calidad y del tratamiento térmico de la leche, de la limpieza en general de la quesería, de la calidad de los cultivos, del manejo de la cuajada durante el procesamiento, de la temperatura de almacenamiento y del transporte y distribución del queso. No obstante, los alimentos también se pueden contaminar en los distintos eslabones de la cadena alimentaria, los hogares y expendios de alimentos preparados para el consumo (Sánchez et al. 2016, p.2).

1.1.9 Seguridad alimentaria

Una referencia principal de seguridad alimentaria es el Codex alimentarius, el cual permite establecer las normas alimentarias directrices, códigos de prácticas y recomendaciones, este código se revisa y se adapta en dependencia a los avances científicos que se producen y a las necesidades de los estados miembros (García 2013, p.124)

Según el Instituto de Nutrición para Centroamérica y Panamá (INCAP), la Seguridad Alimentaria Nutricional "es un estado en el cual todas las personas gozan, en forma oportuna y permanente, de acceso físico, económico y social a los alimentos que necesitan, en cantidad y calidad, para su adecuado consumo y utilización biológica, garantizándoles un estado de bienestar general que coadyuve al logro de su desarrollo". Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), desde la Cumbre Mundial de la Alimentación (CMA) de 1996, se establece existe seguridad alimentaria "cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana" (FAO 2011, p.2).

La seguridad alimentaria debe ser garantizada durante toda la cadena alimentaria, que va desde la producción del alimento hasta el consumidor final del mismo, donde ninguna de las partes implicadas descuidará sus responsabilidades porque de serlo así se verá afectado el resto de eslabones (García 2013, p.123).

Los desafíos de la seguridad alimentaria incluyen cuatro áreas principales

Seguridad microbiológica: Los alimentos por sus componentes biológicos se consideran en la capacidad de soportar crecimiento de microorganismos siendo una gran fuente de transmisión de enfermedades alimentarias (Fung, Wang y Menon 2018, p.3).

Las infecciones producidas por alimentos contaminados pueden ser causadas por bacterias, siendo estos agentes las principales causas de ETAs graves y fatales. Más del 90% enfermedades

causadas por intoxicaciones alimentarias se debe a la presencia de especies como *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Vibrio*, *Bacillus* y *E. coli*. Por ejemplo, en los Estados Unidos y Francia, en la última década del siglo XX, *Salmonella* fue la causa más frecuente de enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos, donde fueron reportados de 5700 a 10.200 casos, seguido de *Campylobacter* con 2600 a 3500 casos y *Listeria* para 304 casos (Fung, Wang y Menon 2018, p.3).

Seguridad química: Actualmente se ha evidenciado en los alimentos aditivos químicos no alimentarios, como colorantes, conservantes y contaminantes (Fung, Wang y Menon 2018, p.3).

Higiene personal: Las prácticas insuficientes de higiene personal de quienes controlan los alimentos, se consideran riesgos para la población y son un problema de salud pública. Para prevenir enfermedades de origen alimentario se debe realizar actividades simples como el lavado completo, adecuado de manos y de las instalaciones de la planta de producción alimentaria (Fung, Wang y Menon 2018, p.3).

Higiene ambiental: Reutilizar inadecuadamente los equipos e instalaciones destinada a la eliminación de residuos, conducen a la acumulación de alimentos contaminados, aumentando la población de plagas e insectos que puede resultar en un riesgo de contaminación y el deterioro de los alimentos (Fung, Wang y Menon 2018, p.3).

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Lugar de la investigación

La toma de muestras del producto terminado recién elaborado se llevó a cabo en una quesera artesanal ubicada en la parroquia Quimiag, cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo. Las muestras del producto terminado después del transporte y listo para comercializar se tomaron en un mercado de la ciudad de San Francisco de Milagro, del Cantón Milagro de la Provincia del Guayas.

Los ensayos físico-químicos y microbiológicos de las muestras se realizaron en el laboratorio del grupo de investigación SAGID y en los Laboratorios de Bromatología y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

2.2 Factores de estudio

2.2.1 Población

La población de estudio son los quesos frescos rectangulares de 700 gr producidos los días sábados en la quesera artesanal ubicada en Quimiag y expendidos los días martes en un mercado de la ciudad de San Francisco de Milagro.

2.2.2 Muestra

Se recolectaron muestras de queso fresco artesanal, recién elaborado, de una quesera ubicada en la parroquia Quimiag del cantón Riobamba provincia de Chimborazo. Se tomaron muestras de quesos frescos provenientes de dicha quesera al momento de su llegada a un mercado de la ciudad de San Francisco de Milagro, provincia del Guayas. También se tomó muestras de queso en los lugares de comercialización directa al consumidor, previo a la hora de cierre del mercado.

El muestreo se realizó durante tres semanas desde 17 de noviembre al 2 de diciembre, los días sábados en la planta de producción y martes después del transporte y en el lugar de comercialización.

La Figura 1-2, detalla el proceso realizado para la toma de muestra en los tres lugares de muestreo.

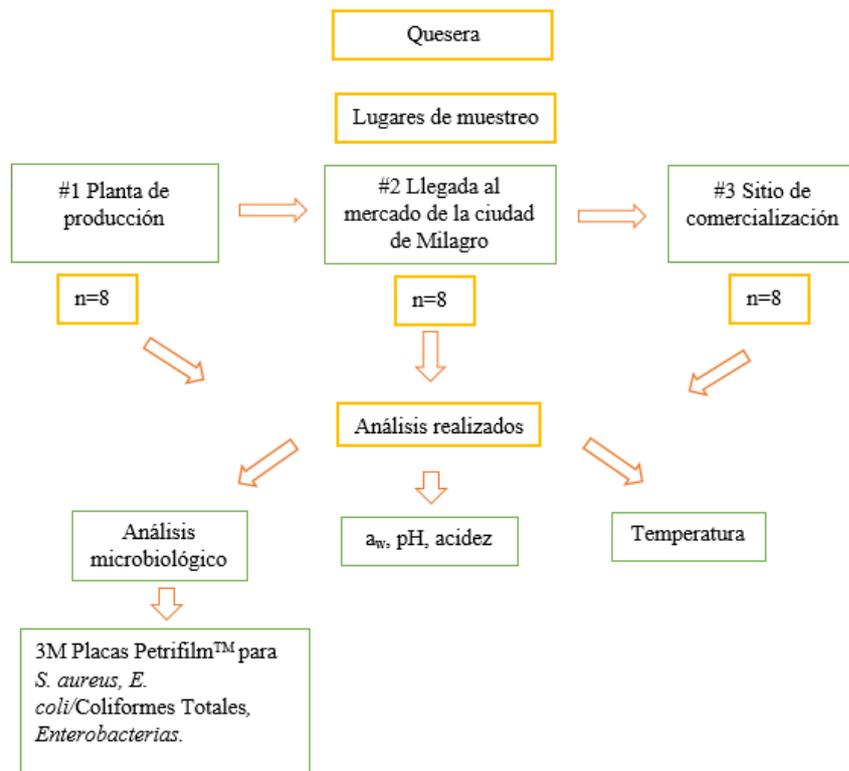


Figura 1-2: Proceso general de toma de muestra en los tres puntos de evaluación

Realizado por: Baque Evelyn; Chugchilan Katina; 2019

2.3 Materiales, equipos y reactivos

2.3.1 Materia prima

- Queso fresco

2.3.2 Análisis físico-químicos

A. Materiales

- Soporte universal
- Bureta de 50 mL
- Erlenmeyer de 500 mL
- Vaso de precipitación de 150 mL
- Piseta
- Varilla de agitación

B. Reactivos

- Fenolftaleína 1%
- Hidróxido de sodio 0.1N
- Agua destilada

C. Equipos

- Balanza analítica
- Reverbero
- pH-metro
- Medidor de actividad de agua
- Termómetro digital

2.3.3 Análisis microbiológico

A. Materiales

- Bolsas plásticas Ziploc®
- Erlenmeyer de 500 mL
- Probeta de 50 mL
- Gradilla
- Pipetas de 10 mL
- Pera de succión
- Micropipeta de 1000 ul
- Puntas para micropipeta de 1000 ul
- Tubos de ensayo estériles
- Toallas de papel
- Dispensor para placas Petrifilm

B. Reactivos

- Agua peptonada
- Agua destilada
- 3M Placas Petrifilm™ para recuento de *S. aureus*
- 3M Placas Petrifilm™ para recuento de *E. coli*/Coliformes Totales
- 3M Placas Petrifilm™ para recuento de Enterobacterias

C. Equipos

- Autoclave

- Cámara de flujo laminar
- Incubadora bacteriológica
- Balanza analítica

2.4 Técnicas y métodos

El primer grupo de muestras se recolectó en la planta de la quesera artesanal ubicada en la parroquia Quimiag y se transportó en cadena de frío hasta el laboratorio, donde se realizaron los análisis microbiológicos y físico-químicos. Cabe resaltar que se observó el proceso de elaboración de los quesos frescos desde aproximadamente las 8:00 am hasta las 5:00 pm, horario en que la planta procesa sus productos.

Se rotuló el lote pertinente a los quesos que son enviados a la ciudad de San Francisco de Milagro, con el fin de rastrearlos hasta su llegada al mercado para su comercialización.

El segundo grupo de muestras se recolectó en el mercado en mención alrededor de las 9:00 am y se conservó en coolers con cadena de frío a temperaturas entre 2 y 8°C.

Finalmente, el tercer grupo de muestras se tomó alrededor de las 6:00 pm del mismo día, adquiriéndola directamente de los vendedores en el mercado. De la misma manera, se mantuvieron en frío hasta su transporte a la ciudad de Riobamba para la ejecución de los análisis. La determinación de temperatura se realizó en el momento de la recolección de cada grupo de muestras.

2.5 Análisis físico-químicos

2.5.1 Análisis de pH

El equipo se calibró con las soluciones tampón de referencia antes de realizar el análisis.

Procedimiento:

1. Pesar en un vaso de precipitación 10 g de queso triturado
2. Añadir 20 ml de H₂O destilada a 70 °C. Agitar bien y enfriar a 20 °C.
3. Medir el pH de la muestra preparada y leer directamente en el visor del pH-metro
4. Enjuagar el electrodo con agua destilada después de cada medida.

2.5.2 Análisis de acidez titulable

Procedimiento:

1. Pesar en un vaso de precipitación 10 g de queso triturado
2. Añadir 20 ml de H₂O destilada a 70 °C. Agitar bien y enfriar a 20 °C
3. Añadir 1 ml ó 2 gotas de solución de fenolftaleína
4. Titular con hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosado que persista de 15 a 30 segundos.

Fórmula para calcular la acidez titulable:

$$\%A = 0,090 * \frac{V * N}{m} * 100$$

Donde:

%A: porcentaje de acidez titulable

V: mililitros de NaOH utilizados

N: normalidad de la solución de NaOH

m: masa de la muestra en gramos

2.5.3 Actividad de agua

La medición de este parámetro se realizó mediante el equipo Aqua Lab

Procedimiento:

1. Preparar una muestra representativa y llevarla a temperatura ambiente
2. Encender el equipo y llenar con muestra, la cápsula de medida solo hasta la mitad
3. Limpiar el borde externo e interno de la cápsula
4. Realizar la medición. En pocos minutos el equipo revela el nivel de _aw y temperatura

2.5.4 Temperatura

La determinación de temperatura se realizó tras la recolección de las muestras en cada uno de los puntos de análisis: producto recién elaborado, al término del transporte y en el lugar de comercialización

Procedimiento:

1. Encender el termómetro y programar
2. Introducir el termómetro en la muestra
3. Esperar a que el equipo muestre el resultado
4. Retirar el termómetro, limpiar y guardar

2.6 Análisis microbiológicos

2.6.1 Preparación de las muestras

Las muestras provenientes de la quesera, del término del transporte y de su comercialización se prepararon de manera individual.

Procedimiento:

1. Limpiar con alcohol el empaque que contiene los quesos y abrir.
2. Colocar el queso sobre una superficie limpia y seca
3. Realizar el cuarteamiento de la muestra
4. Pesar 50 g y colocar en una bolsa Ziploc®
5. Triturar, aplastar y mezclar hasta conseguir una masa homogénea
6. Pesar 10 g de la masa y colocar en una bolsa Ziploc® estéril

2.6.2 Preparación de las diluciones decimales

Las diluciones se prepararon de acuerdo con la norma NTE INEN 1529:2.

Procedimiento:

1. Agregar 90 mL de agua peptonada estéril (121°C a 1 ATM de presión durante 15 minutos), en la bolsa que contiene los 10 g de muestra preparados y agitar hasta su homogenización, de esta manera se obtiene la dilución madre o 10^{-1} o solución madre.
2. Para preparar diluciones menores, transferir 1 mL de la dilución madre en un tubo de ensayo con 9 mL de agua de peptona obteniendo la dilución 10^{-2} .
3. Repetir el proceso anterior hasta conseguir la dilución 10^{-6} .

Es necesario mencionar que, de acuerdo con el origen de las muestras se prepararon diferentes diluciones.

Muestras de queso fresco recién elaborado: 10^{-2} y 10^{-3}

Muestras de queso fresco provenientes del transporte y del lugar de comercialización: 10^{-4} y 10^{-5}

2.6.3 Determinación de bacterias E. coli/coliformes, Enterobacterias y Staphylococcus aureus por la técnica de Petrifilm según 3M

2.6.3.1 Inoculación de las muestras

Procedimiento:

1. Rotular las placas Petrifilm en la parte inferior
2. Con la cámara de flujo laminar encendida, colocar la placa Petrifilm en una superficie plana

3. Levantar la película superior y colocando la micropipeta de manera perpendicular agregar 1 mL de la dilución de la muestra en el centro de la placa.
4. Deslizar la película superior hacia abajo cuidadosamente sin atrapar burbujas de aire
5. Aplicar presión ligera utilizando el esparcidor para distribuir el inóculo sobre el área circular de la placa antes de la formación del gel.
6. Incubar las placas Petrifilm cara arriba en grupos de no más de 20 piezas
7. Transcurrido el tiempo de incubación, proceder a realizar el conteo de los microorganismos
8. Efectuar los cálculos correspondientes y expresar los resultados como Unidades Formadoras de Colonia (UFC/g)

Tabla 1-2: Condiciones de incubación de acuerdo con el microorganismo

Microorganismo	Condiciones de Incubación
<i>S. aureus</i>	35°C ±1°C durante 24 horas
<i>Enterobacteriaceae</i>	35°C ±1°C durante 24 horas
<i>Escherichia coli</i>	35°C ±1°C durante 48 horas ±2 horas
Coliformes	35°C ±1°C durante 24 horas

Fuente: Guía de interpretación 3M Placas Petrifilm™

Realizado por: Baque Evelyn; 2019

2.6.3.2 Lectura e interpretación

- *Staphylococcus aureus*: se cuentan las colonias rojo-violeta, con ayuda de un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Si no hay aparición de colonias tras 24 horas desde la incubación, se determina que el recuento es 0 y la prueba se da por terminada.
- *Enterobacteraceae*: Se pueden producir colonias rojas rodeadas por zonas ácidas de coloración amarilla y estar asociadas a burbujas de gas.
- *E. coli*/coliformes: durante las primeras 24 horas, las colonias rojas y azules con gas se cuentan como coliformes. Después de 48 horas de incubación, las colonias azul o rojo-azul se cuentan como *E. coli*.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Flujograma de proceso de elaboración de queso

En la Figura 1-3 se describe el proceso de elaboración de los quesos frescos desde la recepción hasta su comercialización en el mercado de la ciudad de Milagro. En la tabla 1-3 se muestra los puntos de contaminación con los respectivos factores que pueden de influir en la contaminación microbiana.

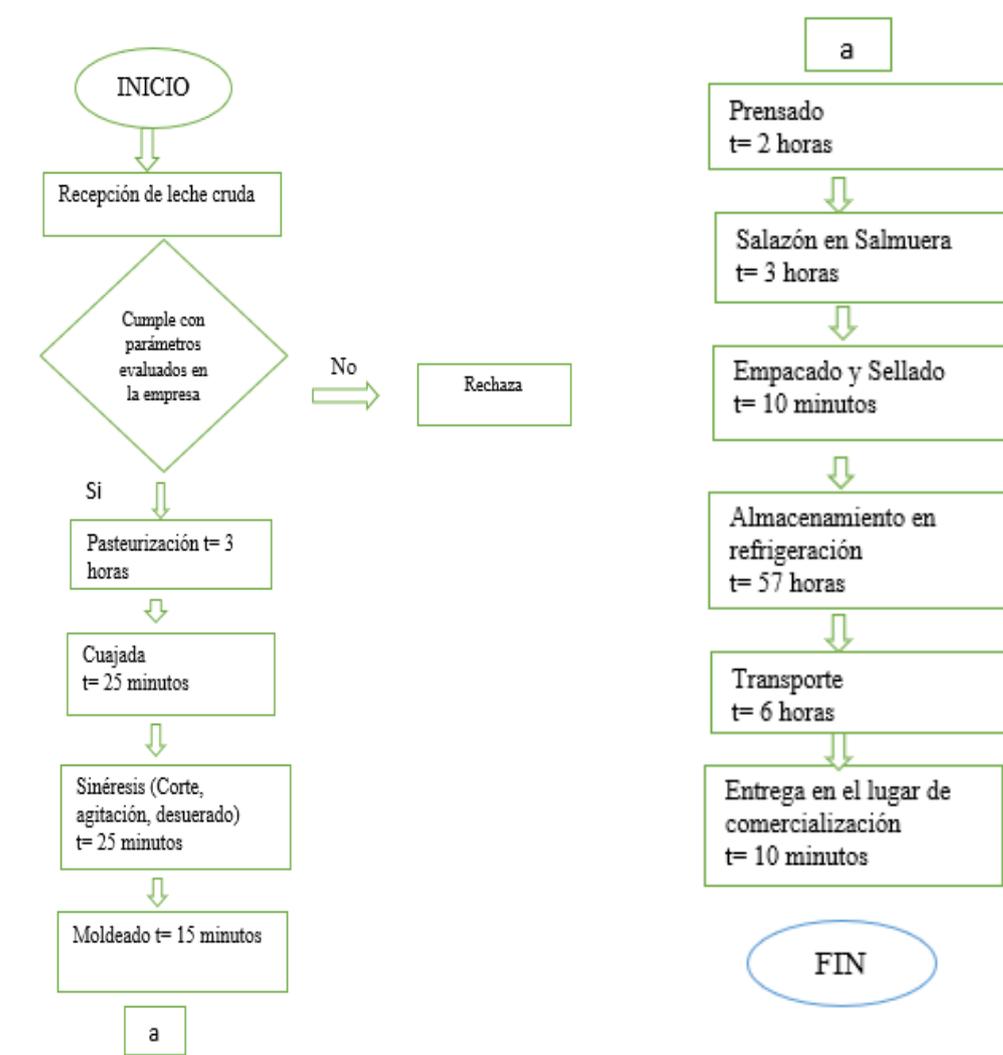


Figura 1-3: Elaboración de queso para ser comercializado en la ciudad de Milagro, desde la recepción de la leche hasta su comercialización.

Realizado por: Evelyn Baque, Katina Chugchilan, 2019

Tabla 1-3: Puntos de contaminación, tiempo transcurrido y potenciales factores de contaminación durante la elaboración de queso fresco.

Puntos de contaminación	# de manipuladores	Tiempo estimado	Potenciales factores de contaminación
1. Pretratamiento (Pasteurización y Descremado)	2	3 horas	Tiempo de pasteurización, deficiente higiene de los equipos
2. Sinéresis (Corte, agitación, desuerado)	1	25 minutos	Insuficiente higiene de materiales de corte y agitación
3. Moldeado	2	15 minutos	No se estandarizan los procesos de limpieza de materiales usados.
4. Prensado	2	1 a 2 horas	No se estandarizan los procesos de limpieza de equipos y materiales. El tiempo de prensado varía de acuerdo con las necesidades de producción.
5. Salazón en Salmuera	1	Entre 1 a 3 horas	Contaminación directa por reúso de salmuera
6. Empacado y Sellado	2	10 minutos	Contaminación proveniente por los operarios y sellado deficiente
7. Almacenamiento en la cámara de frío	1	57 horas	Temperaturas insuficientes para inactivación microbiana
8. Transporte	2	6 horas	Vehículo no refrigerado y manipulación deficiente
9. Entrega en el lugar de comercialización	2	10 minutos	Almacenamiento a temperatura ambiente y contaminación con otros productos

Realizado por: Evelyn Baque, Katina Chugchilan, 2019

La quesera evaluada se abastece de varios proveedores para cubrir sus requerimientos de leche cruda cuya recepción se realiza a partir de la 5 am, previo al análisis y cumplimiento de parámetros como el pH, acidez, frescura. La leche en óptimo estado, sin diferencia de origen pasa a almacenarse en dos tanques para el pasteurizado que se realiza a 80°C durante 20 minutos. Este proceso es realizado por dos operarios debido a que la quesera cuenta con dos marmitas para la producción.

En las etapas de pretratamiento, corte, desuerado, moldeado y prensado, se estableció que las principales causas de contaminación del producto se relacionan con la higiene y desinfección de

los materiales, equipos y utensilios utilizados durante la manufactura. Estos procesos no se encuentran debidamente estandarizados, así como el tiempo que debería durar el moldeado y prensado del queso, los cuales varían en dependencia de las necesidades de producción de la quesera.

Cuando los quesos adquieren su forma, uno de los manipuladores se encarga de sumergirlos en salmuera y simultáneamente se inicia el proceso de pasteurización de otro lote de leche. El tiempo de salazón fluctúa entre 1 y 3 horas si se requiere disminuir el tiempo de producción. Esta etapa se considera también un punto potencial de contaminación debido a que la salmuera es reutilizada para la salar los quesos pertenecientes a otros lotes, con una duración estimada de 15 días.

El empaque de los productos es realizado de manera manual por dos operadores, así como el sellado, para el cual se dispone de una cinta plástica que, de acuerdo con las observaciones realizadas, no garantiza un apropiado cierre, ya que es propenso a abrirse por la manipulación de los trabajadores y por lo tanto representa un riesgo de contaminación de microorganismos principalmente *E. coli* y *S. aureus*.

Una vez empacado y sellado los quesos se almacenan durante 57 horas en un cuarto que se encuentra a temperaturas de entre 10-12 °C, la cual no se considera una temperatura adecuada para refrigeración (2-8°C), por lo tanto, la temperatura en la que se encuentran no inhibe el crecimiento microbiano y representa un punto indicador de posible contaminación.

Para su envío al lugar de comercialización, los quesos son almacenados en gavetas con hielo en un vehículo no refrigerado alrededor de la 01:00 am de cada lunes y son transportados a la ciudad de Milagro. El trayecto dura alrededor de 6 horas y una vez que llegan al lugar de comercialización se almacenan a temperatura ambiente en conjunto con otros productos alimenticios, por lo tanto, se considera un punto de contaminación directa por la falta de refrigeración lo que hace que a temperatura ambiente sea un medio propicio para la multiplicación microbiana.

3.2 Resultados de los análisis físico-químicos de quesos frescos desde su producción en planta, el transporte al lugar de expendio y comercialización

En la Tabla 2-3 se observan los resultados de los análisis fisicoquímicos y la temperatura del producto terminado medidos a 4, 76 y 85 horas desde la recepción de la leche para su procesamiento hasta el lugar de muestreo planta, transporte y comercialización respectivamente.

Tabla 2-3: Resultados de análisis físico-químicos en quesos frescos durante 3 etapas

Lugar de muestreo	Tiempo (horas)	T °C y DE	a _w	pH	%Acidez
			0.96 - 0.99**	5.9 – 6.1**	0.65*
Planta	4	22.74 ±0.77	0.9742 ±0.01	6.02 ±0.68	0.38 ±0.04
Transporte	76	13.85 ±1.05	0.9791 ±0.01	6.20 ±0.35	0.31 ±0.06
Comercialización	85	21.15 ±1.32	0.9767 ±0.01	5.72 ±0.35	0.43 ±0.14
*Isique, 2014					
**Menendez, 2018					

Realizado por: Baque Evelyn; Chugchilan Katina; 2019

En la norma NTE INEN 1528 no consta como requisito los parámetros pH y acidez, por lo cual no existen límites de referencia, sin embargo, se tomó como referencia el rango de pH para queso blanco de Menéndez (2018), que en su texto “Fabricación de quesos en el mundo” indica que debería tener un valor de pH entre 5.9-6.1, por lo tanto, de las muestras analizadas en los tres puntos, únicamente la proveniente de la comercialización se encuentra por debajo de los límites, esto podría deberse al tiempo transcurrido entre su producción y la comercialización, además de las condiciones de almacenamiento. Por otro parte, Isique (2014), señala en su libro “Elaboración de quesos” que este producto debería tener 0.65% de acidez, no obstante, todas las muestras analizadas presentan valores inferiores al referenciado, debido a que valores altos de acidez conducen al aumento de sinéresis en la cuajada provocando que el producto terminado pierda mayor cantidad de agua, lo que no se considera favorable pues afecta el rendimiento de la producción.

El valor pH de las muestras procedentes de la planta fue de 6.02 ±0.68 mientras que la acidez fue de 0.38 ±0.04 % de ácido láctico, que de acuerdo a las investigaciones de Menendez (2018) e Isique (2014) respectivamente, se encuentran cercanos a los rangos de referencia. Tras la manufactura, los productos son almacenados en la cámara de frío de la quesera a temperaturas de 12°C, sin embargo, no se encuentra entre el rango de temperaturas (1-2°C) que inactivan los microorganismos encargados de maduración (Menendez 2018, p.97).

El transporte hasta el mercado de comercialización se lleva a cabo en un camión sin las condiciones térmicas que los quesos requieren por tratarse de productos perecederos y de origen animal, aunque se almacenan en gavetas con hielo, por lo que, a su arribo al lugar de comercialización (Mercado popular en la ciudad de Milagro), su temperatura fue de 13.85 ±1.05

°C y los resultados de pH y acidez fueron de 6.20 ± 0.35 y 0.31 ± 0.06 , encontrándose aún en el rango referencial (Menendez 2018, p.97).

En el tercer lugar de muestreo, se observó que los quesos se exhiben y comercializan a temperatura ambiente. La temperatura medida fue de 21.15 ± 1.32 °C después de haber recorrido 81 horas desde la recepción de la leche, tiempo en el cual llegan al consumidor final. En este punto de muestreo el pH fue de 5.72 ± 0.35 , menor que los reportado anteriormente pero todavía dentro de los valores normales, mientras que la acidez fue $0.43 \pm 0.14\%$, menor a lo considerado normal.

La acidez y el pH son una medida indirecta de la carga microbiana y constituyen factores de gran importancia para su desarrollo y, por lo tanto, influyen en el tiempo de vida útil de los productos alimenticios. Los autores Carnevali y Degrossi (2004), mencionan que los microorganismos como *S. aureus*, *E. coli* y enterobacterias, son capaces de crecer en medios cuyo pH puede variar entre 4.2 y 9.3, valores coherentes con los reportados en los análisis.

La actividad de agua promedio que presentan las muestras, en todos los casos es superior a 0.97, valor que se considera normal según el texto “Fabricación de quesos en el mundo” de Menéndez (2018), que establece un rango de 0.96 - 0.99 e indica que al tratarse de alimentos frescos favorece el desarrollo de microorganismos contribuyendo junto al pH y acidez, a la disminución de la vida útil del producto provocando su deterioro. Este parámetro también es un indicador del estado sanitario de un alimento.

3.3 Resultados del análisis microbiológico de quesos frescos desde su producción en planta, el transporte al lugar de expendio y comercialización

La temperatura y el tiempo son factores que inciden sobre el crecimiento de los microorganismos ya que son capaces de afectar sus reacciones bioquímicas y, por lo tanto, su desarrollo. En la tabla 3-3, se observan los resultados de la medición de temperatura en tres puntos de control (planta, transporte y comercialización), asociado al tiempo de almacenamiento y el crecimiento microbiano de *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, coliformes totales y *E. coli*.

Tabla 3-3: Análisis microbiológico de quesos frescos desde su producción en planta, el transporte al lugar de expendio y comercialización

Lugar de muestreo	Tiempo (horas)	T °C y DE	<i>S. aureus</i> Log ₁₀ UFC/g		<i>Enterobacteriaceae</i> Log ₁₀ UFC/g		Coliformes totales Log ₁₀ UFC/g		<i>E.coli</i> Log ₁₀ UFC/g	
			Resultado y DE	Max.	Resultado y DE	Max.	Resultado y DE	Max.	Resultado y DE	Max.
Planta	4	22.74 ±0.77	5.07±0.06	*2	4.33 ±0.06	*3	4.27 ±0.03	**3	4.03 ±0.03	*1
Transporte	76	13.85 ±1.05	6.32 ±0.30		5.98 ±0.54		5.92 ±0.48	4.89 ±0.74		
Comercialización	85	21.15 ±1.32	6.38 ±0.27		6.43 ±0.30		6.38 ±0.30	5.50 ±0.60		
*NTE INEN 1528										
** NTP 202.087										

Realizado por: Baque Evelyn; Chugchilan Katina; 2019

3.3.1 Relación crecimiento microbiano-temperatura-tiempo

De acuerdo con sus requerimientos térmicos para promover el desarrollo, estas bacterias pertenecen al grupo de mesófilos que necesitan entre 10 y 45°C para su supervivencia, lo cual está dentro de las temperaturas reportadas en las etapas de evaluación, donde el valor promedio para el producto recién elaborado en planta fue de 22.74 ±0.77 °C.

A esta temperatura el recuento microbiano de *S. aureus* fue $5.07 \pm 0.06 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$, mientras que para *Enterobacteriaceae* se reportaron $4.33 \pm 0.06 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$, coliformes totales fue de $4.27 \pm 0.03 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ y para *E. coli* $4.03 \pm 0.03 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$.

Estas poblaciones microbianas, que provienen de la inmersión de los productos en salmuera, contaminación proveniente de los materiales de trabajo y manipulación de los operadores (Cristobal y Maurtua 2003, p. 162).

Después del empacado, los quesos frescos se almacenaron a temperaturas de aproximadamente $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ dentro de la cámara de refrigeración de la quesera, hasta ser transportados al mercado de comercialización en gavetas con hielo. Este periodo permitió la adaptación de las bacterias al medio asegurando su supervivencia y posterior reproducción (Barreiro y Sandoval 2006, p.51).

Transcurridas alrededor de 76 horas desde la elaboración de productos, se evaluaron nuevamente los parámetros de control en la ciudad de San Francisco de Milagro, donde los quesos frescos llegaron a temperaturas de $13.85 \pm 1.05 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Estas condiciones evidenciaron el incremento de los recuentos bacterianos analizados en el segundo punto de control, siendo $6.32 \pm 0.30 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ para *S. aureus*, $5.98 \pm 0.54 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ de *Enterobacteriaceae*, y $5.92 \pm 0.48 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ de coliformes totales y $4.89 \pm 0.74 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ en *E. coli*.

En el tercer lugar de muestreo correspondiente al mercado de comercialización donde se realiza la venta directa a los consumidores, los productos presentaron temperaturas promedio de $21.15 \pm 1.32 \text{ }^{\circ}\text{C}$, habiendo transcurrido alrededor de 85 horas desde su elaboración, debido a que los comerciantes los mantenían exhibidos a temperatura ambiente y sin diferenciarlos de otros tipos de productos como los cárnicos, sus derivados y otros lácteos, por lo que es posible observar recuentos microbiológicos similares como se indica en la Tabla 3-3.

Se considera que el cambio de temperaturas podría afectar al metabolismo y enzimas microbianas, en el caso de utilizar temperaturas de refrigeración o congelación de los productos, pero las variaciones presentadas, no se enmarcan dentro de estas temperaturas por lo que, la variación térmica entre los tres lugares de muestreo no se consideran lo suficientemente bruscas para afectar su crecimiento y en conjunto con los nutrientes propios del queso, el tiempo transcurrido entre la producción y la comercialización, así como el pH, acidez y a_w analizados proporcionan las condiciones óptimas para que los microorganismos puedan reproducirse y permanecer en los alimentos (In Food Quality 2010, p.11).

3.3.2 Recuento de *Staphylococcus aureus*

De acuerdo con la Tabla 3-3, en las muestras de quesos frescos analizadas en tres etapas de la cadena productiva; la elaboración del producto, transporte y comercialización, se evidencia el crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus* en niveles que superan el máximo permitido, a $2 \log_{10}$ UFC/g e indicado en NTE INEN 1528.

Según Martínez et al. (2013), los resultados evidencian las deficientes condiciones higiénico-sanitarias presentadas por la quesera artesanal en Quimiag durante la elaboración de los productos y que repercuten en etapas posteriores. *Staphylococcus aureus* se trata de una bacteria anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota natural del ser humano por lo que su presencia puede principalmente atribuirse al contacto directo con la piel, boca, manos de los operarios encargados de la manipulación de la materia prima y del producto terminado, esto debido al carente uso de guantes de manejo y mascarilla, así como la insuficiente higiene y sanitización de la superficies y materiales empleados en su producción.

La investigación de Jordá et al. (2012), determinó que la presencia de *S. aureus* proveniente de los manipuladores de alimentos es frecuente y al no cumplir con las recomendaciones de buenas prácticas higiénicas, potencian el riesgo de contaminación de los alimentos en los procesos de elaboración y comercialización, además se observó en el mercado de San Francisco de Milagro, que los productos se exhiben a temperatura ambiente durante varias horas.

S. aureus como indicador de la calidad microbiológica de los alimentos, permite demostrar la deficiencia de las condiciones de conservación y su presencia puede ser evitada manteniendo e implementando buenas medidas de higiene y de control tanto de la materia prima como del agua utilizada en la producción de los quesos frescos (Saltos et al. 2018, p.371).

Toda contaminación generada post proceso, provoca que *S. aureus* sea susceptible de convertirse en el agente causal de intoxicaciones alimentarias cuando se confirma la presencia de sus enterotoxinas en el alimento o al encontrarse en recuentos superiores a $5 \log_{10}$ UFC/g, representando así un potencial riesgo para la salud de los consumidores (Díaz y Gonzalez De García 2001, p.1)

3.3.3 Recuento de *Enterobacteriaceas*

La Tabla de resultados 3-3, evidencia el recuento de *Enterobacteriaceas* durante las tres etapas evaluadas para este trabajo en particular. Aun cuando la materia prima usada para la elaboración

de los productos es sometida al proceso de pasteurización, se encontraron niveles superiores a 3 \log_{10} UFC/g en todas las muestras, en contraste con lo indicado en la NTE INEN 1528.

De acuerdo con la investigación de Martin et al. (2010, p.1) los resultados pueden deberse a la manipulación no higiénica de los quesos o de la materia prima, como lo indican los recuentos obtenidos en planta correspondientes a $4.33 \pm 0.06 \log_{10}$ UFC/g, o pueden ser producto de un almacenamiento y/o transporte bajo condiciones inadecuadas de temperatura que permiten la proliferación de este grupo bacteriano, como se expresa en las muestras obtenidas al término del transporte y comercialización, siendo de 5.98 ± 0.54 y $6.43 \pm 0.30 \log_{10}$ UFC/g respectivamente.

Se estima que el tratamiento térmico elimina la mayor parte de los agentes patógenos, pero estos pueden llegar a encontrarse en los productos e iniciar su desarrollo por contaminación presente en el ambiente o procedente de los operarios y el proceso manual de empacado llevado a cabo en la quesera, donde los equipos y materiales no se encuentran adecuadamente higienizados y el sellado no garantiza que el producto se mantenga inocuo hasta su llegada al consumidor (Martin et al. 2010, p.2).

Las enterobacterias constituyen una familia grande y heterogénea que afecta de manera significativa a la calidad sanitaria de los quesos artesanales. Además, incluye microorganismos de los géneros *Samonella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus* y *Shigella* que se diferencian en otros grupos bacterianos como coliformes totales o pueden ser evaluados de manera individual, en el caso de *E. coli*, tal como se realizó en este trabajo y es detallado en la Tabla 3-3, donde se observa que el recuento de Enterobacterias es superior a los mencionados, Sin embargo, valores por encima de los límites recomendados para *E. coli* como indicador pueden advertir sobre una inadecuada manipulación y condiciones sanitarias deficientes durante la producción, almacenamiento, transporte y comercialización de estos alimentos (Guillen et al. 2014, p.100).

En la quesera se evidenció la falta de control en la manipulación de los quesos frescos ya que una vez transcurrido el tiempo de la salmuera eran sacados sin el uso de guantes y los colocaban en estanterías hasta empacarlos, también se observó que las mallas usadas para dar forma a los quesos no tenían una asepsia correcta por la falta de un lavado en agua potable y en su lugar usaban el mismo suero para enjuagarlas.

3.3.4 Recuento de Coliformes totales

Conforme a los resultados expresados en la Tabla 3-3, se evidenció el crecimiento de Coliformes totales en las muestras de queso fresco analizadas; $4.27 \pm 0.03 \log_{10}$ UFC/g después de su producción en la quesera, $5.92 \pm 0.48 \log_{10}$ UFC/g luego del transporte al lugar de expendio y finalmente presentó un incremento hasta $6.38 \pm 0.30 \log_{10}$ UFC/g en el mercado de venta directa al consumidor. Debido a la elevada carga microbiana existente se determinó que las muestras no cumplen con los requisitos microbiológicos indicados en la NTP 202.087, correspondiente a $3 \log_{10}$ UFC/g.

Es necesario indicar que actualmente la NTE INEN 1528 de nuestro país, no contempla a estos microorganismos como requisito microbiológico a cumplir para la producción y distribución del queso fresco.

Los coliformes pertenecen al grupo de las enterobacterias encontrado con mayor frecuencia en los productos lácteos y sirven como medio para apreciar la calidad higiénica de los mismos (González et al. 2003, p.1). En la planta la leche cruda se somete al proceso de pasteurización antes de procesarla, por lo que se sugiere que los resultados obtenidos no implican necesariamente presencia de materia fecal en el alimento o de patógenos entéricos, no obstante, si refleja la higiene general de la planta de producción operadores (Cristobal y Mautua 2003, p. 162).

El incremento de la carga microbiana también se relaciona con la contaminación post proceso térmico y la evidente carencia de condiciones de temperatura apropiadas durante la conservación de los productos antes y durante el transporte, como se demostró con la evaluación de temperaturas en la Tabla 3-3. Estas medidas sugieren también la manipulación excesiva a la que los quesos son sometidos previo a su venta, por lo que es imposible eliminar del producto totalmente a los coliformes totales (Vásquez et al. 2018, p.50).

3.3.5 Recuento de *Escherichia coli*

En la Tabla 3-3 se evidencia el desarrollo microbiano de *E. coli*, desde su producción con una carga de $4.03 \pm 0.03 \log_{10}$ UFC/g, mientras que en el segundo punto de control fue $4.89 \pm 0.74 \log_{10}$ UFC/g.

Se conoce que *E. coli* es una bacteria presente en el tracto intestinal humano y en el agua no potable o contaminadas con excrementos que advierte de la presencia de otros posibles patógenos y aunque generalmente no suele causar problemas, existen varios tipos capaces de producir enterotoxinas que pueden producir enfermedades al ser ingeridas por medio de los alimentos. Por

lo tanto, se reconoce como un importante microorganismo evaluador de la calidad microbiológica y se prefiere su ausencia en los alimentos, aunque la norma NTE INE 1528 admite hasta $1 \log_{10}$ UFC/g, por lo tanto, el producto no cumple con los requisitos microbiológicos desde su elaboración.

De acuerdo con las investigaciones de Rodríguez et al. (2009, p.101), el origen predominante de *E. coli* está relacionado con la contaminación fecal, puede ser eliminada fácilmente mediante la pasteurización de la leche, proceso que se lleva a cabo en la quesera ubicada en Quimiag previo a la elaboración del queso. No obstante, es posible que el proceso no sea lo suficientemente eficiente para eliminar las toxinas preformadas durante el almacenamiento de la materia prima cruda.

En cuanto al expendio directo al consumidor, la carga microbiana alcanzada fue de $5.50 \pm 0.60 \log_{10}$ UFC/g, lo cual podría deberse a que las muestras se hallaban expuestas a contaminación cruzada con la variedad de alimentos que se pueden comercializar en un mismo puesto tales como otros lácteos, productos al granel, carnes y sus derivados. Así como también el tiempo transcurrido a partir de la contaminación original. Esto incrementa la cantidad de patógenos en el producto y en consecuencia los riesgos para la salud del consumidor (Rodríguez et al., pp.103 2015).

La prevalencia de *E. coli* refleja la deficiencia de condiciones higiénicas implementadas para la elaboración de los productos, transporte y comercialización, tal como se observó durante el desarrollo de la investigación y en concordancia con el estudio titulado “Calidad microbiológica en quesos frescos artesanales distribuidos en plazas de mercado de Tunja, Colombia” de Rodríguez et al. (2015), donde se obtuvieron resultados similares a los presentados en la Tabla 3-3.

CONCLUSIONES

El levantamiento del flujograma de procesos permitió establecer los puntos de contaminación desde la recepción de la leche hasta la comercialización del producto terminado, identificando posibles fuentes de contaminación como operarios, deficiente estandarización en los procesos de limpieza de equipos y materiales y el uso de temperaturas de almacenamiento insuficientes para ralentizar la multiplicación microbiana.

Se determinó el pH y acidez, en los quesos frescos luego de su producción en la planta, después del transporte y en el lugar de comercialización y se encontró que, de las muestras analizadas, únicamente no cumple con el rango tomado como referencia aquellas provenientes de la comercialización, debido al tiempo transcurrido entre la producción y la distribución (85 horas) al consumidor, además de las condiciones de almacenamiento. Se determinó también que la actividad de agua es un parámetro que no se mantiene variable a lo largo de las tres etapas. Estas condiciones junto a la temperatura provocan la disminución de la vida útil del producto propiciando un temprano deterioro, indicado a su vez una deficiente calidad higiénico sanitaria, reflejada en el desarrollo de microorganismos.

Se realizó la cuantificación microbiológica de los quesos frescos en los tres puntos críticos de análisis y se determinó que: ninguna de las muestras cumple con los parámetros establecidos en la normativa ecuatoriana NTE INEN 1528 para los microorganismos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacterias*, así como también incumplen la NTP 202.087, que indica el recuento máximo para coliformes totales. Este crecimiento microbiano se encuentra influenciado por el tiempo, la temperatura y condiciones de almacenamiento.

La presencia de estos microorganismos representa un riesgo potencial a la salud de los consumidores al ser causantes de ETAs.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda a la empresa continuar mejorando sus procesos de manufactura y sanitización de las áreas y utensilios en contacto con la materia prima y el producto terminado, así como el uso de medidas de protección por parte de los manipuladores con el fin de reducir la contaminación cruzada y proveniente del ambiente.
- Mejorar el sistema de sellado y empaçado de los quesos frescos, a fin de garantizar su llegada en buen estado a los consumidores y evitar la posibilidad de contaminación por manipulación durante el transporte y distribución.
- Favorecer las condiciones de transporte de alimentos asegurando el mantenimiento de la cadena de frío y concienciar a los comerciantes acerca de la importancia del almacenamiento de los quesos en un ambiente refrigerado para evitar el pronto deterioro de sus características, prolongar el tiempo de vida útil y proporcionar a los consumidores productos de calidad sanitaria
- Complementar el análisis microbiológico con la determinación de *Salmonella* y *Listeria*.

BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo, D. y Bedoya, O.**, “Composición nutricional de la leche de ganado vacuno”. *Revista Lasallista de Investigación* [en línea] 2008, (Colombia) 2 (1), pp. 38-42. [Consulta: 01 octubre 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/695/69520107.pdf>.
- Ares, J.**, [sin fecha]. *Calidad De Los Quesos; Fundamentos Y Aspectos Generales.*, pp. 133-160.
- Arguello, et al.** VII CONGRESO IBEROAMERICANO DE CIENCIAS FARMACEUTICAS COIFFA 2017 RIOBAMBA – ECUADOR. LIBRO DE MEMORIAS VII CONGRESO IBEROAMERICANO DE CIENCIAS FARMACEUTICAS COIFFA 2017 [en línea], 2017. Riobamba-Ecuador: s.n, pp. 155-162. ISBN 9789942306968. Disponible en: <http://www.coiffa.org.mx/publicaciones/2018/Libro-de-Memorias-COIFFA-2017.pdf>
- Astiazarán, Iciar; et al.** *Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria.* Madrid: s.n. 2003, pp. 16-17.
- Baldera; et al.**, “Effectiveness of the cold chain control procedure in the retail sector in Southern Spain”. *Food Control.* [En línea], 2016, 59, pp. 614-618. ISSN 0956-7135. [Consulta: 28 septiembre 2018]
- Barreiro, J. y Sandoval, Al.**, *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas.* Caracas-Venezuela: Equinoccio, (2006). ISBN 980-237-210-2, pp. 51-56.
- Carnevali, S. y Degrossi, M.**, “Metabolismo, nutrición y control del mecanismo microbiano”. 2004. *Buenos Aires:* (2004). ISBN 9806144104, pp. 5-15.
- Cristobal, R. y Maurtua, D.**, “Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus spp*”. *Revista Panamericana de Salud Pública* [En línea], 2003, (Perú) 14 (3), pp. 158-164. ISSN 10204989. [Consulta: 28 septiembre 2018]. Disponible en: <https://scielosp.org/article/rpsp/2003.v14n3/158-164/es/>
- De Hombre, R., Alvis, A. y García, C.**, “Propiedades mecánicas y viscoelásticas de queso fresco elaborado con leche de bufala y vaca”. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*

[en línea], 2017, 15, (1), pp. 138-143. [Consulta: 27 septiembre 2018]. ISSN 1909-9959. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18684/BSAA>.

Díaz, C. y González de García, B., “*Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria”. *Revista de Salud Pública y Nutrición* [en línea], 2001, (Venezuela) 2 (3), pp. 1-9. [Consulta: 25 septiembre 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2001/spn013e.pdf>.

Domínguez, M., García, C. y Arias, J.M., “Recomendaciones para la conservación y transporte de alimentos perecederos”. *Grupo Dominguez*, [en línea], 2009. S.l.: Disponible en: <http://digital.csic.es/handle/10261/15514>

FAO. Seguridad Alimentaria y Nutricional. Food and Agriculture Organization of the United Nations [en línea], 2011 (Estados Unidos) 3, (4), pp. 2-8. [Consulta: 23 septiembre 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-at772s.pdf>

Flores, T. y Herrera, R “Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico”. *Salud Pública de México* [en línea], 2005, (México) 47 (5), pp. 388-390. . [Consulta: 22 septiembre 2018]. ISSN 0036-3634. Disponible en: <https://www.scielosp.org/article/spm/2005.v47n5/388-390/>

Franklin; et al. *El libro blanco de la leche y los productos lácteos*. México D.F-México: 2011 ISBN 9788448603052, pp. 36-38.

Fung, F., Wang, H. y Menon, S., “Food safety in the 21st century” *Biomedical Journal* [en línea], 2018, (Estados Unidos) 41, (2), pp. 88-95. [Consulta: 23 septiembre 2018]. ISSN 23194170. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.003>.

García, G.F., *Gestión de la calidad y de la seguridad e higiene alimentarias*. 1°. Madrid-España: Síntesis S.A, 2013, pp. 129-174.

Gonzalez, M., 2002. Tecnología para la Elaboración de Queso Blanco, Amarillo y Yogurt. Veraguas-Panamá. Disponible en: http://www.academia.edu/4598259/Tecnolog%C3%ADa_para_la_Elaboraci%C3%B3n

_de_Queso_Blanco_Amarillo_y_Yogurt_Expositor_Lic._Manuel_Gonz%C3%A1lez_Villarreal_Licenciado_en_Qu%C3%ADmica.

GONZÁLEZ, U.; et al. “Determinación de coliformes totales en los productos lácteos y su comparación entre dos queserías del municipio de pijijiapan, chiapas, México”. *Medigraphic Artemisa* [en línea], 2007, (México) 32, p. 98. [Consulta: 14 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2007/bqs071af.pdf>.

Guillen, L., Millán, B. y Araque, M., “Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela”. *Infection* [en línea], 2014, (Venezuela) 8 (3), pp. 100-118. [Consulta: 14 diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0123939214000320>.

Gúzman, L.E. y Tejada, C., “Análisis Comparativo De Perfiles De Textura de quesos frescos de leche de cabra y vaca”. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* [en línea], 2015 (Colombia) 13 (1), pp. 139-147. [Consulta: 20 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v13n1/v13n1a16.pdf>.

In Food Quality, Microorganismos y alimentos. [en línea]. S.I. [Consulta: 22 diciembre 2018]. Disponible en: http://www.epralima.com/infoodquality/materiais_espanhol/Manuais/3.Microorganismos_y_alimentos.pdf.

Kopper, G; et al. “Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua”. *Scielo* [en línea]. 2009 (Italia) s.n. ISBN 9789253061532. [Consulta: 14 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/pdf/011/i0480s/i0480s.pdf>.

ISO, 11290, 2016. *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase*

Isique, J., *Elaboración de quesos*. Lima-Perú: Macro EIRL, 2014, pp. 52-60.

Jordá; et al. “Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos”. *Rev. argent. microbiol.* [en línea], 2012 (Argentina) 44 (2), pp. 101-

104.Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412012000200009

3M., *Guía de Interpretación*, [en línea]. [Consultado 12 diciembre de 2018]. Disponible en: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Pet_rifilm_guias.pdf

Manteca, V., El transporte terrestre de alimentos. Distribución y Consumo. [en línea]. [Consultado 12 diciembre de 2018]. Disponible en: http://www.mercasa.es/files/multimedios/1292604674_DYC_2003_67_55_61.pdf

Martin, A.; et al. “Aislamiento e identificación de Enterobacterias a partir de quesos adobera. XXXV”. *Reunión nacional de Microbiología, higiene y toxicología de alimentos* [en línea], 2010, (México). [Consulta: 22 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.e-gnosis.udg.mx/index.php/trabajosinocuidad/article/view/336/200>.

Martínez, A.; et al. “Evaluación de la calidad e inocuidad de quesos frescos artesanales de tres regiones de una provincia de Cuba”. *Rev. Salud Anim.* [en línea], 2013, (Cuba) 35 (3), pp. 210-213. ISSN 0253-570X. [Consulta: 28 diciembre 2018]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rasa/v35n3/rasa11313.pdf>.

Menendez, T., *Fabricación de quesos en el mundo*. Córdoba-Argentina: El Cid Editor, 2018, pp. 81-92

Muñoz, D., Rosero, J. y Cabrera, G., “Rangos de control de humedad relativa y temperatura en cavas en maduración de quesos”. *Facultad de ciencias agropecuarias* [en línea], 2010, (Colombia) 8, (1), pp. 68-73. [Consulta: 03 enero 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a09.pdf>.

NTE INEN 1528. *Norma General para quesos frescos no madurados. Requisitos.*

Parra, R.A., “Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos”. *Facultad de ciencias agropecuarias* [en línea], 2010, (Colombia) 8 (1), pp. 93-105. ISSN 1909-9959. [Consulta: 03 enero 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>.

Portal Lechero. *Retención y control de la humedad en los quesos* [en línea]. S.l. [8 de enero del 2019]. Disponible en: <https://www.portalechero.com/innovaportal/v/187/1/innova.front/retencion-y-control-de-la-humedad-en-los-quesos-.html>

Ramírez, C. y Vélez J., “Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad”. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* [en línea], 2014, (México) 6 (2), pp. 131-148. [Consulta: 23 septiembre 2018]. Disponible en: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Ramirez-Lopez-et-al-2012.pdf>.

Robalino, P., “*Modelo de gestión de calidad e inocuidad en la elaboración de queso fresco para los productores artesanales de la parroquia Guasaganda*” (Tesis). (Pregrado) Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. 2014, pp. 16-18. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8564/1/MAI 06.pdf>.

Rodríguez, C., Caldas, L. y Ogeerally, P., “Calidad sanitaria en queso artesanal tipo “telita”. Upata, Estado Bolívar, Venezuela”. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* [en línea], 2009, (Venezuela) 29, pp. 98-102. [Consulta: 15 octubre 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v29n2/art06.pdf>.

Rodríguez, J.; et al. “Calidad microbiológica en quesos frescos artesanales distribuidos en plazas de mercado de Tunja, Colombia”. *Rev. Cubana de Higiene y Epidemiología* [en línea], 2015, (Colombia) 53 (3), pp. 101-103. [Consulta: 13 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.revepidemiologia.sld.cu/index.php/hie/article/view/47/56>.

SALTOS, J.; et al. “La implementación de procedimientos estandarizados en la prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos conteo microbiológico del *Staphylococcus aureus* en quesos frescos”. *Rev.Med.Electrónica* [en línea], 2018, (Ecuador) 40 (2), pp. 371-382. [Consulta: 05 enero 2019]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242018000200013.

Sánchez J.; et al. “Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan, Estado de México”. *Salud Pública de México* [en línea], 2016, (México) 58 (4). pp. 461-467. ISSN 0036-3634. [Consulta: 03 enero 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342016000400461

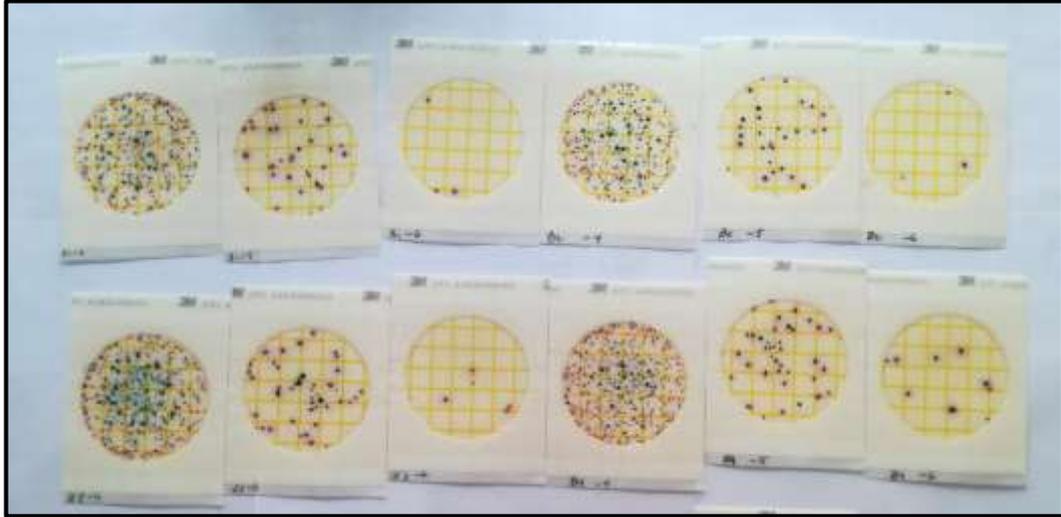
Vásquez, N.; et al. “Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso blanco a nivel de distribuidores, estado Lara, Venezuela”. *Zootecnia tropical* [en línea], 2012, (Venezuela) 30 (3), pp. 217-223. ISSN 0798-7269. [Consulta: 03 enero 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/zt/v30n3/art01.pdf>.

Vásquez, V.; et al. “Evaluación de la calidad bacteriológica de quesos fresco en Cajamarca”. *Ecología aplicada* [en línea], 2018, (Colombia) 17 (1), pp. 45-51. ISSN 1993-9507. [Consulta: 22 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v17n1/a05v17n1.pdf>.

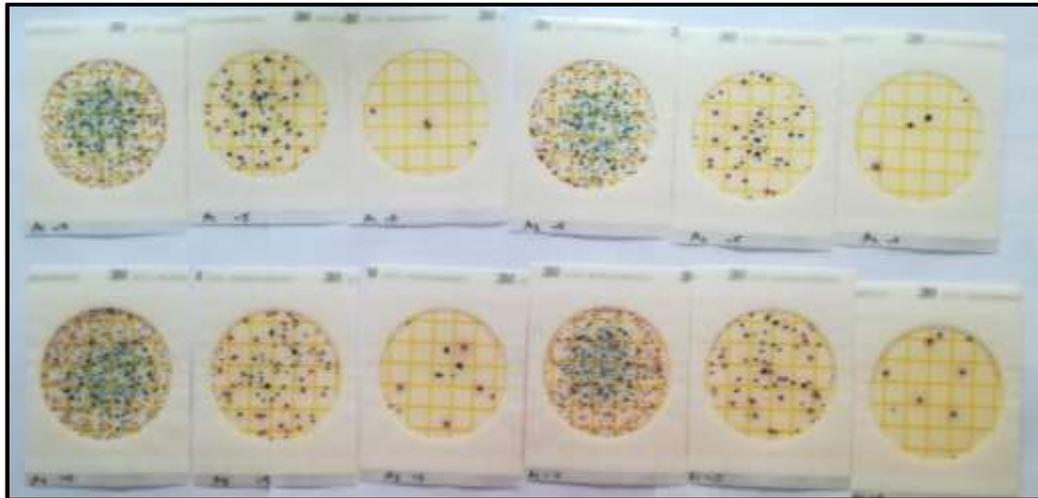
Yoon, Y., Lee, S. y Choi, K.H. “Microbial benefits and risks of raw milk cheese”. *Food Control* [en línea], 2016 (Corea del Sur) 63, pp. 201-215. ISSN 09567135. [Consulta: 14 octubre 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013>.

ANEXOS

Anexo A. Recuento microbiano de *S. aureus*

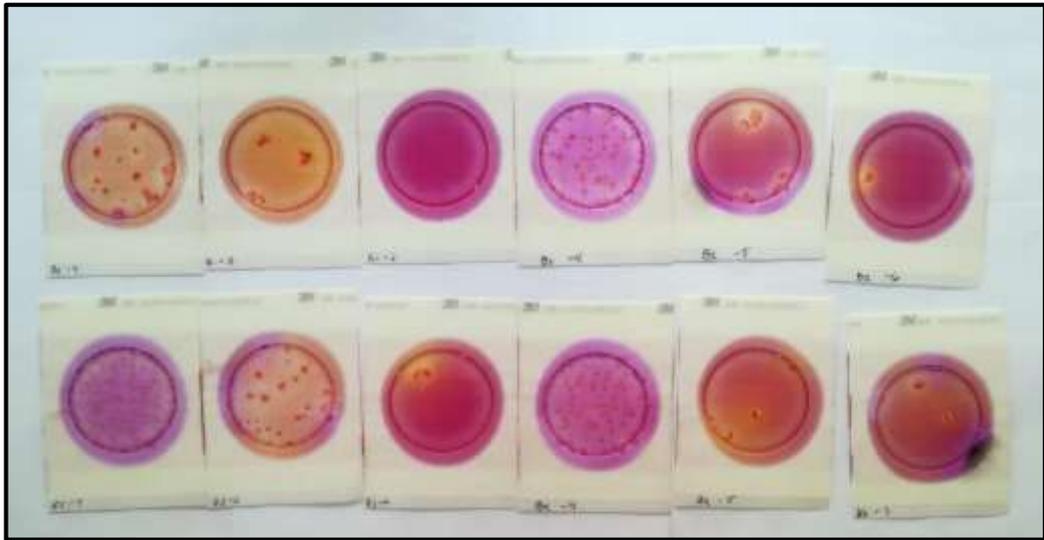


Fotografía 1A. Crecimiento de *S. aureus* en muestras tomadas en planta

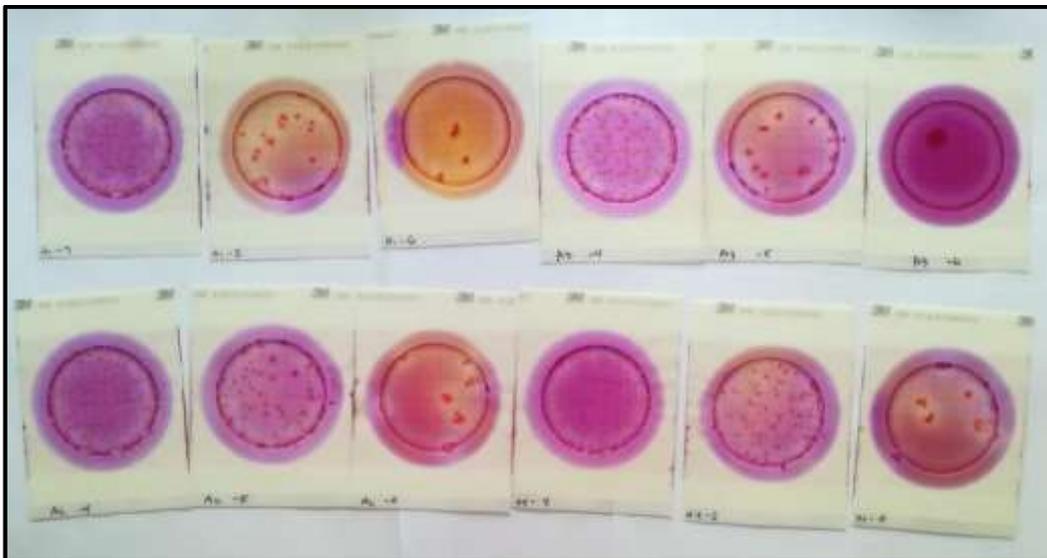


Fotografía 2A. Crecimiento de *S. aureus* en muestras tomadas en el sitio de comercialización

Anexo B. Recuento microbiano de Enterobacterias

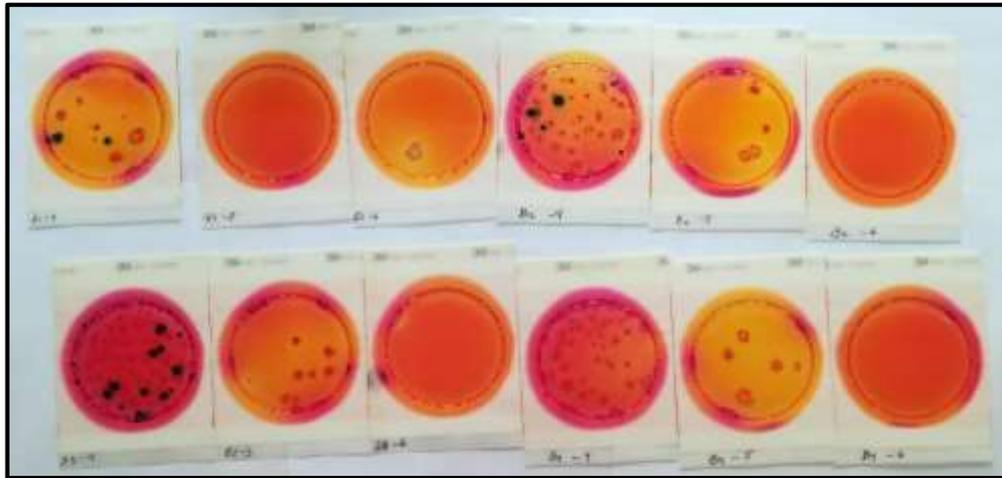


Fotografía 1B. Crecimiento de *Enterobacteriaceae* en muestras tomadas en planta



Fotografía 2B. Crecimiento de *Enterobacteriaceae* en muestras tomadas en el sitio de comercialización

Anexo C. Recuento microbiano de *E. coli*/Coliformes totales



Fotografía 1C. Crecimiento de *E. coli*/Coliformes en muestras tomadas en planta



Fotografía 2C. Crecimiento de *E. coli*/Coliformes en muestras tomadas en el sitio de comercialización

Anexo D. **Análisis fisicoquímicos**



Fotografía 1D. Análisis de pH



Fotografía 2D. Análisis de a_w



Fotografía 3D. Análisis de acidez



Fotografía 4D. Determinación de la temperatura

Anexo E. Condiciones de transporte y expendio de las muestras



Fotografía 1E. Recepción del queso fresco en el lugar de comercialización



Fotografía 2E. Conservación de los quesos frescos en el mercado de expendio