



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

Especialidad en Tecnología e Inocuidad de los Alimentos

**Evaluación de la efectividad del uso de dos sanitizantes
en una planta de confitería**

**Tesina presentada como requisito para obtener el título de:
Especialista en Tecnología e Inocuidad de los alimentos.**

Presenta:

Q.F.B Mariana Velázquez García.

Director de tesina:

M.S.P Carlos Cabrera Maldonado

Septiembre 2018

Índice

	Página
Índice	I
Índice de diagramas	III
Índice de tablas	III
Índice de figuras	IV
Agradecimientos	V
Dedicatoria	VI
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
3.1 Conocimiento general	3
3.2 Sustancias sanitizantes	6
3.2.1 Dióxido de cloro	8
3.2.2 Sales cuaternarias de amonio	9
3.3 Reto microbiano	10
3.3.1 Difusión en agar (Técnica de Kirby-Bauer)	10
3.4 Microorganismos indicadores de Buenas Prácticas de Manufactura	11
3.4.1 Bacterias mesofílicas aerobias	12
3.4.2 Hongos y levaduras	12
3.4.3 Enterobacterias	12
3.4.4 Coliformes totales	13
3.4.5 Coliformes fecales	13
3.4.6 <i>Salmonella</i> spp.	13
4. Justificación	15
5. Objetivos	16
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivos específicos	16
6. Materiales y metodología	17
6.1 Recursos materiales	17

6.2 Metodología	17
7. Resultados y discusión	25
8. Conclusiones	39
9. Recomendaciones	40
10. Bibliografía	41
Anexo A. Protocolo de limpieza para arranque en áreas productivas después de paros prolongados	45
Anexo B. Capacitación microbiológica de “5 minutos” al personal operativo de la planta	52

Índice de diagramas

	Página
Diagrama No.1 Esquema general de trabajo	18
Diagrama No.2 Reto microbiano	19
Diagrama No.3 Análisis de la calidad del aire dentro de la planta de confitería por la técnica de exposición de placa	20
Diagrama No.4 Determinación de enterobacterias por la técnica del número más probable (NMP)	21
Diagrama No.5 Determinación de coliformes totales por la técnica del número más probable (NMP)	22
Diagrama No.6 Determinación de coliformes fecales por la técnica del número más probable (NMP)	23
Diagrama No.7 Investigación de <i>Salmonella</i> spp.	24

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Resultados del reto microbiano con dióxido de cloro y sales cuaternarias de amonio	26
Tabla 2. Resultados del análisis de agua potable en el proceso y límites permisibles	28
Tabla 3. Resultados del muestreo ambiental realizado dentro de las áreas productivas de la planta	30
Tabla 4. Niveles de contaminación ambiental de acuerdo con la concentración de bacterias en el aire	34
Tabla 5. Niveles de contaminación ambiental de acuerdo con la concentración de hongos en el aire	34
Tabla 6. Resultados del muestreo a superficies inertes realizado dentro de las áreas productivas de la planta antes y después de la limpieza y sanitización	36

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Reto microbiano con sales cuaternarias de amonio <i>S. aureus</i> ATCC 25923	25
Figura 2. Reto microbiano con sales cuaternarias de amonio <i>E.coli</i> ATTC 8739	25
Figura 3. Reto microbiano con dióxido de cloro <i>S. aureus</i> ATCC 25923	25
Figura 4. Reto microbiano con dióxido de cloro <i>E.coli</i> ATTC 8739	25
Figura 5. Prueba T para dióxido de cloro evaluado contra <i>S.aureus</i> ATCC 25923 y <i>E.coli</i> ATCC 8739	26
Figura 6. Prueba T para sales cuaternarias de amonio evaluadas contra <i>S.aureus</i> ATCC 25923 y <i>E.coli</i> ATCC 8739	27
Figura 7. Prueba T para evaluar si existen diferencias significativas entre el dióxido de cloro y las sales cuaternarias de amonio.	27
Figura 8. Placas para toma de muestra ambiental colocadas en diferentes puntos de la planta	29
Figura 9. Colonia sugestiva del género <i>Bacillus</i> en agar cuenta estándar	31
Figura 10. Figura 7. Bacilos gram positivos (100x) correspondientes a la colonia aislada	31
Figura 11. Colonias de <i>Bacillus cereus</i> en agar MYP	31
Figura 12. Colonias de <i>Bacillus</i> spp. en agar sangre de carnero	31
Figura 13. Colonia de <i>Altenaria</i> spp. Muestra JA3	32
Figura 14. Colonia de <i>Cladosporium carrionii</i> . Muestra JA8	32
Figura 15. Colonia de <i>Fonsecae pedrosoi</i> . Muestra JA16	32
Figura 16. Turbidez el tubos con caldo Mossel	37
Figura 17. Crecimiento a partir de caldo Mossel en agar bilis rojo violeta glucosa	37
Figura 18. Prueba de oxidasa negativa	37
Figura 19. Pruebas bioquímicas	37
Figura 20. Prueba para coliformes totales en caldo lauril triptosa	38
Figura 21. Prueba para coliformes fecales en caldo lauril triptosa	38
Figura 22. Prueba confirmativa en caldo EC para coliformes totales	38
Figura 23. Prueba confirmativa en caldo EC para coliformes fecales	38

Agradecimientos

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por haberme abierto sus puertas nuevamente para la realización de un proyecto más.

M.S.P. Carlos Cabrera Maldonado por recibirme una vez más para trabajar bajo su dirección, por el tiempo que me ha dedicado y por su conocimiento profesional y personal que ha tenido a bien compartirme desde hace muchos años.

M.S.P María de la Cruz Meneses Sánchez por su colaboración para la identificación de los hongos ambientales que se encontraron durante el muestreo.

A mi comisión revisora: D.C Addi Rhode Navarro Cruz, D.C Ivonne Pérez Xochipa, D.C Carlos Enrique Ochoa Velasco por la atención y tiempo que brindaron para la mejora de este trabajo.

A la empresa que me permitió realizar el presente trabajo en pro de una mejora en el sistema.

Al Ing. César Portillo Moreno y la Ing. Angélica Sabiani Luna Roldan, por su apoyo para realizar este proyecto.

A todos los maestros de la especialidad por compartir una parte de su vida con cada uno de sus alumnos.

A mi familia, Jacki, Facundo, Marco y Magdalena. Gracias por todas las veces que me ayudaron a seguir adelante cuando creí que ya no podía hacerlo.

Y a todas las personas que colaboraron directa e indirectamente durante todo un año de trabajo, infinitamente gracias.

Dedicatoria

Desde que te platiqué de la nueva aventura que iniciaría, creíste en mí y me diste tu apoyo incondicional como siempre. Empezamos esta historia y ninguna de las dos se imaginó todo lo que viviríamos durante este año, aprendimos a ser más fuertes, entendimos que en cualquier momento las cosas pueden cambiar y salimos adelante juntas. Gracias por ser siempre un gran ejemplo de mujer, profesionista y madre.

Cada uno de los desvelos y el cansancio de este año fue dedicado a ti, porque siempre tuviste una palabra de aliento para mí cuando las situaciones me rebasaron y quise dejar todo. Porque tuve que ser más fuerte que nunca para poder inyectarte la alegría y fortaleza que necesitabas aunque, ni yo misma la tenía.

Hoy, que estamos juntas otra vez al final de otra historia que contar no me queda más que dedicarte unas líneas para agradecerte estos 26 años que has estado junto a mí. Gracias por ser una gran madre, por no dejarte vencer por todas las dificultades que se han presentado, por cada uno de los regaños que me has dado, sin ellos quizás no sería la mujer en la que me he convertido ahora.

Sé que vamos a seguir compartiendo triunfos y muchas alegrías. Te amo mucho mamita y mi trabajo es para ti.

1. Resumen

Se evaluó la efectividad de dos sustancias químicas sanitizantes empleadas en una empresa de manufactura de confitería. Dentro del monitoreo se consideró analizar el aire ambiental dentro de la planta, las superficies inertes y el agua potable que se utiliza en el proceso. Los resultados muestran que tanto el aire como el agua se encuentran en condiciones adecuadas; es decir, están libres de agentes biológicos patógenos que pudieran poner en riesgo la inocuidad del producto. Las superficies inertes se evaluaron antes y después de las limpiezas que se ejecutan, obteniendo resultados satisfactorios de acuerdo con los indicadores analizados.

Los resultados en general, reflejan que la planta presenta un buen estado sanitario, con base en ello fue posible concluir que las sustancias químicas sanitizantes que se emplean actualmente, junto con los métodos de limpieza que se ejecutan garantizan el estado inocuo del producto desde el inicio del proceso hasta la entrega del mismo como producto terminado.

Adicionalmente, se redactó un método para las limpiezas de arranque después de paros prolongados en la planta, así mismo, se pudo realizar un programa de pláticas de 5 minutos con el personal para generar conciencia de lo que significa la inocuidad dentro de la planta y cómo se puede controlar en el proceso y en la vida diaria.

2. Introducción

Es un hecho que los alimentos se pueden contaminar a lo largo de toda la cadena alimenticia, desde la obtención de la materia prima hasta la preparación de los mismos, en los hogares o en los expendios de comida, ya que existen diversas condiciones que pueden favorecer la aparición de peligros en el alimento, una de estas causas es la poca información existente hacia los manipuladores de alimentos, de las condiciones higiénicas que deben cuidarse durante su manejo.

El término inocuidad se refiere a la característica de un alimento de no causar daño al consumidor, y se encuentra asociado a la disminución y/o eliminación de todos riesgos debidos a la presencia de peligros físicos, químicos y/o biológicos. Debido a la necesidad de disminuir los problemas de salud que se han presentado frecuentemente a lo largo de la historia se desarrollaron diferentes sistemas de calidad para asegurar la inocuidad de los alimentos, dentro de las bases de estos sistemas se encuentran las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES) y el sistema HACCP.

FSSC 22000 (Food Safety System Certification) es una certificación que se otorga a las empresas de alimentos para garantizar que cuentan con sistema de gestión de inocuidad alimentaria correctamente implementado y en funcionamiento, la misma implica el cumplimiento de una serie de prerrequisitos dentro de los cuales se encuentran: construcción y disposición de edificios, eliminación de desechos, limpieza y desinfección, procedimiento de recolección de producto (recall), por mencionar algunos. Dentro del prerrequisito correspondiente a la limpieza y desinfección se establece que los programas deben asegurar que se mantengan las condiciones higiénicas adecuadas en el proceso, que deben ser establecido y validados por la misma organización; así mismo, se especifica que la sanitización debe ser monitoreada con una frecuencia específica para asegurar la idoneidad y efectividad de la misma.

El cumplimiento de los prerrequisitos por las organizaciones dedicadas al ámbito alimenticio garantiza el control de los peligros de la seguridad alimentaria. Cada uno de estos prerrequisitos debe estar correctamente documentado para que la empresa pueda evidenciar que se lleva a cabo el monitoreo y verificación de estos puntos.

3. Marco teórico

3.1 Conocimiento general

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la inocuidad de los alimentos es una cuestión fundamental de salud pública para la población de todos los países y uno de los asuntos de mayor prioridad para los gobiernos, productores y consumidores. La inocuidad es definida como el carácter de inocuo; es decir, que no causa daño, y está asociada a todos los peligros debido a la presencia en ellos de patógenos microbianos, biotoxinas y/o contaminantes químicos o físicos que puedan afectar la salud de los consumidores, de allí, que la obtención y garantía de la inocuidad es y debe ser un objetivo no negociable (Arispe y Tapia, 2007)

La calidad de los alimentos es una característica compleja que determina su valor o aceptabilidad para el consumidor. De las características de los alimentos se pueden señalar los siguientes atributos de calidad: nutricionales, sensoriales, servicios (presentación, empaque, disponibilidad en el mercado, etc.) y la inocuidad. Este último atributo es considerado un requisito básico de la calidad y debe considerarse como prioritario (Mercado, 2007).

En la actualidad la industria de los alimentos requiere un enfoque integrado y profesional para su desarrollo, para así asegurar la satisfacción del cliente, la calidad y la inocuidad de los procesos y productos. La elaboración de productos alimenticios inocuos necesita que el sistema de garantía de inocuidad se edifique sobre cimientos sólidos. Para ello es necesario implementar sistemas de aseguramiento de la inocuidad y la calidad basados en los principios definidos en las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES) y los sistemas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points). Estos sistemas de inocuidad y calidad enfatizan en el control de materias primas, procesos y productos, así como en el control del personal (Arispe y Tapia, 2007) (Mercado, 2007).

En México, la NOM-251-SSA1-2009 establece los requisitos de buenas prácticas de higiene que deben observarse en el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios y sus materias primas a fin de evitar su contaminación a lo largo del proceso, es de observancia obligatoria para las personas físicas o morales que se dedican al proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios, destinados a los consumidores en territorio nacional (Secretaría de Salud, 2009).

Por otro lado, los POES por sus siglas en inglés SSOP (Sanitation Standard Operating Procedures), son aquellos procedimientos que describen las actividades de limpieza y desinfección, destinadas a mantener las condiciones de higiene de equipos y se aplican antes, durante y después de las operaciones de elaboración para así prevenir un brote de enfermedades transmitidas por alimentos. De allí que su aplicación sea un requerimiento fundamental para la implementación de sistemas que aseguren la calidad de los alimentos (Mercado, 2007).

Los sistemas de HACCP tienen por objeto identificar los peligros vinculados a cualquier fase de la producción, el tratamiento o la preparación de alimentos, evaluar los riesgos consiguientes y determinar las operaciones en las que resultan eficaces ciertos métodos de control. Estos métodos pueden aplicarse directamente a las operaciones cuya importancia es crucial para garantizar la seguridad del alimento (Mercado, 2007).

La Certificación del Sistema de Seguridad Alimentaria FSSC 22000 proporciona un marco para manejar eficazmente las responsabilidades de la organización en materia de inocuidad de los alimentos; FSSC 22000 se basa en las normas ISO 22000 complementada con ISO/TS 22002-2 y demuestra que una empresa cuenta con un sólido sistema de gestión de seguridad alimentaria que cumple los requisitos de clientes y consumidores (FSSC 22000, 2017) (DNV-GL, 2016).

La especificación técnica ISO/TS-22002-2 contempla programas de prerrequisitos para la inocuidad alimentaria en la industria de la manufactura; estos son: construcción y distribución de las instalaciones, distribución de las instalaciones y lugares de trabajo, servicios - aire, agua y energía, disposición de desechos, adecuación del equipo, limpieza y mantenimiento, manejo y disposición de materiales, medidas para prevenir la contaminación cruzada, limpieza y saneamiento, control de plagas, higiene personal e instalaciones para empleados, retrabajo, procedimiento de recolección de producto (recall), almacenamiento, información del producto/advertencias al consumidor, defensa de los alimentos, biovigilancia y bioterrorismo (Mouteira y Basso, 2013).

Dentro de la especificación técnica ISO/TS-22002-2, el punto 11 establece el prerrequisito limpieza y saneamiento, el cual textualmente dice:

11.1 Requisitos generales.

Los programas de limpieza y desinfección deberán establecer el asegurar que el equipo de

procesamiento alimentario y ambiente sea mantenido en una condición higiénica. Los programas deberán ser monitoreados para asegurar su idoneidad y efectividad (ISO/TS-22002-1, 2013).

11.3 Programas de limpieza y desinfección

Los programas de limpieza y desinfección deberán ser establecidos y validados por la empresa para asegurar que todas las partes del establecimiento y equipamientos estén limpias y/o desinfectadas por un itinerario definido, incluyendo la limpieza de equipos de limpieza.

Los programas de limpieza y/o desinfección deberán especificar al menos:

- a) Áreas, ítems de equipos y utensilios a ser limpiados y/o desinfectados;
- b) Responsabilidad para las tareas especificadas;
- c) Métodos de limpieza/desinfección y frecuencia,
- d) Programas de monitoreo y verificación;
- e) Inspecciones posteriores a la limpieza;
- f) Inspecciones anteriores al arranque (ISO/TS-22002-1, 2013).

11.5 Monitoreo de la sanitización efectiva

Los programas de limpieza y desinfección deberán ser monitoreados en frecuencias especificadas por la organización para asegurar su continua idoneidad y efectividad (ISO/TS-22002-1, 2013).

En el sistema de calidad de la organización existe un procedimiento para limpieza de áreas productivas y no productivas que marca la validación de limpieza y desinfección. Dentro del documento se indica que cualquier cambio en las condiciones genera la necesidad de una revalidación, así mismo si no existen cambios, la revalidación deberá realizarse cada 3 años de manera total o parcial según lo amerite (PROAC.75.05, 2014).

El saneamiento en la industria alimentaria persigue dos objetivos evitar la contaminación del alimento y prevenir su alteración (Mouteira y Basso, 2013). Para lograr una buena limpieza y desinfección en las instalaciones es necesario conocer las posibles formas de contaminación para que de esta manera se pueda implementar un sistema de control y prevención adecuados. Un descuido en la limpieza tiene como consecuencia la proliferación de microorganismos y/o presencia de partículas. Los principales factores de contaminación son el personal, el aire y los elementos e instalaciones utilizados durante el proceso de elaboración (Alba y Araujo, 2008). Para llevar a cabo la limpieza y desinfección se debe contar con cierta información como el

método para realizar la limpieza, las sustancias que se utilizaran, diluciones, etc. (Mouteira y Basso, 2013).

3.2 Sustancias sanitizantes

Es común la utilización indiferenciada de los términos desinfección y sanitización; no obstante, es importante tomar en cuenta que si existen diferencias entre ambos términos y deben utilizarse correctamente de acuerdo al procedimiento que se esté realizando. La desinfección es un proceso selectivo que se emplea para destruir o inactivar a los organismos patógenos, especialmente las bacterias de origen entérico. Por definición, un desinfectante es aquella sustancia química que destruye completamente todos los organismos listados en su etiqueta. Debe reducir el nivel de bacterias patógenas en un 99.99% durante un lapso de tiempo superior a 5 minutos pero que no exceda a 10 minutos. La sanitización es la reducción por medio de agentes químicos y/o métodos físicos del número de microorganismos a un nivel que no comprometa la inocuidad del alimento. Los sanitizantes deben reducir la cuenta de bacterias en un 99.99% ciento en 30 segundos. Este tratamiento no debe dar lugar a efectos adversos en el producto y debe ser inocuo para el consumidor (Alba y Araujo, 2008).

Mouteira y Basso (2013) señalan que existen muchas sustancias en el mercado que pueden utilizarse para la limpieza y desinfección de superficies, manos, ambientes, etc.; sin embargo, no todas son adecuadas para utilizarse en las empresas alimenticias, las áreas de proceso o de los equipos para la fabricación, por ello las sustancias químicas que se seleccionen deben cumplir con ciertas características como: ser biodegradables, que tengan una eficiencia demostrada, que sean solubles en agua (en forma completa y rápida), que no sean corrosivos, ni tóxicos, que sean libres de sustancias abrasivas, de baja espuma, y económicos. Se debe tener en cuenta que su eficacia va a depender de diferentes factores como:

- Temperatura

La temperatura elevada en el agua, utilizada para el proceso de limpieza y sanitización hace más fácil la remoción de restos de producto (azúcar, chocolate, cereales), colaborando con la eliminación de los mismos; además de acelerar la actividad de los productos de limpieza (detergentes). Respecto a los desinfectantes o sanitizantes la temperatura elevada puede destruir muchos microorganismos, pero también puede afectar al desinfectante inhibiendo su efecto

antimicrobiano. Se recomienda leer atentamente el marbete del envase del desinfectante en lo referente a la temperatura de aplicación y conservación.

– Acción mecánica

El esfuerzo mecánico está determinado principalmente por el equipo utilizado para la limpieza o fuerza de trabajo involucrada. La presión del agua, el enjuague y el cepillado manual son ejemplos de acción mecánica.

– Concentración del producto químico

Los productos de limpieza y desinfección tienen instrucciones de preparación y concentración según el objetivo que se quiera alcanzar. Es de fundamental importancia respetar las instrucciones de preparación y concentración correspondientes. No mezclar productos diferentes a menos que exista la indicación de que sean compatibles, ya que en determinadas combinaciones se produce la inactivación de los productos involucrados.

– Tiempo de contacto:

Los detergentes y los sanitizantes no funcionan al instante, requieren de un cierto tiempo para penetrar la suciedad y desprenderla de la superficie, así como para que el producto químico sea efectivo sobre los distintos tipos de microorganismos. En ambos casos, el proveedor entrega un documento con las recomendaciones de dilución y tiempo de contacto a utilizar.

– pH

Es una medida de acidez del producto de limpieza o desinfección, y es importante su consideración en el momento de realizar mezclas de distintos productos.

– Química del agua

El agua raramente es pura. Normalmente contiene varias impurezas como sales de calcio y magnesio, mismas que reaccionan con las sustancias limpiadoras y disminuyen su efectividad. Es importante tomar en cuenta la “dureza” del agua al seleccionar el detergente.

Actualmente se están utilizando dos sustancias químicas para sanitizar las superficies inertes en las diferentes áreas, estos son dióxido de cloro y sales cuaternarias en base alcohol. Mismos que han mostrado buena eficacia; sin embargo, no existe un documento que pruebe su validación.

3.2.1 Dióxido de cloro

El dióxido de cloro (ClO_2) es un gas de color verde amarillento, estable y sumamente soluble en soluciones acuosas de hasta 20 g/L. Su capacidad biocida sobrepasa la del cloro y sus derivados, y una de las propiedades más interesantes es su capacidad de acción en un amplio rango de pH (3 a 9). El dióxido de cloro es sensible a la luz ultravioleta y su capacidad de oxidación se incrementa con la acidez (Dióxido de cloro, 2017).

Estrictamente como sanitizante, el ClO_2 presenta las siguientes ventajas:

- Su potencial bactericida es relativamente independiente del pH entre 4 y 10
- Es mejor que el cloro para el tratamiento de esporas.
- Requiere poco tiempo de contacto
- Tiene buena solubilidad.
- No hay corrosión en altas concentraciones, lo que reduce los costos de mantenimiento.
- No reacciona con amoníaco o sales de amonio (Dióxido de cloro, 2017).

El dióxido de cloro existe en el agua como ClO_2 (poca o ninguna disociación) y, por lo tanto, puede pasar a través de las membranas celulares de las bacterias y destruirlas, al ser un biocida oxidante mata a los microorganismos por la interrupción del transporte de nutrientes a través de la membrana celular, no por interrupción del proceso metabólico. El efecto que tiene sobre los virus incluye su adsorción y penetración en la capa proteica de la cápside viral y su reacción con el RNA del virus. Como resultado, el ClO_2 daña la capacidad genética del virus (Dióxido de cloro, 2017).

Mientras los desinfectantes que contienen cloro reaccionan con diversas sustancias mediante la oxidación y sustitución electrofílica, el dióxido de cloro solo reacciona mediante la oxidación. Esta es la razón por la cual el uso de dióxido de cloro puede disminuir la formación de trihalometanos (THM). Existen más de 40 subproductos de desinfección (SPD), aunque su toxicidad en la mayor parte es desconocida. Durante la oxidación de la materia orgánica, el dióxido de cloro se reduce al ión clorito. Es precisamente el clorito y también los cloratos, los SPD más importantes producidos con el uso de este desinfectante. La OMS no ha establecido un valor guía para el dióxido de cloro debido a su deterioro rápido a clorito, clorato y cloruro, y porque el valor guía provisional de la OMS para el clorito, 200mg/litro, es un protector adecuado contra la toxicidad potencial del dióxido de cloro (Dióxido de cloro, 2017).

3.2.2 Sales cuaternarias de amonio

Los compuestos de amonio cuaternario representan una familia de compuestos antimicrobianos, considerados como agentes activos catiónicos potentes en cuanto a su actividad desinfectante, ya que tienen actividad para eliminar bacterias grampositivas y gramnegativas. Su actividad la desarrollan tanto en medio ácido como alcalino, aunque en éste último muestra mejores acciones. Son inactivados por cationes, por ejemplo: aluminio, sodio, materiales orgánicos y otros detergentes. Generalmente incoloros o amarillentos, no irritantes y desodorantes. También tienen una acción detergente y son solubles en agua y alcohol. Tienen como estructura básica al ión amonio (NH_4), la cual al ser modificada, da lugar a diferentes generaciones (Vallejos, 2009).

Son conocidos como “cuaternarios”, “quats” y “QACs” Los desinfectantes QAC más utilizados son: bromuro de cetiltrimetil-amonio ($(\text{C}_{16}\text{H}_{33})\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$) y cloruro laurildimetilbencil-amonio ($\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{NCl}$) (Carchi y Serrano, 2016), y se clasifican como:

- Primera generación: En ésta clasificación se encuentra el cloruro de benzalconio.
- Segunda generación: cloruro de nalquil dimetil etil bencil amonio, compuesto que ya no se encuentra disponible comercialmente.
- Tercera generación: Es la mezcla de la primera y segunda generaciones de amonios que resultan con una mayor actividad y disminución en la toxicidad.
- Cuarta generación: También conocidos como cuaternarios de cadena gemela contienen cadenas dialquílicas lineales y no poseen anillo bencénico, como: cloruro de didecil dimetil amonio, cloruro de dioctil dimetil amonio. Poseen una excelente actividad germicida, casi no forman espuma, poseen una elevada tolerancia a los residuos de proteína y al agua dura. Poseen baja toxicidad.
- Quinta generación: Son una mezcla de cuarta y segunda generaciones. Poseen una mayor acción germicida ya sea en condiciones hostiles y su uso es totalmente seguro (Morales, 2015).

Entre las aplicaciones de los amonios cuaternarios se encuentran el saneamiento de utensilios, equipos, es ampliamente utilizado en hospitales, procesadoras de carne, en plantas de lácteos e industrias afines (Morales, 2015).

Estudios realizados sobre el principio activo evidencian que los amonios cuaternarios actúan a distintos niveles sobre los microorganismos: entran en la membrana de las bacterias por medio de

las largas cadenas carbonadas que son hidrófobas, el Nitrógeno (N) catiónico que es hidrófilo, interacciona con los fosfolípidos de la membrana bacteriana lo cual provoca la salida inmediata del citoplasma al exterior, también van a inhibir la cadena respiratoria y además van a inactivar varias enzimas de crecimiento en el microorganismo. Su actividad se refuerza por los alcoholes (Carchi y Serrano, 2016; Morales, 2015).

3.3 Reto microbiano.

Es posible utilizar diferentes métodos de laboratorio para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante diversos agentes microbianos; por ejemplo, difusión en agar (técnica de Kirby - Bauer), dilución en agar, macrodilución en caldo, microdilución en caldo, Epsilon test, métodos automatizados, etc. La prueba más utilizada en muchos laboratorios de microbiología es la difusión en agar para bacterias de rápido crecimiento y algunas bacterias de difícil crecimiento (Herrera, 1999).

3.3.1 Difusión en agar (Técnica de Kirby-Bauer)

La técnica de difusión en agar es cualitativa y sus resultados se pueden interpretar como sensible, intermedio o resistente, está diseñada específicamente para bacterias de crecimiento rápido como los integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta técnica presenta varias ventajas como:

- Fácil de efectuar y de gran reproducibilidad
- Bajo precio
- No requiere equipo especial
- Resultados fáciles de interpretar
- Muy flexible a la hora de escoger los antimicrobianos a probar (Herrera, 1999).

Picazo (2000) explica que la técnica está basada en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores y es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos, consiste en depositar en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con las diferentes sustancias a probar. Tan pronto el disco impregnado de la sustancia química se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antimicrobiano difunde al agar formándose un gradiente de

concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de la sustancia química probada en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS.

Para la preparación del inóculo se ocupa el método de suspensión directa de colonias: a partir de una placa de cultivo de 18 a 24 horas, se seleccionan varias colonias con un asa y se ajusta el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland en suero fisiológico. Se agita en un agitador "vortex" durante 15-20 segundos. Antes de que transcurran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, se inoculan las placas de agar Mueller-Hinton completamente, sin dejar ninguna zona libre. Se deja secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos, mismos que se colocan con los dispensadores o manualmente con pinzas estériles. Se debe asegurar que los discos toquen perfectamente la superficie del agar, por lo que deben presionarse ligeramente sobre la misma. No deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa, y han de estar distribuidos de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición. Para placas de 150 mm no se emplean más de 12 discos y para las de 100 mm no más de 6. Las placas se incuban a 35°C durante 16-18 horas. Después de 18 horas de incubación se debe leer el diámetro de las zonas de completa inhibición con una regla. Cuando aparecen colonias dentro del halo de inhibición, puede tratarse de mutantes resistentes, contaminaciones, poblaciones heterogéneas o cultivos mixtos y conviene volver a identificarlas y realizar otra vez el ensayo de sensibilidad antimicrobiana (Picazo, 2000).

Es necesario emplear cepas control para supervisar la exactitud y fiabilidad de la metodología, debido también al gran número de variables que pueden afectar los resultados (Picazo, 2000).

3.4 Microorganismos indicadores de Buenas Prácticas de Manufactura

Existen muchos grupos de microorganismos que pueden utilizarse como indicadores de Buenas Prácticas de Manufactura así como para evaluar los procedimientos de limpieza y sanitización tales como bacterias mesofílicas aerobias, mohos y levaduras, coliformes totales y fecales, entre muchos otros. Estos microorganismos deben cumplir con ciertas características para poder ser tomados en cuenta como indicadores. Algunas de estas características son:

- Estar presente de manera normal y ser detectable en los alimentos y/o superficies que se quieran valorar.
- Deben ser fácil y rápidamente detectables
- Su recuento debe ser sencillo y lo más corto posible.
- Debe existir relación entre el número del indicador y el número de patógenos presentes (James, 1992).

3.4.1 Bacterias mesofílicas aerobias

Las bacterias aerobias mesofílicas como grupo, se consideran generalmente como organismos indicadores; constituyen un grupo capaz de crecer en un rango amplio de temperatura (20°C – 40°C), pueden ser patógenas o saprofitas. Representan una medida mucho menos precisa y fiable del peligro de intoxicación alimentaria que otros indicadores microbianos, sin embargo; la presencia de un número elevado de mesofilicos, significa que puede haberse dado condiciones favorables a la multiplicación de los microorganismos patógenos de origen humano o animal (LIDIAV, 2001).

3.4.2 Hongos y levaduras

Los hongos y levaduras son microorganismos cosmopolitas y pueden desarrollarse en muchos sustratos debido a su capacidad para metabolizar diversas sustancias. Estos organismos se pueden encontrar formando parte de la flora normal de un alimento, o como agentes contaminantes provocando deterioros fisicoquímicos en los mismos. Pueden utilizarse como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada (Secretaría de Salud, 1994a).

3.4.3 Enterobacterias

La determinación de enterobacterias en los análisis de la industria alimenticia se introdujo debido a que detecta la presencia de bacterias tanto lactosa positivas, como lactosa negativas. Este punto tiene particular importancia debido a que el análisis de grupos específicos como con los coliformes totales o fecales puede llevar a resultados falsos negativos en los casos en los que predominan las bacterias lactosa negativas. En los alimentos naturales y en las superficies de los utensilios y equipo de las industrias de alimentos, varios tipos de enterobacterias permanecen más

tiempo que *E. coli*. En muchos casos, los recuentos de enterobacterias no guardan relación con la cuantía de la contaminación original a partir de fuentes fecales, debido a que pueden multiplicarse en algunos alimentos mientras que tienden a disminuir en otros y en el agua. En los alimentos que han recibido un tratamiento para garantizar su sanidad, la presencia de niveles considerables de enterobacterias o de coliformes indica: tratamiento inadecuado y/o contaminación posterior al tratamiento, multiplicación microbiana que pudiera haber permitido el crecimiento de toda la serie de microorganismos patógenos y toxigénicos (Moreno, 1975).

3.4.4 Coliformes totales

Los coliformes son bacilos gramnegativos no esporulados que fermentan la lactosa en 48 horas. En conjunto, están representados por cuatro géneros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. De los cuales *E.coli* es más indicativo de contaminación fecal que los otros géneros, con frecuencia es deseable determinar su incidencia en una población de coliformes. Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, y también en el suelo, las plantas, etc. Se utilizan como indicadores de contaminación fecal y son buenos indicadores de un proceso o de un estado sanitario poco satisfactorio (James, 1992).

3.4.5 Coliformes fecales

E.coli es el microorganismo marcador de elección en la comprobación o vigilancia de los alimentos y de los platos preparados tratados mediante calor. Por definición son productores de ácido y de gas, crecen a 44 – 46° C. Vive en el tracto intestinal del hombre y animales, por eso su presencia en un alimento indica contaminación directa o indirecta de origen fecal. Su presencia en los alimentos puede sugerir la contaminación con otros patógenos entéricos (Mossel y Moreno, 1982).

3.4.6 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. es un bacilo gramnegativo, aerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, son móviles por flagelos peritricos o inmóviles, no forman endosporas. Producen ácido y, a menudo, gas durante la fermentación de la D-glucosa o de otros hidratos de carbono. La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 35 y 37°C; sin embargo, *Salmonella* puede multiplicarse desde 5 a 45/47°C, aunque a temperaturas inferiores de 10°C el

crecimiento sufre un retraso considerable. Soportan un rango de pH entre 4.5 y 9 con óptimo de 6.5 a 7.5. Las personas y los animales son directa o indirectamente la fuente de contaminación de los alimentos con *Salmonella*. Los microorganismos pueden proceder de enfermos clínicos o de portadores (Frazier y Westhoff, 1988).

Las infecciones humanas con *Salmonella* pueden producir varias enfermedades clínicas, que incluyen la fiebre entérica (tifoidea), enterocolitis no complicadas, e infecciones sistémicas por microorganismos no tifoideos. Las manifestaciones clínicas de la fiebre entérica aparecen después de un periodo de incubación que varía desde 7 a 28 días y puede incluir diarrea, fiebre prolongada y ondulante, dolor abdominal, dolor de cabeza y abatimiento. Por lo general, las infecciones humanas con *Salmonella* no tifoideas acaban en una enterocolitis que aparece de 8 a 72 horas después del contacto con el patógeno invasor, es generalmente autolimitante y la remisión de las deposiciones diarreicas no sanguinolentas y del dolor abdominal suele ocurrir transcurridos cinco días desde el comienzo de los síntomas (Doyle y cols., 1997).

4. Justificación

Es preciso analizar y evaluar el uso de sustancias químicas sanitizantes que ayuden a mantener cargas microbianas bajas dentro de las áreas de proceso en las empresas procesadoras de alimentos, para así poder garantizar la inocuidad de los productos intermedios y del producto terminado. Esta situación se pone de manifiesto en muchos de los requisitos a cumplir dentro de las normas nacionales e internacionales, y debido a que la empresa cuenta con la certificación FSSC 22000 el cumplimiento de los prerrequisitos debe demostrarse, y en este caso la validación de los programas de limpieza y desinfección se demostrará mediante los resultados obtenidos del presente trabajo; aunado a estos se incluyó en el trabajo el análisis de los métodos de saneamiento que se efectúan actualmente, para que tanto la técnica como las sustancias utilizadas para la limpieza aseguren las condiciones óptimas sanitarias para la elaboración del producto.

Actualmente no se ha realizado la revalidación de los métodos de saneamiento que se ejecutan dentro de una planta de confitería con las sustancias químicas sanitizantes que se aplican, lo que puede repercutir en una no conformidad dentro de alguna auditoria por parte del cliente o de la casa certificadora. Por tal motivo se plantea realizar un estudio para evaluar la efectividad de los químicos en la sanitización en las líneas de producción junto con la ejecución de los métodos correspondientes.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar la efectividad de los sanitizantes que se utilizan en una planta de confitería conforme a las concentraciones y tiempo de contacto actualmente empleados.

5.2 Objetivos específicos

- Verificar mediante un reto microbiano que las concentraciones de los sanitizantes que se utilizan actualmente en la planta de confitería son efectivas.
- Determinar la calidad sanitaria del agua almacenada en la cisterna que se utiliza en una planta de confitería, mediante la realización de coliformes totales y fecales.
- Realizar el muestreo microbiológico de ambiente en el área de trabajo para determinar el grado de contaminación microbiana mediante el recuento de bacterias mesofílicas aerobias, hongos y levaduras y coliformes totales.
- Realizar el muestreo microbiológico en diversas superficies de equipos de proceso que se utilizan en una planta de confitería antes y después de la aplicación del sanitizante, mediante la determinación de enterobacterias, coliformes totales, coliformes fecales y búsqueda de *Salmonella*.
- Identificar los microorganismos que se logren aislar en cada una de las determinaciones mediante pruebas bioquímicas.
- Valorar los métodos de limpieza analizando la ejecución y los resultados antes y después de la aplicación de los sanitizantes en las máquinas de proceso de la planta de confitería.
- Detallar los métodos de limpieza y modificarlos para asegurar la sanidad de los equipos.

6. Materiales y metodología

6.1 Recursos materiales

Todo el material, equipo, medios de cultivo y reactivos del laboratorio de Inocuidad microbiana de los alimentos.

Cepas

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 8739

6.2 Metodología

Métodos

- NOM-092-SSA1-1994. (Secretaría de Salud,1994a)
- NOM-111-SSA1-1994 (Secretaría de Salud,1994b)
- NOM-113-SSA1-1994 (Secretaría de Salud,1994c)
- ISO 7402. (ISO,1993)
- NOM-210-SSA1-2014. Apéndice H (Secretaría de Salud, 2014).
- NOM-210-SSA1-2014. Apéndice A (Secretaría de Salud, 2014).

Se tomó 1 muestra de agua de la cisterna, 16 muestras de ambiente y 12 muestras antes y después de la limpieza y sanitización diaria, cada una correspondiente a un método de limpieza ejecutado actualmente en el área productiva de la planta.

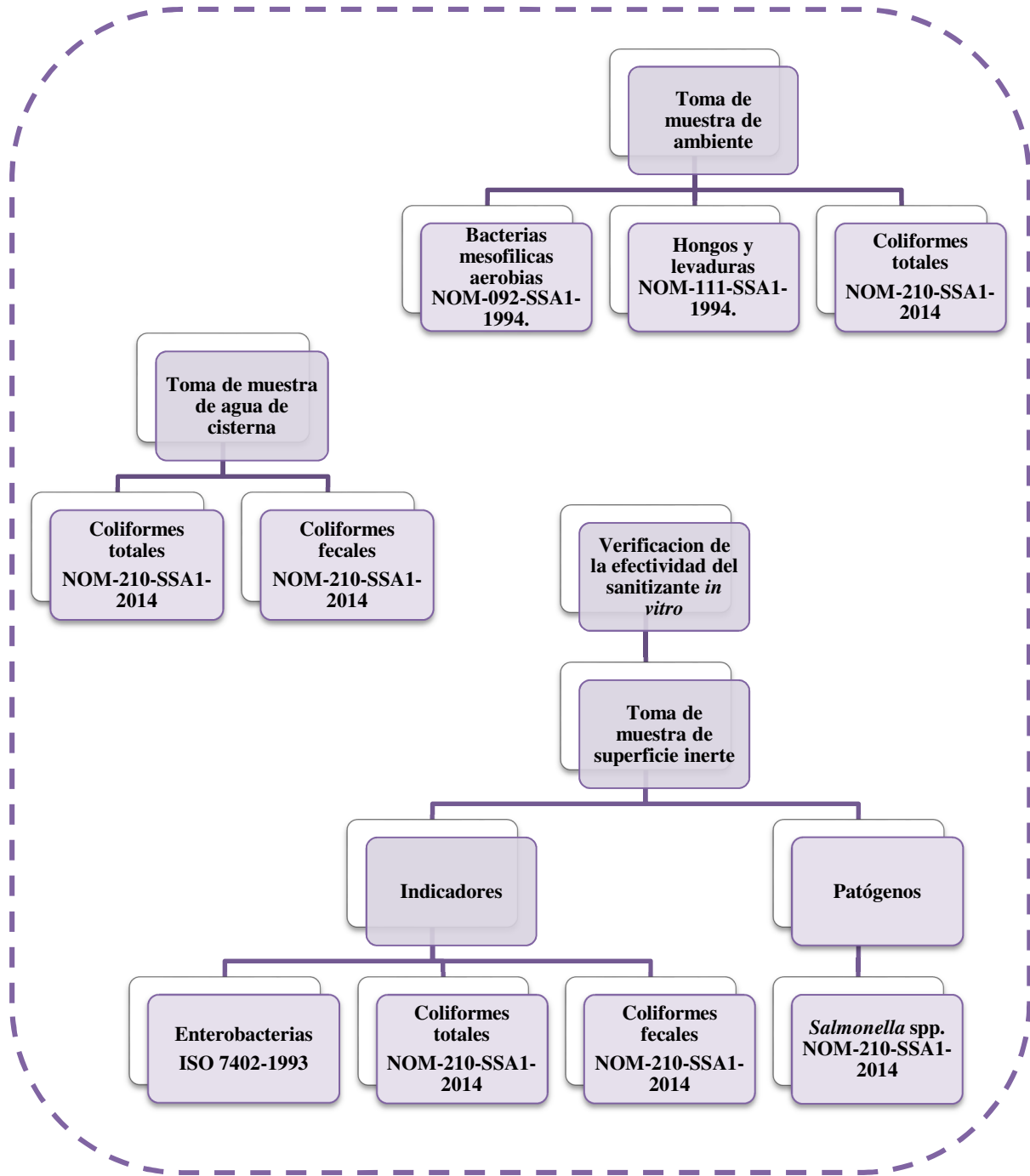
Para la toma de muestra de agua se ocupó un contenedor previamente sanitizado para recolectar el agua de la cisterna y posteriormente se colocó en un recipiente estéril para transportar el líquido al laboratorio, en condiciones de refrigeración.

Las muestras de ambiente se tomaron por el método de exposición de placa. Se eligieron para la toma de muestra los sitios con mayor flujo de personal así como las salidas de aire directo de las UMAS (Unidades Manejadoras de Aire).

La toma de muestra de las superficies se realizó con hisopo mediante la técnica de frotación en las áreas en contacto directo con el producto y áreas cercanas.

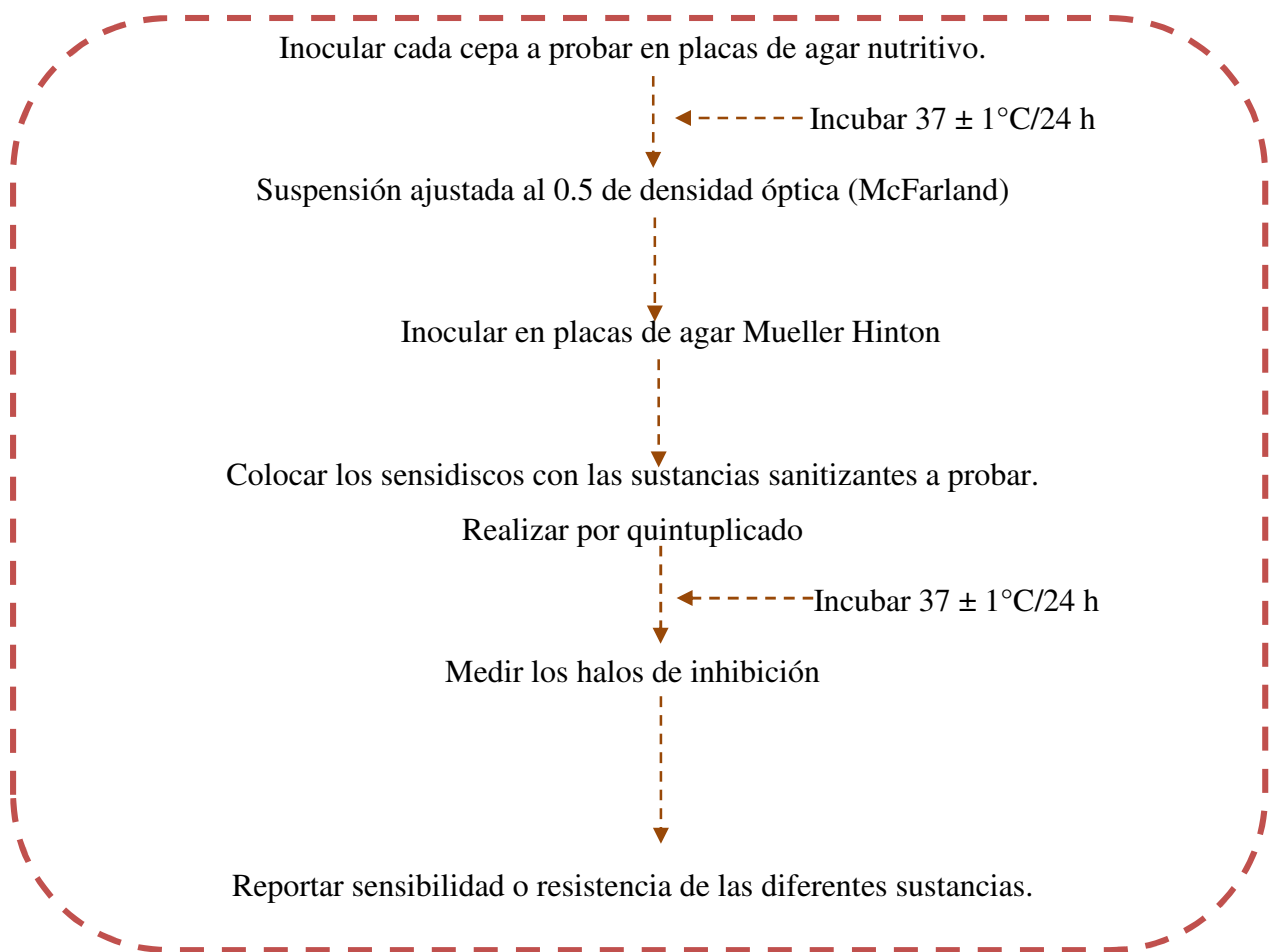
Este trabajo se basó en un esquema general (**Diagrama No.1**) donde se plasmó la totalidad del trabajo, incluyendo el análisis del ambiente, del agua de proceso, así como de la efectividad *in vitro* de las sustancias químicas sanitizantes y finalmente la evaluación *in situ* de los mismos.

Diagrama No.1 Esquema general de trabajo



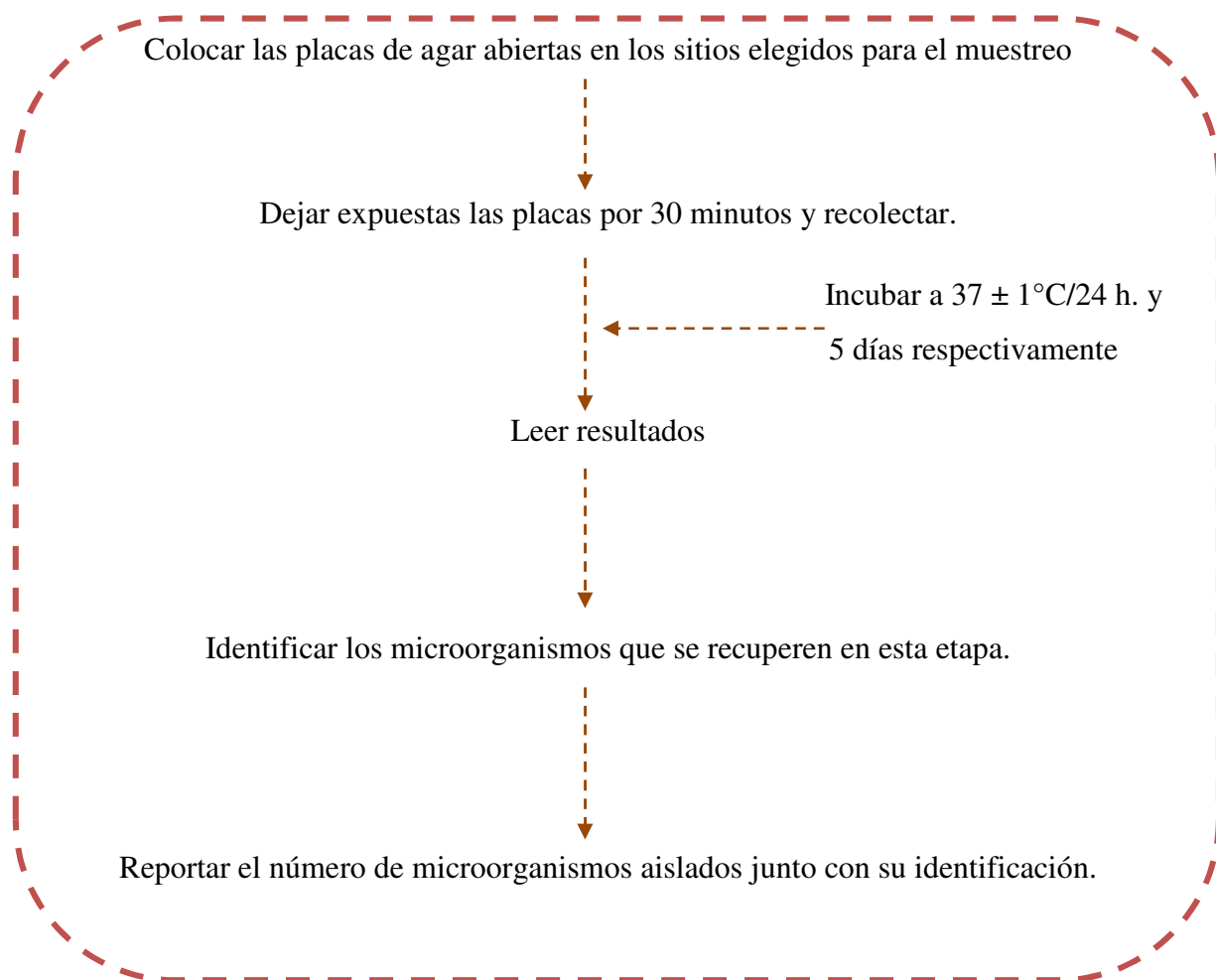
Para verificar la efectividad de los sanitizantes *in vitro*, se efectuó un reto microbiano de acuerdo con la metodología de Kirby – Bauer (**Diagrama No.2**). Se realizó una siembra de las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 8739 en agar nutritivo y se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/24$ h. A partir del crecimiento bacteriano en las placas se realizó una suspensión en solución salina que se ajustó al 0.5 de densidad óptica en la escala de McFarland. De cada suspensión se sembró nuevamente una placa de agar Mueller Hinton por extensión en superficie sobre la cual se colocaron los sensidiscos con dióxido de cloro a una concentración de 200 ppm y las sales cuaternarias en base alcohol de manera directa (uso recomendado del proveedor) y se incubaron nuevamente a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/24$ h. Se evaluó de acuerdo a los halos de inhibición que se observaron alrededor de cada sensidisco.

Diagrama No.2 Reto microbiano



El análisis ambiental se realizó por exposición de placa (**Diagrama No.3**). Se ocuparon placas de agar cuenta estándar para la búsqueda de bacterias mesofilicas aerobias, agar bilis y rojo violeta para la búsqueda de coliformes fecales y agar papa dextrosa para hongos y levaduras. En cada punto seleccionado de la planta se colocaron las tres placas abiertas, durante 30 minutos. Se recolectaron y cerraron para posteriormente ser trasladadas al laboratorio, donde se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}/24 \text{ h.}$ para realizar los recuentos de mesofilicos y coliformes y a $25 \pm 1^\circ\text{C}/ 5 \text{ días}$ para hongos y levaduras. Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias desarrolladas en cada placa de agar. Posteriormente, las colonias de hongos se enviaron a identificación al laboratorio de micología.

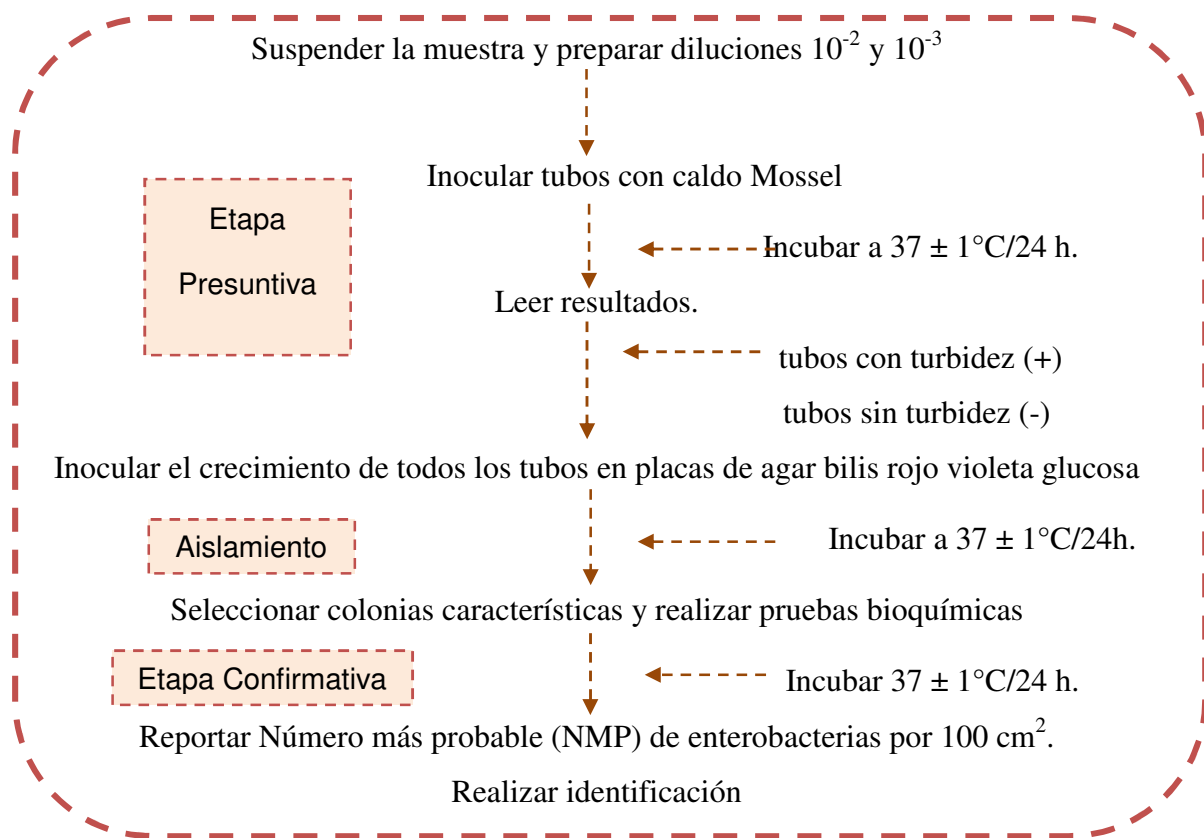
Diagrama No.3 Análisis de la calidad del aire dentro de la planta de confitería por la técnica de exposición de placa



Secretaría de Salud, 1994a; 1994b; 1994c.

Para la determinación de Enterobacterias se realizó la técnica del número más probable (NMP) de acuerdo con la metodología de la norma ISO 7402 (**Diagrama No.4**). La muestra (hisopado de superficie) se suspendió en 100 ml de agua peptonada y se prepararon diluciones decimales 10^{-2} , 10^{-3} . En la etapa presuntiva se inocularon 3 tubos de caldo Mossel con 1 ml de muestra por cada dilución, mismas que se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}/24$ h. Se tomaron como positivos aquellos tubos que presentaban turbidez y negativos aquellos que no presentaban turbidez. De todos los tubos inoculados se realizó el aislamiento en agar bilis rojo violeta glucosa. Se transfirió una asada de cada tubo a una placa con agar y estas se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}/24$ h. Se seleccionaron las colonias típicas (color rosa a rojo con o sin halo de precipitación, o mucoides e incoloras) para realizar la confirmación bioquímica. Para la confirmación bioquímica se realizó la prueba de oxidasa y fermentación de glucosa. Si una de las colonias seleccionadas resultaba oxidasa negativa y glucosa positiva, el tubo del cual derivaba el subcultivo se consideró positivo. A partir de las combinaciones numéricas se buscó el número más probable (NMP) de microorganismos por 100 cm^2 .

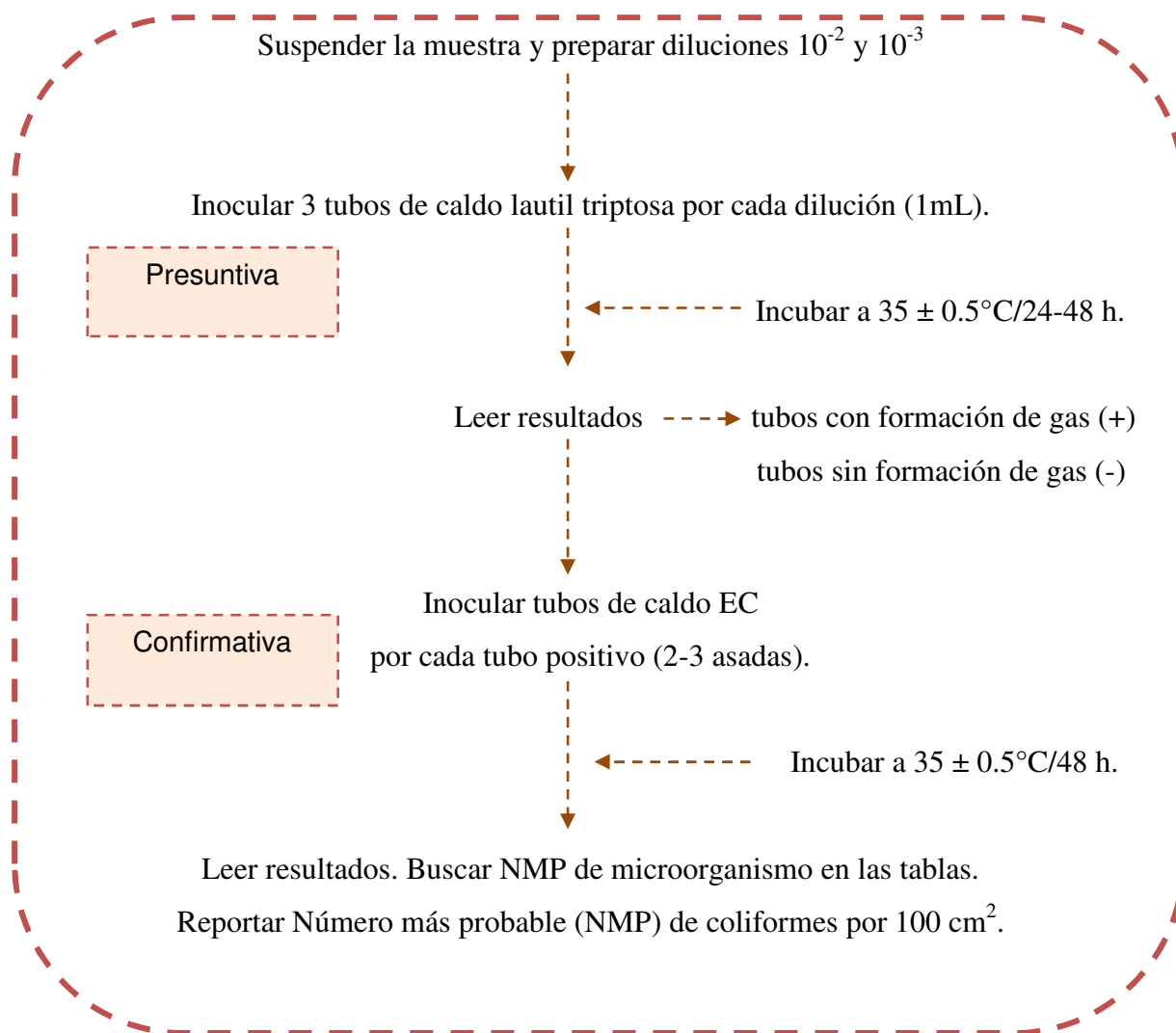
Diagrama No.4 Determinación de enterobacterias por la técnica del número más probable (NMP)



ISO 7402, 1993.

La determinación de coliformes totales se realizó por la técnica del número más probable (NMP) (**Diagrama No.5**). La muestra (hisopado de superficie) se suspendió en 100 ml de agua peptonada y se prepararon diluciones decimales 10^{-2} , 10^{-3} . En la etapa presuntiva se inocularon 3 tubos de caldo lauril triptosa con 1ml de muestra por cada dilución. Estos tubos se incubaron a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}/24-48$ h. Se tomaron como positivos aquellos tubos que presentaban turbidez y formación de gas y negativos aquellos que no presentaban estas características. A partir de los tubos positivos se inocularon tubos con caldo EC; 2 a 3 asadas por cada tubo positivo y se volvieron a incubar a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}/48$ h. Se buscaron las combinaciones de números en las tablas para reportar NMP de coliformes totales por 100 cm^2 .

Diagrama No.5 Determinación de coliformes totales por la técnica del número más probable (NMP)

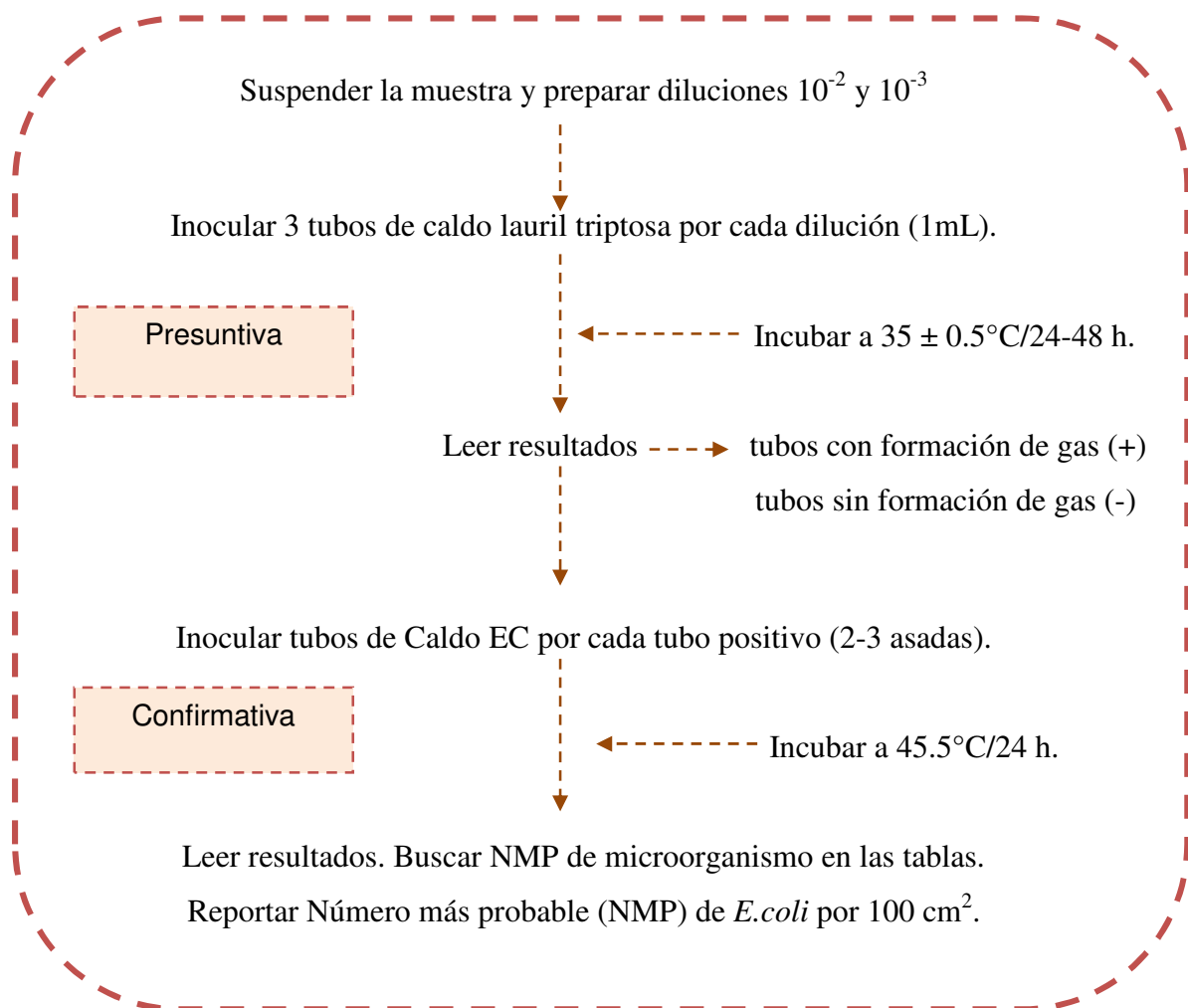


Secretaría de salud, 2014.

La determinación de coliformes fecales se realizó por la técnica del número más probable (NMP) (**Diagrama No.6**). La muestra (hisopado de superficie) se suspendió en 100 ml de agua peptonada y se prepararon diluciones decimales 10^{-2} , 10^{-3} . En la etapa presuntiva se inocularon 3 tubos de caldo lauril triptosa con 1ml de muestra por cada dilución. Estos tubos se incubaron a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}/24-48$ h. Se tomaron como positivos aquellos tubos que presentaban turbidez y formación de gas y negativos aquellos que no presentaban estas características. A partir de los tubos positivos se inocularon tubos con caldo EC; 2 a 3 asadas por cada tubo positivo y se volvieron a incubar a $45.5^{\circ}\text{C}/24$ h.

Se buscaron las combinaciones de números en las tablas para reportar NMP de coliformes fecales por 100 cm^2 .

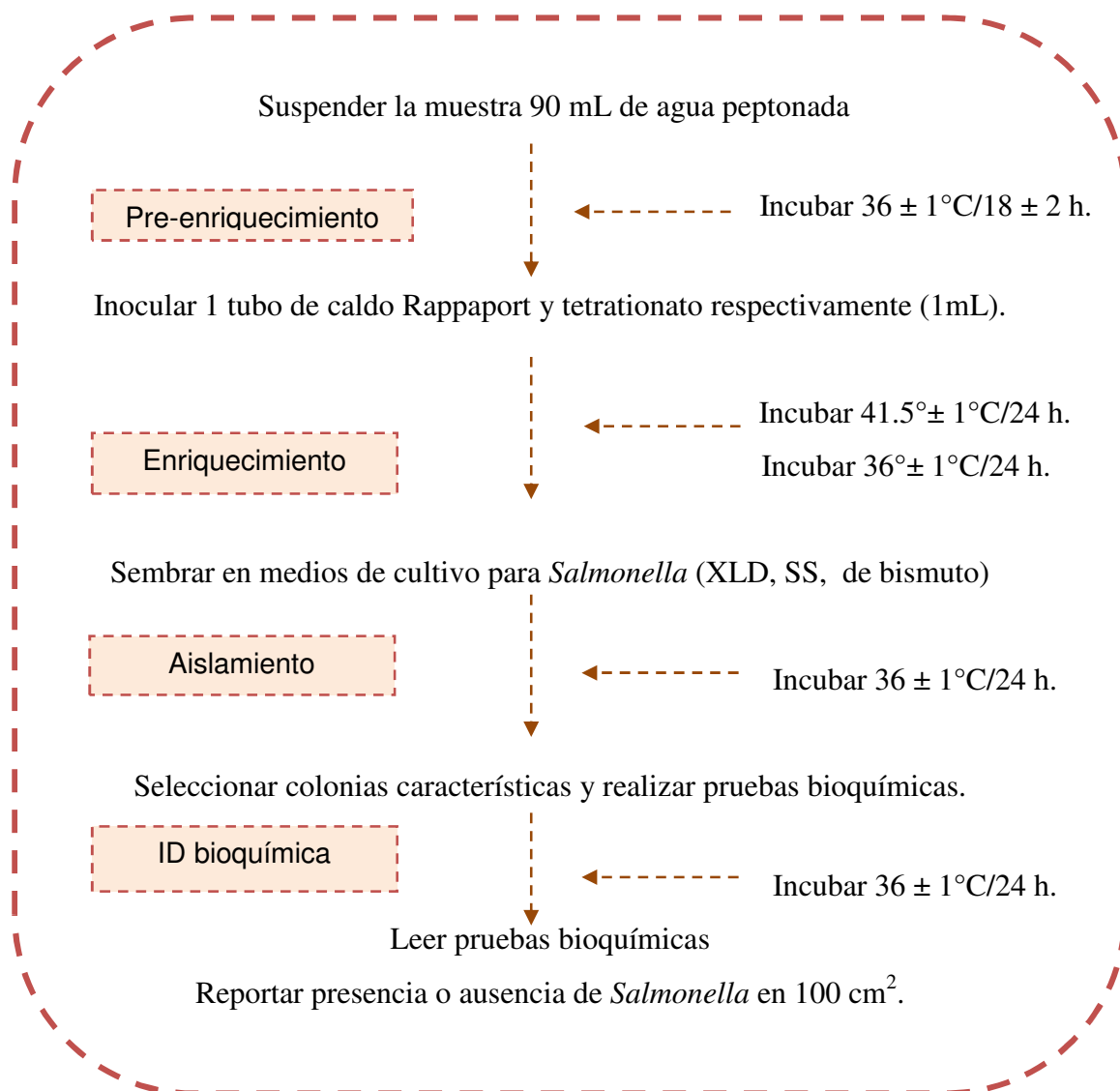
Diagrama No.6 Determinación de coliformes fecales por la técnica del número más probable (NMP)



Secretaría de salud, 2014.

La investigación de *Salmonella* sp. se llevó a cabo la metodología propuesta en la NOM-210-SSA1-2014. Apéndice A. (**Diagrama No.7**). Se realizó un pre-enriquecimiento de la muestra (hisopado de superficie) en 90 ml de agua peptonada que se incubó a $36 \pm 1^\circ\text{C}/18 \pm 2$ h. Posteriormente se inocularon tubos de caldo Rappaport y tetracionato con 0.1 ml y 1 ml de muestra respectivamente. Mismos que se incubaron a $41.5^\circ \pm 1^\circ\text{C}/24\text{h}$ y $36^\circ \pm 1^\circ\text{C}/24$ h. Para el aislamiento se tomaron inóculos a partir de los cultivos anteriores y se colocaron en 3 medios selectivos en placa como sigue: Agar XLD, Agar sulfito de bismuto y cualquier otro medio selectivo sólido y se incubaron a $36 \pm 1^\circ\text{C}/24$ h. De las colonias aisladas en los medios sólidos se seleccionaron colonias con morfología típica para realizar pruebas bioquímicas.

Diagrama No.7 Investigación de *Salmonella* spp.



7. Resultados y discusión

Se hicieron 3 repeticiones de los ensayos de sensibilidad a los sanitizantes. (Figura 1 a 4) El promedio de los halos formados se muestra en la tabla 1.

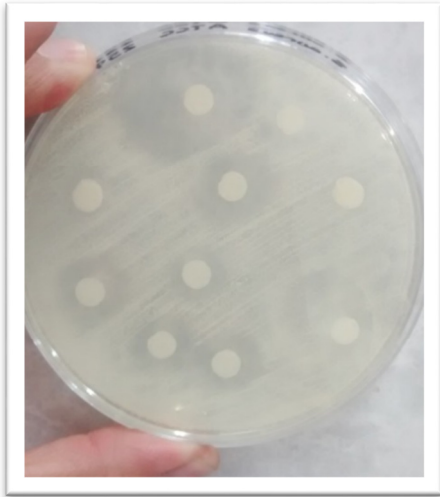


Figura 1. Reto microbiano con sales cuaternarias de amonio vs. *S. aureus* ATCC 25923

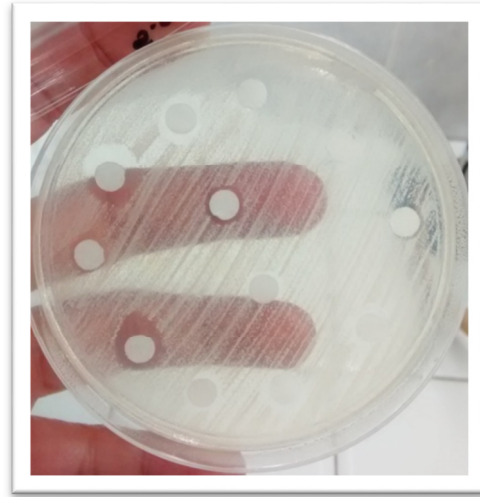


Figura 2. Reto microbiano con sales cuaternarias de amonio vs. *E. coli* ATCC 8739

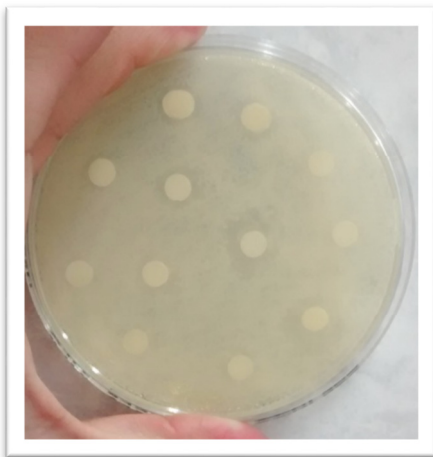


Figura 3. Reto microbiano con dióxido de cloro vs. *S. aureus* ATCC 25923



Figura 4. Reto microbiano con dióxido de cloro vs. *E. coli* ATCC 8739

Tabla 1. Resultados del reto microbiano con dióxido de cloro y sales cuaternarias de amonio

Cepas probadas	Sustancias químicas (sanitizantes)	
	Dióxido de cloro (200 ppm)	Sales cuaternarias de amonio (directo)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	$\varnothing = 8.6 \pm 0.77$ mm	$\varnothing = 12 \pm 0.69$ mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	$\varnothing = 7.2 \pm 0.66$ mm	$\varnothing = 9.7 \pm 0.70$ mm
Promedio general	7.9 ± 1 mm	10.8 ± 1.3 mm

\varnothing = Promedio del diámetro del halo de inhibición.

Debido a que no se pudo hacer una comparación con los datos referidos en la bibliografía para antibióticos y clasificar las sustancias sanitizantes como sensible o resistente, únicamente se analizaron los halos de inhibición formados. Se utilizó el programa Minitab versión 17 para hacer el análisis estadístico, realizando una prueba T para dos muestras la cual arrojó los siguientes resultados:

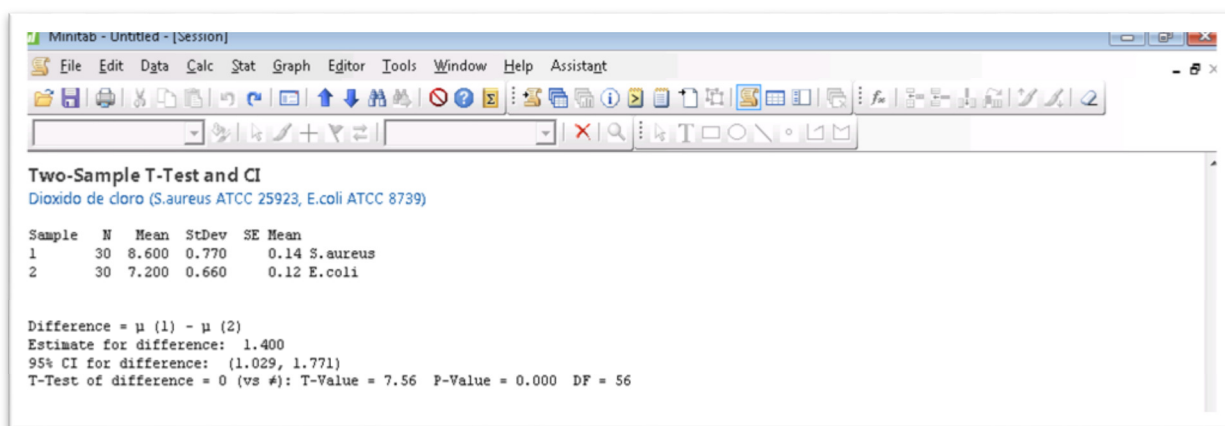


Figura 5. Prueba T para dióxido de cloro evaluado contra *S.aureus* ATCC 25923 y *E.coli* ATCC 8739

En el análisis para comparar los resultados obtenidos para dióxido de cloro contra *S.aureus* ATCC 25923 y *E.coli* ATCC 8739 el valor de P es menor a 0.05, lo cual indica que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos para ambos microorganismos (Figura 5).

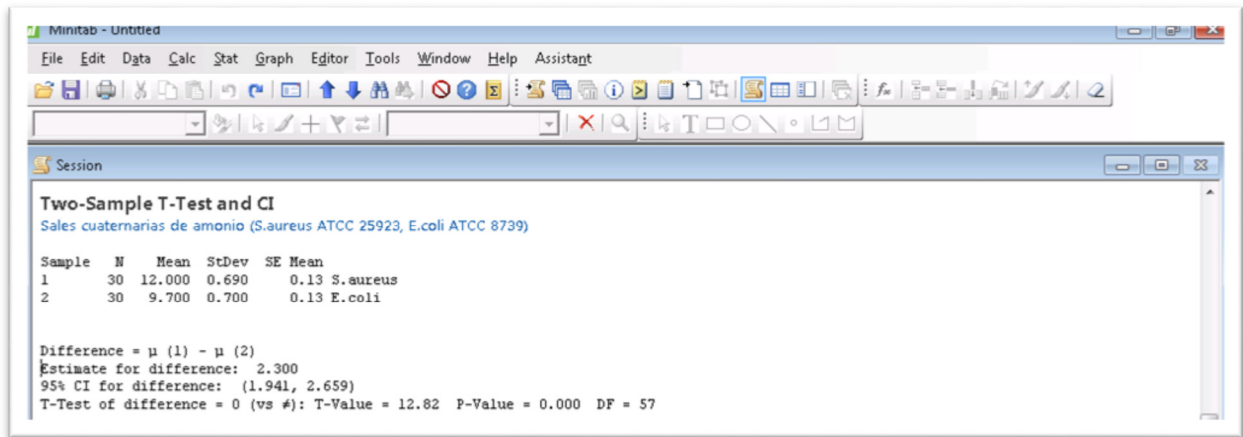


Figura 6. Prueba T para sales cuaternarias de amonio evaluadas contra *S.aureus* ATCC 25923 y *E.coli* ATCC 8739

En el análisis para comparar los resultados obtenidos para el sanitizante con sales cuaternarias de amonio contra *S.aureus* ATCC 25923 y *E.coli* ATCC 8739 el valor de P es menor a 0.05, lo cual indica que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos para ambos microorganismos (Figura 6).

Con base en los resultados anteriores, donde se evaluó si existían o no diferencias significativas entre las diferentes cepas probadas con cada sustancias sanitizante, se decidió analizar si existían diferencias significativas entre ambas sustancias (Figura 7). Los resultados fueron los siguientes:

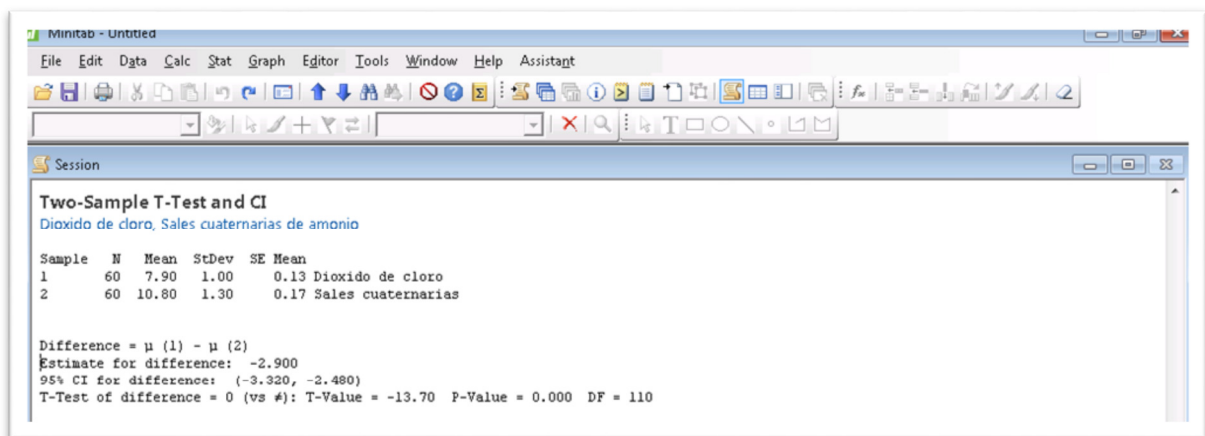


Figura 7. Prueba T para evaluar si existen diferencias significativas entre el dióxido de cloro y las sales cuaternarias de amonio.

Dado que en la última prueba, el valor de P es menor a 0.05 se dice que no existen diferencias significativas entre ambas sustancias sanitizantes. Es importante resaltar que en este trabajo se evaluó la efectividad del sanitizante tal y como se utiliza en el sitio de aplicación; es decir, en el proceso productivo. Ambas sustancias muestran una correcta inhibición de los microorganismos que se eligieron para el reto microbiano, por lo que resultan efectivas en las áreas donde se utilizan, ya que cada uno de los sanitizantes se ocupa en diferentes áreas dentro de la planta puesto que algunas son más sensibles a la entrada de agua que otras. Para las áreas donde existe mayor posibilidad de desarrollo microbiano se utiliza el sanitizante con sales cuaternarias de amonio en base alcohol, para evitar que aumente la humedad y con ello se favorezca el desarrollo de los microorganismos.

Los resultados del análisis de la muestra de agua que se ocupa para el proceso en general se muestran en la tabla 2. Se realizaron análisis para coliformes totales y fecales, tal como lo marca la NOM-127-SSA1-1994 (Secretaría de salud, 1994d).

Tabla 2. Resultados del análisis de agua potable utilizada en el proceso y límites permisibles

Análisis realizado	Resultado	Límites permisibles NOM-127-SSA1-1994
Coliformes totales por la técnica del número más probable	< 3 NMP/100 ml	2 NMP/100 ml
Coliformes fecales por la técnica del número más probable	< 3 NMP/100 ml	No detectable NMP/100 ml

Secretaría de Salud, 1994d.

El valor < 3 NMP/100ml expresa que no hubo crecimiento en ninguno de los tubos en que se inoculó la muestra, y de acuerdo con los resultados se puede observar que el agua que se ocupa para el proceso, actividades de limpieza y recirculación de los enchaquetados de los tanques cumple con los requisitos sanitarios establecidos motivo por el cual no representa un peligro de contaminación dentro de la planta. Además, es importante mencionar que se lleva a cabo un monitoreo diario por turno de los niveles de cloración del agua, para evitar que exista algún riesgo químico o biológico.

Las muestras ambientales se tomaron en 16 puntos diferentes dentro de la planta, se eligieron las zonas con mayor flujo de personal y materiales, así como de las salidas de aire que alimentan directamente al producto. Se expusieron placas de agar cuenta estándar para la búsqueda y cuantificación de bacterias mesofílicas aerobias (BMA), placas de agar bilis y rojo violeta para la búsqueda y cuantificación de coliformes totales (CT) y finalmente placas de agar papa dextrosa para la búsqueda de hongos y levaduras (HyL), cada una de ellas se colocó durante 30 minutos en el punto de muestreo (Figura 8).

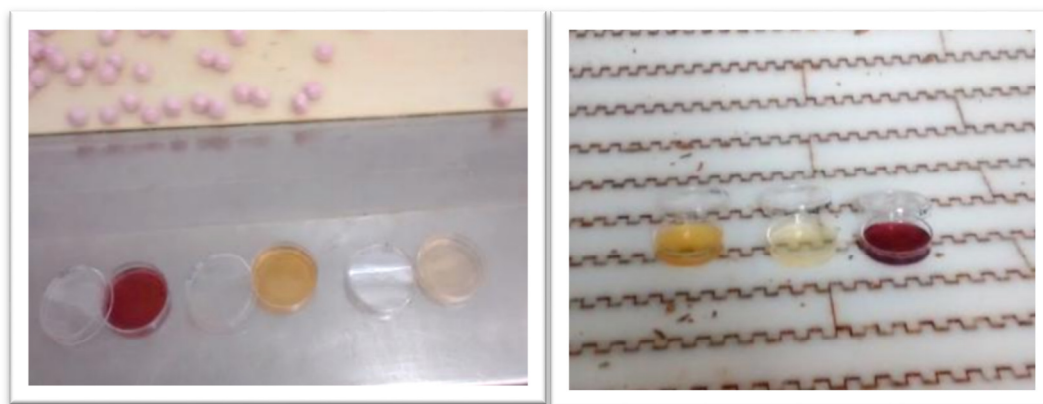


Figura 8. Placas para toma de muestra ambiental colocadas en diferentes puntos de la planta.

Los resultados se muestran en la tabla 3. En las placas de BMA se encontraron colonias sugestivas del género *Bacillus*, se realizó tinción de Gram y de acuerdo con la morfología colonial y microscópica observada (Figuras 9 y 10) se inocularon en agar MYP (Manitol, yema de huevo, polimixina), y agar sangre de carnero. En las figuras 11 y 12 se observa el crecimiento típico de *Bacillus cereus* en los diferentes agares. Colonias rosas, brillantes, con apariencia de vidrio esmerilado, con bordes irregulares y halo de lecitinasa en agar MYP; y colonias beta hemolíticas con hemólisis completa, de color gris a verde, aspecto de vidrio esmerilado y márgenes onduladas en agar sangre de carnero.

Tabla 3. Resultados del muestreo ambiental realizado dentro de las áreas productivas de la planta

Sitio de muestreo	Clave asignada	BMA	CT	HyL
Selección de caramelo	JA1	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Cocina	JA2	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Estiradora	JA3	Sin crecimiento	Sin crecimiento	1 UFC
Cabina A	JA4	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Cabina B	JA5	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Bombos	JA6	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Ductos de aire	JA7	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Cuarto frío	JA8	1 UFC	Sin crecimiento	1 UFC
Empaque	JA9	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Ishidas	JA10	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Cuarto caliente	JA11	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
UMAS (Unidades Manejadoras de Aire)	JA12	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Mezaninne	JA13	1 UFC	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Tanques de cobertura H y J	JA14	3 UFC	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Escaleras	JA15	Sin crecimiento	5 UFC	Sin crecimiento
Almacén	JA16	2 UFC	Sin crecimiento	1 UFC

UFC = unidades formadoras de colonias



Figura 9. Colonia sugestiva del genero *Bacillus* spp en agar cuenta estándar

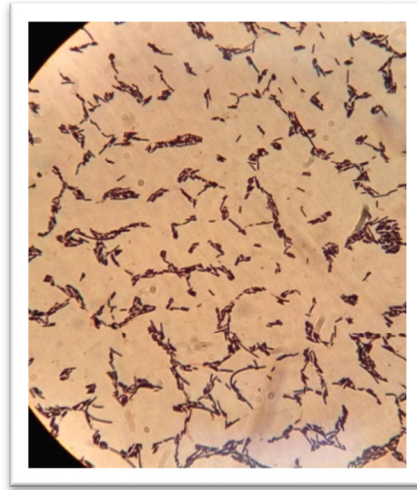


Figura 10. Bacilos gram positivos (100x) correspondientes a la colonia aislada



Figura 11. Colonias de *Bacillus cereus* en agar MYP



Figura 12. Colonias de *Bacillus cereus* en agar sangre de carnero

Del crecimiento encontrado en la placa de CT no fue posible identificar ningún microorganismo, debido a que las colonias eran completamente duras y no se pudo recuperar para asilamiento e identificación.

Finalmente los hongos fueron identificados como *Altenaria* spp. (Figura 13 – muestra JA3), *Cladosporium carrionii* (Figura 14 – muestra JA8) y *Fonsecae pedrosoi* (Figura 15 - JA16) en el laboratorio de micología por la M.S.P María de la Cruz Meneses Sánchez.



Figura 13. Colonia de *Alternaria* sp
Muestra JA3

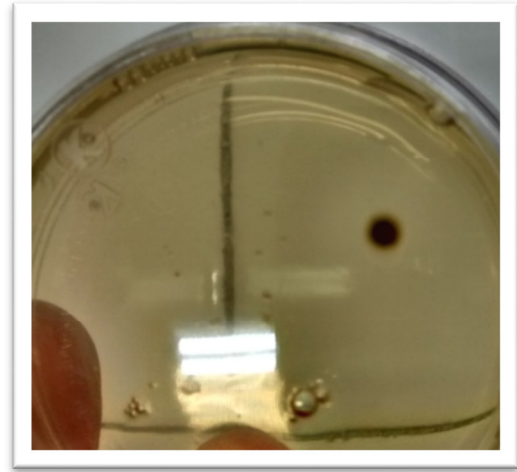


Figura 14. Colonia de *Cladosporium carrionii*
Muestra JA8

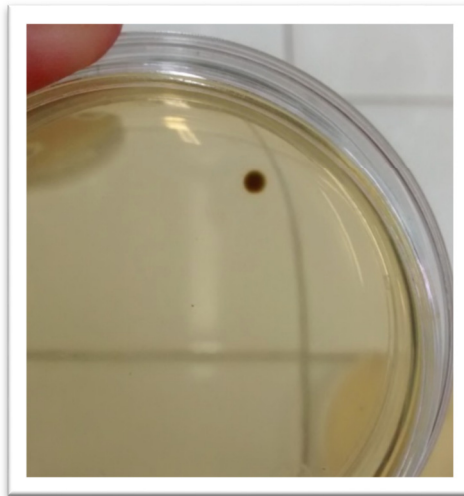


Figura 15. Colonia de *Fonsecae pedrosoi*
Muestra JA16

Bacillus spp. es un microorganismo cosmopolita y contaminante ambiental común. Puede ingresar a las áreas de producción a través de materias primas, cartón, empleados, ropa y polvo. Las esporas se pueden ocultar en superficies agrietadas y dañadas.

Las tres causas principales de la contaminación por *B. cereus* son:

1. Programas deficientes de limpieza y desinfección y/o no comprobar la eficacia de los agentes esporicidas utilizados para la desinfección
2. Control insuficiente de la limpieza de los materiales que entran en entornos controlados
3. Sistemas inadecuados de acondicionamiento del aire (Kundrat, 2016)

Alternaria spp. es un hongo patógeno de vegetales encontrándose principalmente en el suelo, en vegetales en descomposición (madera, frutas, cereales, hortalizas), en papel y tejidos (ropa, alfombras). Es un contaminante habitual en los edificios o en los lugares de trabajo, encontrándose en los sistemas de aire acondicionado y en las humedades generadas por condensación. La inhalación de las esporas o de los fragmentos del micelio conduce a procesos de sensibilización o alergia. Su presencia en ambientes laborales se ha relacionado con el Síndrome del Edificio Enfermo (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2014a).

Cladosporium carrionii es un hongo saprófito, normalmente se encuentra colonizando las plantas o en el suelo. Puede crecer en paja y madera húmeda, alimentos, combustibles fósiles, cosméticos (cremas), pinturas, plásticos, papel y tejidos (ropa, alfombras, cuero). Las esporas se encuentran en forma de bioaerosol en el aire, principalmente a finales de verano y principios de otoño, sobre todo en zonas templadas, siendo un contaminante habitual en los edificios o en los lugares de trabajo (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2014b).

Fonsecae pedrosoi es un hongo productor de cromoblastomicosis, micosis subcutánea o de implantación de curso crónico causada por un grupo de hongos melanizados o dematiáceos (negros); se caracteriza por la formación de nódulos de aspecto verrugoso localizados en particular en miembros inferiores. La enfermedad se presenta en climas tropicales y subtropicales. En México las zonas de mayor endemia son: la Huasteca, el sur de Veracruz, Puebla, Tabasco, Chiapas y la península de Yucatán (Bonifaz, 2012).

Los hongos y la bacteria aislados corresponden a las características del interior de la planta, debido a que no existe un recambio de aire, tampoco hay grandes entradas del exterior al interior; el aire interno recircula y es únicamente enfriado y filtrado (los filtros son para partículas, no microbiológicos) por las unidades manejadoras de aire.

Actualmente no existe normativa legal sobre valores límite para agentes biológicos en la industria alimentaria, pero se puede utilizar como referencia los siguientes valores, de acuerdo con el Cost Project 613 Report N° 12, un documento de la OMS editado en 1993 por la comisión de las comunidades europeas (Commission of the European Communities, 1989).

Tabla 4. Niveles de contaminación ambiental de acuerdo con la concentración de bacterias en el aire

Nivel de contaminación	Concentración de bacterias (UFC/m³ en el aire)
Muy baja	<50
Baja	50 – 100
Intermedia	100 – 500
Alta	500 – 2000
Muy alta	>2000

Commission of the European Communities, 1989.

Tabla 5. Niveles de contaminación ambiental de acuerdo con la concentración de hongos en el aire

Nivel de contaminación	Concentración de hongos (UFC/m³ en el aire)
Muy baja	<25
Baja	25 – 100
Intermedia	100 – 500
Alta	500 – 2000
Muy alta	>2000

Commission of the European Communities, 1989.

Al comparar los datos obtenidos del muestreo con los valores presentados en las tablas 4 y 5 se puede observar que los niveles de contaminación ambiental en la planta son muy bajos tanto para bacterias como para hongos, motivo por el cual se considera que el ambiente es propicio para la elaboración de alimentos, siempre y cuando se mantengan los cuidados necesarios para evitar el ingreso de contaminantes. Es importante destacar que el método de muestreo no fue el mismo

que se utilizó en la bibliografía reportada, por tal motivo en este trabajo no se reporta la concentración de microorganismos en UFC/m³, solamente como UFC/placa.

Respecto a las muestras de las superficies correspondientes a los métodos de limpieza que se emplean actualmente, los resultados se muestran en la tabla 6. De acuerdo con los resultados obtenidos del muestreo, se puede observar que los sanitizantes están ejerciendo su función al mantener las condiciones higiénicas para el arranque del proceso y el aseguramiento de la inocuidad del producto. La temperatura a la que se utilizan es temperatura ambiente en algunas áreas mientras que en otras es a temperaturas menores a 30°C. El tiempo de contacto de cada sustancia química sanitizante con las superficies es mínimo de 5 minutos. El pH al que reaccionan ambas sustancias; dióxido de cloro y sales cuaternarias, no presenta ningún problema, ya que ambas tienen la capacidad de efectuar sus funciones tanto en condiciones ácidas como alcalinas de acuerdo a lo consultado en la bibliografía. Las concentraciones que se ocupan también forman parte de las recomendaciones de cada proveedor; para las sales cuaternarias de amonio no se recomienda realizar diluciones, esto repercutiría en una disminución de la efectividad del agente químico, no así en el caso del dióxido de cloro; donde, el proveedor presenta un tabla con varias diluciones propuestas de acuerdo al uso que se le quiera dar y en dependencia de si existirá un enjuague posterior o no a la aplicación del sanitizante. Los resultados internos con los que se cuenta dentro de la planta respecto a la dureza del agua que se ocupa para el proceso es de 355mg/L de CaCO₃, el valor límite permisible de acuerdo a la NOM-127-SSA1-1994 es de 500mg/L, el agua con la que se cuenta es medianamente dura, pero cumple con los requerimientos de la autoridad sanitaria. Finalmente, una gran parte de los resultados obtenidos de la efectividad de los sanitizantes es debida a que se realiza una limpieza adecuada antes de la aplicación de los mismos, dicha acción se realiza con trapos previamente desinfectados y sanitizados mismos que se utilizan una sola vez y se desechan. El operador responsable de cada máquina es quien ejecuta la limpieza, y no se realiza la sanitización hasta que existe una liberación por parte del área de calidad, quienes garantizan que no existen residuos sólidos en las áreas, así como que las partes más difíciles de alcanzar se limpiaron adecuadamente.

Tabla 6. Resultados del muestreo a superficies inertes realizado dentro de las áreas productivas de la planta antes y después de la limpieza y sanitización

Sitio de muestreo (Método de limpieza)		EB (UFC/100 cm ²)	CT (UFC/100 cm ²)	CF (UFC/100 cm ²)	<i>Salmonella spp.</i> (25 g de muestra)
Tanque de glucosa y mezclador	Antes de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
	Después de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
Pre-cocina y cocina	Antes de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
	Después de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
Estiradora	Antes de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
	Después de limpieza	9	< 3	< 3	Ausente
Bastonadora	Antes de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
	Después de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
Egalizadora	Antes de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
	Después de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
Troquel	Antes de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
	Después de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
Túnel de vacío y selección	Antes de limpieza	4	< 3	< 3	Ausente
	Después de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
Bombos	Antes de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
	Después de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
Cabinas	Antes de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
	Después de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
Empaque	Antes de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
	Después de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
Equipos de empaque	Antes de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
	Después de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente
Paredes, pisos, etc.	Antes de limpieza	3	3	3	Ausente
	Después de limpieza	< 3	< 3	< 3	Ausente

Las condiciones antes mencionadas cumplen de manera satisfactoria con las propuestas por cada uno de los proveedores motivo por el cual se garantiza la efectividad de las sustancias químicas. Únicamente hay 3 puntos que se encontraron con presencia de microorganismos, los números no reflejan una contaminación microbiológica si no alguna deficiencia en un punto de limpieza que

es posible corregir al cambio de turno, momento en el cual se realiza nuevamente todo el procedimiento de limpieza. Estos resultados demuestran que los métodos de limpieza siguen siendo válidos tal y como se encuentran redactados hasta el momento, siempre y cuando se ejecuten de manera correcta.

De las muestras de superficies se aislaron colonias a partir de tubos de caldo Mossel (Figura 16, 17), se realizó la identificación mediante pruebas bioquímicas.

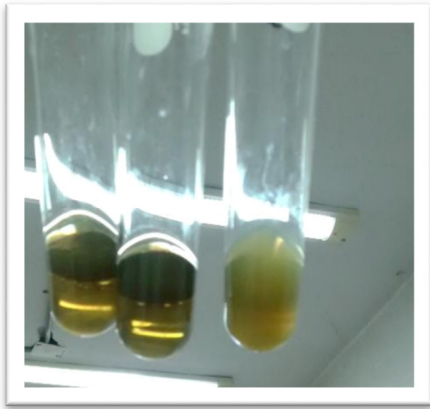


Figura 16. Turbidez en tubos con caldo Mossel.



Figura 17. Crecimiento a partir de caldo Mossel en agar bilis rojo violeta glucosa

En base a las pruebas bioquímicas utilizadas se identificó *E.coli*: (Figuras 18 y 19)



Figura 18. Prueba de oxidasa negativa

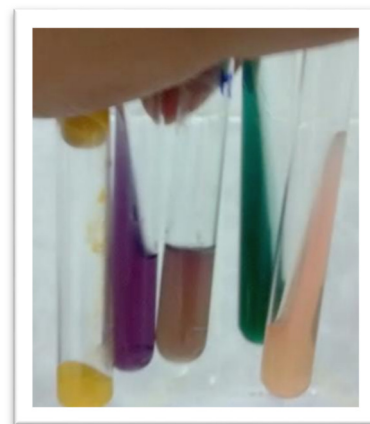


Figura 19. Pruebas bioquímicas

Los coliformes totales y fecales se determinaron de acuerdo a la metodología propuesta (Figuras 20, 21, 22 y 23). Solamente se obtuvo una muestra positiva para cada una de las determinaciones,

fue la muestra correspondiente al piso de la planta, el número obtenido refleja que aun el piso de la planta se conserva en condiciones adecuadas.



Figura 20. Prueba para coliformes totales en caldo lauril triptosa

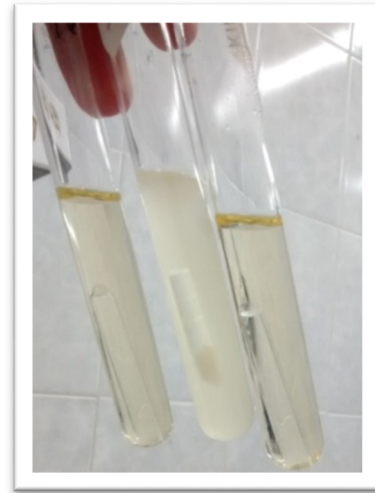


Figura 21. Prueba para coliformes fecales en caldo lauril triptosa



Figura 22. Prueba confirmativa en caldo EC para coliformes totales



Figura 23. Prueba confirmativa en caldo caldo EC para coliformes fecales

En ninguna de las muestras se obtuvo crecimiento, para el caso de la búsqueda se *Salmonella* spp. Después del pre-enriquecimiento y enriquecimiento, no se encontró desarrollo en las placas de agar Salmonella-Shigella, sulfito de bismuto o XLD.

8. Conclusiones

Los sanitizantes utilizados actualmente en la planta de confitería son efectivos conforme a las concentraciones y tiempo de contacto utilizados.

La verificación *in vitro* de los sanitizantes que se utilizan actualmente en la planta de confitería realizada con las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y *Escherichia coli* ATCC 8739 demostró que dichas sustancias químicas son efectivas para el mantenimiento de las condiciones higiénicas dentro de la planta.

El agua almacenada en la cisterna cuenta con la calidad sanitaria necesaria para su uso en el proceso, esto se evidenció mediante el análisis de coliformes totales y fecales.

El aire dentro de las áreas de proceso es propicio para elaborar un producto alimenticio, ya que no se encontró un número elevado de bacterias mesofílicas y hongos contaminantes; está exento de contaminación por coliformes totales.

El análisis de las superficies mediante la cuantificación de enterobacterias, coliformes totales, coliformes fecales y *Salmonella* spp. demostró que la aplicación de las sustancias sanitizantes es efectiva para mantener disminuidas las cargas microbianas tanto en las superficies como en las áreas aledañas del proceso.

Los métodos de limpieza actualmente empleados son adecuados para las necesidades de la planta, y quedaron validados con los resultados microbiológicos obtenidos antes y después de la aplicación de los sanitizantes en las máquinas de proceso de la planta de confitería.

No es necesario modificar los métodos de limpieza ya que los documentos cuentan con la información y características necesarias para que se asegure la sanidad de los equipos.

9. Recomendaciones

- Para garantizar que el producto no se encuentra expuesto a algún agente que lo pueda contaminar es importante monitorear las manos del personal que manipula el producto, se podría robustecer este trabajo si se analizan las manos del personal que se encuentra laborando.
- Sería posible acortar los tiempos de limpieza entre turnos para mejorar la productividad, siempre que se cuente con un análisis estadístico que soporte dicha disminución, para lo cual sería necesario reevaluar los tiempos y frecuencias de limpieza, capacitar al personal para no generar confusiones y realizar muestreos microbiológicos que demuestren que no existe un riesgo de contaminación.

10. Bibliografía

1. Alba, N. y Araujo F. (2008). *Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza y desinfección del área de fitoterapéuticos en laboratorios Pronabell LTDA.* (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
2. Arispe, I. y Tapia, M. (2007). Inocuidad y calidad: requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. En *Agroalimentaria*, 13, 24, 105-117. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199216580008>
3. Bonifaz, J.A. (2012) *Micología médica básica (4ª ed.)*. México, D.F: McGRAW-HILL INTERAMERICANA.
4. Carchi, M. y Serrano, D. (2016) *Análisis de la efectividad del amonio cuaternario y ácido peracético frente a coliformes totales y Escherichia coli en superficies inertes del área de empaques al vacío de la planta de embutidos piggis.* (Tesis de licenciatura). Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador.
5. Commission of the European Communities. (1989). *Cost project 613. Strategy for Sampling Chemical Substances in Indoor Air*, Report. EUR 12617 EN, Luxembourg. Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/201a300/ntp_289.pdf
6. Dióxido de cloro. (2017) Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/fulltext/desinfección/capitulo7.pdf>. Consultado por última vez: 07 de Noviembre de 2017
7. DNV-GL. (2016). *APA style: Electronic references*. Recuperado de: <https://www.dnvgl.com.mx/services/fssc-22000-sistema-de-certificacion-en-inocuidad-alimentaria-5161>
8. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J. (1997). *Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras*. Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A. pp. 133-157.
9. Frazier, W.C., y Westhoff, D.C. (1988). *Microbiología de los alimentos (4ª ed.)*. Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A. pp. 547-556.
10. FSSC 22000. (2017). *APA style: Electronic references*. Recuperado de: <http://www.fssc22000.com/documents/home.xml?lang=en>
11. Herrera, M. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Metodología de laboratorio. En *Rev. méd. Hosp. nac. niños Dr. Carlos Saenz Herrera*, 34. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010. Consultado por última vez: 18 de Enero de 2018.

12. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (2014a) *Alternaria* sp. Disponible en: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Alter%20spp.pdf>. Consultado por última vez: 11 de junio de 2018.
13. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (2014b) *Cladosporium* spp. Disponible en: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Cladosporium%20spp.pdf>. Consultado por última vez: 11 de junio de 2018.
14. ISO. (1993). Microbiology -- General guidance for the enumeration of *Enterobacteriaceae* without resuscitation -- MPN technique and colony-count technique. ISO 7402.
15. ISO. (2009). Prerequisite programmes on food safety – Part 1: Food manufacturing. ISO/TS-22002-1. Switzerland.
16. James, M.J. (1992). *Microbiología Moderna de los Alimentos (3ª ed.)*. Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A.
17. Kundrat, L. (2016). Expedientes de casos de aislados ambientales: *Bacillus cereus*. En: Tiselab. Soluciones GMP. Disponible en: <http://www.tiselab.com/home/expedientes-de-casos-de-aislados-ambientales-bacillus-cereus/> Consultado por última vez: 02 de Junio de 2018.
18. LIDIAV, Laboratorio de investigación y diagnóstico veterinario (2001). Manual de procedimientos para el control microbiológico de alimentos. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=HcsOAQAIAAJ&pg=PA26&dq=bacterias+mes%C3%B3filas+aerobias&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwj__5i2r4DaAhUPUa0KHas5CTgQ6AEILjAB#v=onepage&q=bacterias%20mes%C3%B3filas%20aerobias&f=false
19. Mercado, C. (2007), Los ámbitos normativos, la gestión de la calidad y la inocuidad alimentaria: una visión integral. En *Agroalimentaria*, 13, 24, 119-131. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199216580009>
20. Morales, M. (2015). *Evaluación y validación de un amonio cuaternario de quinta generación y un compuesto yodado en la desinfección de las áreas de producción de queso y yogurt en la empresa Prasol lácteos Santillán*. (Tesis de licenciatura). Escuela superior politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
21. Moreno, B. (1975). *Microorganismos de los alimentos técnicas de análisis microbiológico (2ª ed.)*. Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A.

22. Mossel, D.A.A., y Moreno G.B. (1982). *Microbiología de los Alimentos*. Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A. pp. 413, 414.
23. Mouteira, M. y Basso M. (2013). Limpieza y desinfección en las salas de extracción de miel. Recuperado de : <http://www.maldonado.uy/documentos/pdf/2017/procedimientos-saneamiento.pdf>
24. Picazo, J. (2000). Procedimientos en microbiología clínica. Recuperado de: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>.
25. PROAC.75.05. Limpieza en áreas productivas y no productivas. Diciembre, 2014.
26. Puig, Y., Robert, B.y Leyva, V. (2013). Factores epidemiológicos de interés en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en La Habana. En: *Rev. Cubana Hig. Epidemiol*, septiembre-diciembre, pp. 262-268. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032013000300004
27. Secretaría de Salud (1994a). Norma Oficial Mexicana NOM-0092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Publicación en el DOF: 15 de septiembre de 1994.
28. Secretaría de Salud (1994b). Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Publicación en el DOF: 13 de septiembre de 1995.
29. Secretaría de Salud (1994c). Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Publicación en el DOF: 25 de agosto de 1995
30. Secretaría de Salud (1994d). Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano – Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Publicación en el DOF: 20 de junio de 2000.
31. Secretaría de Salud (2009). Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Publicación en el DOF: 01 de marzo de 2010.
32. Secretaría de Salud (2014). Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos

indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Publicación en el DOF: 26 de Junio de 2015.

- 33.** Vallejos, Y. (2009). *Valoración de la efectividad antimicrobiana de un desinfectante de amonio cuaternario de última generación.* (Tesis de licenciatura, no publicada). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, Nicaragua.

**Anexo A. Protocolo de limpieza para arranque en áreas productivas
después de paros prolongados**

Protocolo para: Arranque en áreas productivas después de paros prolongados	Fecha: Jun.2018 Página: 1 de 6
--	---

1. OBJETIVO Y ALCANCE

Establecer de manera adecuada las actividades de limpieza que deben realizarse antes del arranque de la planta después de paros prologados (2 o más días), con el objetivo de iniciar los procesos productivos dentro en condiciones sanitarias adecuadas y eliminar la suciedad y/o microorganismos que pudieran haberse acumulado después de algún evento de paro.

Este procedimiento aplica a los departamentos que planean, ejecutan o vigilan actividades de limpieza en áreas productivas.

2. DOCUMENTOS RELACIONADOS

Procedimiento 1	Limpieza en áreas productivas y de servicio
Lista Maestra 1	Productos químicos de limpieza y sanitización autorizados
Método de limpieza 1	Marmita
Método de limpieza 2	Tanque glucosa y mezclador
Método de limpieza 3	Pre-cocina y cocina
Método de limpieza 4	Empaque horizontal
Método de limpieza 5	Estiradora
Método de limpieza 6	Bastonadora
Método de limpieza 7	Egalizadora
Método de limpieza 8	Troquel
Método de limpieza 9	Túnel y seleccionadora
Método de limpieza 10	Bombos
Método de limpieza 11	Cabinas
Método de limpieza 12	Empaque vertical

AUTORIZACION DEL DOCUMENTO (Firma y fecha)		
M. Velázquez Higienista	P. Hernández Admin. SGCI	J. Robles Gerente de Calidad
Elaboró	Revisó	Autorizó

Protocolo para: Arranque en áreas productivas después de paros prolongados	Fecha: Jun.2018 Página: 2 de 6
--	---

Método de limpieza 13	Equipos de empaque
Método de limpieza 14	Estructuras, pisos, paredes y lámparas
Método de limpieza 15	Almacenes, montacargas y transportes

3. RESPONSABLES

Gerente de Producción
Gerente de Calidad
Ingeniero de Proceso
Ingeniero de Calidad
Inspector de Calidad
Supervisor de Logística
Supervisor de Mantenimiento
Operador de montacargas
Personal interno

4. DEFINICIONES

LIMPIEZA Eliminación de polvo, residuos alimenticios, suciedad, grasa u otra materia objetable.

DETERGENTE Mezcla de sustancias de origen sintético, cuya función es abatir la tensión superficial del agua, ejerciendo una acción humectante, emulsificante y dispersante, facilitando la eliminación de mugre y manchas.

AUTORIZACION DEL DOCUMENTO (Firma y fecha)		
M. Velázquez Higienista	P. Hernández Admin. SGCI	J. Robles Gerente de Calidad
Elaboró	Revisó	Autorizó

<p>Protocolo para:</p> <p>Arranque en áreas productivas después de paros prolongados</p>	<p>Fecha: Jun.2018</p> <p>Página: 3 de 6</p>
---	--

SANITIZANTE Sustancia química que reduce el número de microorganismos a un nivel seguro. No necesita eliminar el 100 por ciento de todos los organismos para ser efectivo. Los sanitizantes deben reducir la cuenta de bacterias en un 99.999% ciento en 30 segundos. Este tratamiento no debe dar lugar a efectos adversos en el producto y debe ser inocuo para el consumidor.

DESINFECTANTE Sustancia química que destruye completamente todos los organismos listados en su etiqueta. Los organismos que matan son bacterias patógenas, y podrían o no matar virus y hongos. Los desinfectantes deben reducir el nivel de bacterias patógenas en un 99.999% durante un lapso de tiempo superior a 5 minutos pero que no exceda a 10 minutos.

VALIDACIÓN Acción de comprobar y documentar que cualquier proceso, procedimiento o método, conduce efectiva y consistentemente a los resultados esperados.

MÉTODO OPERATIVO DE LIMPIEZA Documento escrito autorizado dando instrucciones para ejecutar operaciones no necesariamente específicas para un producto o material, sino de una naturaleza más general (ej. operación de equipo, mantenimiento y limpieza; limpieza de instalaciones).

VALIDACIÓN DE LIMPIEZA Evidencia documentada que establece que los procedimientos de limpieza están eliminando residuos a niveles predeterminados de aceptabilidad., tomando en consideración factores tales como tamaño de lote y tamaño de equipo.

Protocolo para: Arranque en áreas productivas después de paros prolongados	Fecha: Jun.2018 Página: 4 de 6
--	---

5. DESARROLLO

Después de cualquier paro prolongado (2 días o más) de actividades en el área productiva deberá ejecutarse el siguiente protocolo de limpieza conforme a los métodos y procedimientos establecidos.

El ingeniero de proceso, de calidad, supervisor de logística y de mantenimiento son responsables de capacitar al personal directamente involucrado en la limpieza y sanitización en las diferentes áreas de la planta de acuerdo a los métodos establecidos. Aseguran que el personal que lleve a cabo los trabajos de limpieza y desinfección esté capacitado en los métodos establecidos para cada área, maquina, edificio o servicios.

Consideraciones generales.

Todos los productos de limpieza y desinfección que se utilicen deberán estar aprobados previo a su uso por el equipo de inocuidad.

Cada responsable deberá disponer de todo el material útil y necesario para la correcta ejecución de los trabajos de limpieza.

El personal que ejecute la limpieza dentro de la planta deberá estar capacitado para realizar dichas funciones.

Las soluciones químicas detergentes y sanitizantes deberán prepararse en las concentraciones adecuadas para asegurar la efectividad de las sustancias.

Los materiales de limpieza se lavaran y sanitizarán adecuadamente antes y después de realizar cualquier actividad en el área de acuerdo al método de limpieza establecido.

Revisar que todos los servicios (aire, agua, energía eléctrica, gas) funcionen adecuadamente en la planta antes de iniciar.

El ingeniero de proceso y supervisor de logística supervisaran la correcta ejecución de la limpieza en el área correspondiente.

El personal interno y los operadores de maquina ejecutarán las labores de limpieza de acuerdo a los métodos de limpieza vigentes establecidos.

Protocolo para:

Arranque en áreas productivas después de paros prolongados

Fecha: Jun.2018**Página:** 5 de 6

Antes de manipular cualquier superficie, artículo de limpieza o sustancia química de limpieza el personal se lavará las manos de acuerdo al método de limpieza establecido.

Para lograr la higienización correcta de equipos y estructuras se deben recoger primero todos los residuos sólidos, suciedad, grasa, cochambre, etc. y otros residuos.

La limpieza debe iniciarse de las partes superiores, es decir; de los techos y estructuras hacia abajo, continuando con las paredes y finalmente los pisos de acuerdo a la metodología establecida.

Posteriormente se realizará limpieza profunda en los equipos de producción de acuerdo a los métodos aplicables para cada uno. Las áreas en contacto directo con el producto deberán tener especial atención al momento de la limpieza y sanitización así como de su liberación.

Seguimiento de limpieza.

El ingeniero de proceso y supervisor de logística deberán revisar de manera visual que se lleven a cabo las diferentes técnicas y tipos de limpieza dependiendo del área y la criticidad de la misma. Se asegurará de que no exista mezcla de utensilios de limpieza en las diferentes áreas en las se encuentra definido el color.

Liberación de limpieza.

La higienista de la planta deberá liberar los equipos, utensilios y áreas después de ser ejecutadas las técnicas de limpieza y sanitización, asegurando que:

- El proceso de limpieza elimino todos los residuos presentes (grasas, partículas metálicas, orgánicas, etc.)
- Se limpiaron las zonas de difícil acceso de los equipos y las áreas cercanas al mismo (partes lejanas, juntas, bisagras, etc.)

Se deberá poner especial atención a los sitios en contacto directo con el producto; si se observa la presencia de mugre o de residuos sobre las superficies en contacto con el alimento, o si la revisión indica incumplimiento con el proceso de limpieza se deberán limpiar nuevamente las superficies para eliminar el residuo antes de realizar la liberación.

<p>Protocolo para:</p> <p>Arranque en áreas productivas después de paros prolongados</p>	<p>Fecha: Jun.2018</p> <p>Página: 6 de 6</p>
---	--

Las charolas y tarimas que se ocupan para el transporte y colocación del producto a granel, deberán retirarse del área productiva, lavarse y sanitizarse adecuadamente de acuerdo al método de limpieza establecido. Posteriormente deberán ser liberadas por el inspector de calidad.

Una vez realizada la liberación de todas las áreas y equipos, el personal operativo deberá hacer una nebulización de toda la planta, iniciando de la parte interna hacia el exterior.

Inicio de actividades productivas.

Se deberán asegurar los tiempos de contacto de los sanitizantes en las superficies de contacto de acuerdo a las recomendaciones de cada proveedor.

6. CONTROL DE CAMBIOS

Versión	Modificaciones	Responsable
Cero	Nuevo documento	M. Velázquez

Anexo B. Capacitación microbiológica de “5 minutos” al personal operativo de la planta.

PROGRAMA DE CAPACITACION MICROBIOLOGICO “5 MINUTOS”

Día 1. ¿Qué son los microorganismos? ¿Dónde están?

Hay personas que creen que los gérmenes son bichitos, piojos u otros animalillos asquerosos. Probablemente piensan en los feos y despreciables gérmenes que aparecen en los comerciales de televisión para los productos de limpieza: pequeños monstruos verdes y peludos que no son nada buenos. En realidad, los gérmenes son unos organismos diminutos que nuestros ojos no pueden ver, únicamente es posible observarlos a través de un microscopio. Son tan diminutos y difíciles de detectar que se pueden introducir dentro de nuestro cuerpo sin que nos demos cuenta, viven sobre nosotros y todo lo demás y aunque no se ven, están en todos lados. En este extenso grupo podemos incluir a los virus, bacterias, levaduras, hongos y parásitos que pululan en el planeta Tierra. Cuando se introducen en nuestro organismo, no sabemos que los tenemos hasta que presentamos síntomas que indican que nos han atacado.

¿Dónde se encuentran los microorganismos?

Los microorganismos son muy pequeños y livianos que se dispersan con gran facilidad. Los puedes encontrar en todas partes: en el agua, el aire, la tierra, en el polvo ambiental, en nuestro cuerpo, en la ropa, en los alimentos, en los animales y en las plantas. Cuando las condiciones ambientales son favorables se reproducen con facilidad. En cambio cuando el medio es inhóspito y no es de su agrado pueden encerrarse en cápsulas denominadas esporas.

Las bacterias son un aspecto muy importante de la salud, y las bacterias "buenas" ayudan al cuerpo a funcionar apropiadamente. Los niños generalmente disfrutan una historia que tiene "chicos buenos" y "chicos malos", así que el cuento de la bacteria buena y mala será probablemente un éxito para tu hijo.

Día 2. ¿Qué necesitan los microorganismos para crecer?

Los microorganismos como seres vivos que son, necesitan condiciones adecuadas para crecer y desarrollarse. Los factores que influyen en el desarrollo bacteriano son:

- Temperatura: la mayoría de los gérmenes capaces de producir enfermedades, crecen mejor a temperaturas próximas a los 37° C, por ello son capaces de crecer dentro de nuestro organismo y producirnos algún tipo de enfermedad. Las temperaturas bajas retrasan el crecimiento de los gérmenes, a temperaturas de refrigeración este crecimiento es muy lento, por ello en la nevera los alimentos se conservan durante más tiempo. Las altas temperaturas producen la muerte y destrucción de la mayoría de los microorganismos
- Humedad: el agua es un elemento indispensable para la vida, incluida la de los microorganismos, cuanto mayor sea el contenido en agua de un alimento más fácil será que crezcan los gérmenes, contaminándolo y alterándolo
- pH: es una medida de la acidez de un medio, un medio neutro es aquel que tiene un pH de 7, los medios ácidos son los que tienen valores de pH inferiores a 7, mientras que los que tienen pH superior a este valor se dice que son básicos o alcalinos. La mayoría de los gérmenes crecen mejor en medios que tengan un pH próximo a la neutralidad.
- Nutrientes: los gérmenes para multiplicarse requieren nutrientes. Los distintos tipos de microorganismos requieren distintos tipos de nutrientes
- Tiempo: cuando estas condiciones son óptimas una sola bacteria puede producir más de 2 millones en 7 horas ya que cada microorganismo se divide en 2 cada 20 minutos.
- Oxígeno: algunos microorganismos necesitan la presencia de oxígeno para crecer, otros pueden hacerlo en condiciones de microaerofilia y algunos más en condiciones anaerobias.

Sabiendo que estos factores podemos influir sobre ellos para que no afecte a la inocuidad de los alimentos.

Día 3. Los microorganismos en la industria alimentaria y microorganismos patógenos

Actualmente sabemos que hay dos tipos de microorganismos: los perjudiciales y los beneficiosos.

Los microorganismos patógenos o perjudiciales son todos aquellos que son capaces de provocar enfermedades, infecciones en el organismo en el cual se encuentran. Los patógenos transmitidos por los alimentos pueden afectar seriamente a cualquier persona, pero para las mujeres embarazadas y sus bebés, algunos patógenos pueden ser especialmente nocivos, incluso fatales. Los más conocidos son *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, entre otros.

Los microorganismos beneficiosos, por el contrario, son los que viven en simbiosis con nosotros (como la flora intestinal). Son bacterias que viven en nuestro cuerpo, protegiéndolo y, a cambio, obteniendo alimento. Alimentos como el queso, chocolate, pan, vino y cerveza están elaborados con ayuda de diferentes tipos de microorganismos.

Los microorganismos también tienen un potencial importante en la medicina y la ciencia. Son generalmente utilizados para la producción de antibióticos, vacunas e insulina.

Los microorganismos que viven en el suelo permiten mejorar la productividad agrícola. Los seres humanos utilizan organismos naturalmente para desarrollar fertilizantes y biopesticidas.

Día 4. ETAS

Pocas personas saben que los alimentos que consumimos todos los días pueden causarles enfermedades conocidas como ETA. Llamadas así porque el alimento actúa como vínculo en la transmisión de organismos patógenos y sustancias tóxicas.

Las ETA están causadas por la ingestión de alimentos y/o aguas contaminados con agentes patógenos. Las alergias por hipersensibilidad individual a ciertos alimentos no se consideran ETA, por ejemplo, la alergia al maní o a los frutos de mar que sufren algunas personas.

Los padecimientos transmitidos por los alimentos pueden reconocerse sólo cuando ocurre un brote y varias personas experimentan una enfermedad similar después de ingerir un alimento en común.

Para facilitar la identificación de los agentes posibles en las enfermedades transmitidas por los alimentos, estos síntomas se clasifican según el período de incubación y el tipo de síntoma.

El diagnóstico correcto se obtiene a través de un muestreo específico de los alimentos o cultivos bacteriológicos de la sangre a veces.

¿Cómo se contaminan los alimentos?

Los microorganismos peligrosos pueden llegar a los alimentos en cualquier momento, desde que son producidos en el campo hasta que son servidos. Cuando aquéllos sobreviven y se multiplican pueden causar enfermedades en los consumidores. La contaminación es difícil de detectar, ya que generalmente no se altera el sabor, el color o el aspecto de la comida. Una defectuosa preparación, cocción o almacenamiento, también, son las principales causas para la aparición de las bacterias, que comienzan a multiplicarse y hacen el consumo peligroso para la salud.

La preparación o manipulación de los alimentos son factores claves en el desarrollo de las ETA, por lo que la actitud de los consumidores resulta muy importante para prevenirla. De hecho, las estadísticas elaboradas por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos indican que prácticamente el 40% de los brotes de ETA ocurren en el hogar.

Día 5. Lavado de manos

No todas las personas tienen el hábito de lavarse las manos con frecuencia o cuando se las lavan no lo hacen correctamente. Las manos pueden transportar varios microorganismos peligrosos. La presencia de estos microorganismos puede ocasionar serios problemas en la salud del consumidor.

Una correcta limpieza y desinfección de manos evita la transmisión de estas infecciones de las personas o utensilios hacia los alimentos, con ello conseguimos rebajar los riesgos de infecciones y otras enfermedades.

Cualquier manipulador de alimentos tiene en sus manos la salud de muchas personas, por ello es necesaria la utilización de productos para la limpieza y desinfección eficaces.

¿Cómo lavarse las manos correctamente?

El procedimiento para lavar las manos de forma correcta se describe a continuación:

Mojar las manos y los antebrazos hasta los codos con agua caliente (35°C – 45°C). Enjabonar bien las manos y los antebrazos con una cantidad suficiente de jabón desinfectante; frotar vigorosamente los espacios entre los dedos, el dedo pulgar y las palmas de las manos durante por lo menos 20 segundos. Cepillar las uñas con un cepillo adecuado, que deberá mantenerse limpio en una solución sanitizante. Pasar las manos y los antebrazos por agua caliente hasta eliminar completamente el jabón. Secar muy bien las manos, y colocar gel antibacterial.

Se deben lavar las manos:

- Al ingresar al área de proceso, antes de iniciar el trabajo
- Siempre que cambiemos de tarea
- Después de ir al baño
- Después de tocarse el pelo, ojos, nariz, boca, oídos y cualquier parte del cuerpo
- Después de limpiar
- Después de tocar superficies sucias.

Día 6. BPM y certificaciones

Las BPM son lineamientos a seguir que se enfocan en las personas y en las instalaciones, con la finalidad de disminuir los riesgos por contaminación de alimentos, y obtener productos inocuos.

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) se aplican en todos los procesos de elaboración y manipulación de alimentos y son una herramienta fundamental para la obtención de productos inocuos. Constituyen un conjunto de principios básicos con el objetivo de garantizar que los productos se fabriquen en condiciones sanitarias adecuadas y se disminuyan los riesgos inherentes a la producción y distribución.

Cuando tenemos un producto o servicio es necesario evaluarlo para determinar su finalidad. Sus características tienen que ser normalizadas en un documento denominado "Norma". Para ello debe haber un acuerdo de sus fabricantes, usuarios, autoridades u asociaciones profesionales, entre otros.

Sabiendo esto una certificación de calidad es el resultado de un proceso por el cual los auditores o evaluadores de la empresa certificadora examinan la conformidad de ese producto o servicio según los requisitos de la norma. Si el resultado es satisfactorio se emitirá un documento público: el certificado.

¿Con que certificaciones cuenta la planta?

- ISO 9001
- FSSC 22000

Esto nos coloca como una planta que cumple con los lineamientos no solo a nivel nacional, sino también internacional, lo cual nos genera la posibilidad de colocarnos mejor en el mercado y poder obtener mejores ingresos.