

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE UN AGENTE DESINFECTANTE
UTILIZADO EN PLANTAS PROCESADORAS DE CARNE

Trabajo Final de Graduación.
Presentado a la Facultad de Microbiología.
Universidad de Costa Rica

Para optar por el grado de licenciatura en Microbiología y
Química Clínica

Álvaro Carvajal Mejías

Tutora:
Dra. Maria Laura Arias Echandi

Noviembre 2007



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA**

**FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO**

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el viernes 06 de julio del año 2007 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante **ALVARO CARVAJAL MEJIAS** carné A10777, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de **PRACTICA DE GRADUACIÓN**, para optar por el grado académico de **LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA** y el título profesional de **DOCTOR EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA**.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dr. Carlos Chacón **PRESIDENTE**

Dra. María Laura Arias

Dra. Evelyn Rodríguez

Dr. Fernando Chaves

Dra. María del Mar Gamboa

ARTICULO 1

El presidente informa que el expediente de **ALVARO CARVAJAL MEJIAS**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que el postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

El postulante **ALVARO CARVAJAL MEJIAS**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación título "Evaluación de la efectividad de un agente desinfectante utilizado en plantas procesadoras de carne".

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 10.0

ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica al Postulante el resultado de la deliberación y lo declara acreedor al grado de **Licenciado en Microbiología y Química Clínica** y al título profesional de **Doctor en Microbiología y Química Clínica**.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocado. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y al Postulante, a las 10.10 a.m. horas.

Dr. Carlos Chacón
Presidente

Dra. María Laura Arias

Dra. Evelyn Rodríguez

Dr. Fernando Chaves

Dra. María del Mar Gamboa

Álvaro Carvajal Mejías
Postulante

DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a mis padres
y a mis hermanos, por todos
estos largos años de esfuerzos
y sacrificios, por estar siempre
ahí para mí, a pesar de todo.*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por todo el apoyo que me han dado y por todo el esfuerzo que estoy seguro han realizado para ayudarme a salir adelante con todas las cosas que implica llevar los estudios universitarios. Muchas gracias de verdad por hacerme sentir siempre que no estaba solo.

A Karen, por ayudarme en tantas ocasiones que lo necesité, gracias por ser mi apoyo más cercano en tantas situaciones, y gracias porque sin tu ayuda no habría podido realizar algunas partes de esta investigación.

A las doctoras María Laura Arias Echandi y Evelyn Rodríguez Cavallini, por guiarme en la realización de este trabajo. Su experiencia, consejo y apoyo fueron invaluableles en cada una de las fases del trabajo. Muchas gracias.

A Laura Villalobos, Pablo Vargas, Martín Quesada y a todo el personal del laboratorio de Microbiología Básica y Anaerobios y del laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos de la Universidad de Costa Rica, ya que de alguna u otra forma, todos formaron parte de la realización de esta investigación. Les estoy muy agradecido.

A Caro, por tenerme tanta paciencia todo este tiempo. Debo aprender aún muchas cosas de ti niña.

A Mau, porque aunque no estés físicamente con nosotros, tu presencia aún sigue aquí. Gracias por todo lo que has hecho por mí desde donde estas.

Al personal del Laboratorio Clínico del Hospital Nacional de Niños, gracias por escucharme tantas veces en estos últimos meses y por ayudarme a aprender tantas cosas que es necesario aprender de un hospital.

A Dios, porque a pesar de que no tenemos la mejor de las relaciones, sé y siento, que nada de esto hubiera sido posible sin él.

ÍNDICE GENERAL

PÁGINA DE FIRMAS.....	1
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE GENERAL.....	5
ÍNDICE DE CUADROS.....	6
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	9
ANTECEDENTES.....	10
Introducción.....	11
Industria cárnica.....	14
Contaminación de los productos cárnicos.....	16
Desinfección en la industria cárnica.....	18
Ácido peracético.....	19
PATÓGENOS, INDICADORES DE CONTAMINACIÓN Y VIDA ÚTIL.....	22
Indicadores de vida útil y <i>Escherichia coli</i>	22
<i>Staphylococcus aureus</i>	24
<i>Clostridium perfringens</i>	25
JUSTIFICACIÓN.....	28
MARCO METODOLÓGICO.....	29
Objetivo general.....	30
Objetivos específicos.....	30
METODOLOGÍA.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Materiales.....	31
Métodos.....	32
RESULTADOS.....	36
DISCUSION.....	44
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. <u>Recuentos coloniales de tres indicadores microbiológicos con y sin aplicación de un agente desinfectante a base de ácido peracético para quince muestras</u>	33
Cuadro II. <u>Influencia del aumento del tiempo de exposición al agente desinfectante a base de ácido peracético sobre el recuento de tres indicadores microbiológicos</u>	37

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. <u>Resultados de los recuentos bacterianos (UFC/g) obtenidos para <i>E. coli</i> ATCC 25922, en quince muestras tratadas y quince muestras no tratadas con ácido peracético</u>	37
Gráfico 2. <u>Resultados de los recuentos bacterianos (UFC/g) obtenidos para <i>S. aureus</i> ATCC 25923, en quince muestras tratadas y quince muestras no tratadas con ácido peracético</u>	38
Gráfico 3. <u>Resultados de los recuentos bacterianos (UFC/g) obtenidos para <i>C. perfringens</i> ATCC 13124, en quince muestras tratadas y quince muestras no tratadas con ácido peracético</u>	38
Gráfico 4. <u>Recuentos bacterianos para <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 y <i>C. perfringens</i> ATCC 13124 según aumentos en los tiempos de exposición al agente desinfectante a base de ácido peracético</u>	41
Gráfico 5. <u>Recuentos bacterianos para <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 y <i>C. perfringens</i> ATCC 13124 al ser expuestos a una dilución de ácido peracético de 160 p.p.m. y 220 p.p.m durante 1 minuto</u>	42
Gráfico 6. <u>Recuentos bacterianos para <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 y <i>C. perfringens</i> ATCC 13124 al ser expuestos a una dilución de ácido peracético de 160 p.p.m. y 220 p.p.m durante 5 minutos</u>	42
Gráfico 7. <u>Recuentos bacterianos para <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 y <i>C. perfringens</i> ATCC 13124 al ser expuestos a una dilución de ácido peracético de 160 p.p.m. y 220 p.p.m durante 10 minutos</u>	43
Gráfico 8. <u>Recuentos bacterianos para <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 y <i>C. perfringens</i> ATCC 13124 al ser expuestos a una dilución de ácido peracético de 160 p.p.m. y 220 p.p.m durante 20 minutos</u>	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ácido peracético.....	20
---------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

PIB: Producto Interno Bruto.

HACCP: Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control.

g/mol: gramos/mol.

°C: grados Celsius.

g/mL: gramos /mililitro.

mmHg: milímetros de mercurio.

pK_a: Constante de disociación ácida.

FDA: Agencia de Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos.

AMC: Agar McConkey.

ABP: Agar Baird Parker.

OPSP: Agar Perfringens de Oxoid.

PRAS: Medios Pre-reducidos antes de Esterilizar.

APE: Agua Peptonada Estéril.

L: Litro.

mL: Mililitro.

CTS: Caldo Tripticasa Soya.

BHI: Infusión Cerebro Corazón.

ATCC: Colección Americana de Cepas Tipo.

RESUMEN

Los productos cárnicos de consumo humano son un grupo de alimentos altamente perecederos. Los productores de estos deben implementar medidas de control del crecimiento de microorganismos relacionados con enfermedad humana debida al consumo de los mismos. En la actualidad no solamente se utilizan desinfectantes para superficies de contacto, herramientas u otros objetos inanimados, sino también sobre el producto mismo. Se probó la capacidad microbicida del agente desinfectante ácido peracético sobre muestras de carne cruda previamente inoculadas con varios indicadores microbiológicos. Se observó una disminuida capacidad de reducir las poblaciones bacterianas presentes no solamente bajo tiempos de exposición superiores a los utilizados en la práctica industrial, sino bajo concentraciones mayores a las indicadas por la casa comercial productora pero dentro del rango considerado como seguro para su uso.

PALABRAS CLAVE:

CARNICOS - INDUSTRIA CARNICA - CONTAMINACION BACTERIANA - ACIDO PERACETICO - DESINFECCION.

ANTECEDENTES

INTRODUCCIÓN

La proteína representa una parte importante de la dieta humana. Los alimentos ricos en proteína se obtienen principalmente de carne de animales o de productos animales como huevos y leche (Mahan y Escott-Stump, 2001).

La carne magra es el tejido muscular de los animales. La composición de la carne de los diferentes animales muestra una considerable variación y la composición de incluso un solo tipo de carne, como la de res, varía de acuerdo con la raza, el tipo de alimentación y la parte del animal de donde procede la carne. El tejido muscular consiste aproximadamente de tres cuartas partes de agua y una cuarta parte de proteína junto con una pequeña cantidad variable de grasa; y aproximadamente un 1% de elementos minerales y algunas vitaminas incluidos en esta fracción no acuosa (Fox y Cameron, 2004).

El requerimiento alimentario recomendado para la proteína es de 0,8g/kg de peso corporal en un adulto sano. Para obtener esta cantidad, el ser humano requiere que la proteína alimentaria constituya casi del 10 al 15% de su consumo total de energía (Mahan y Escott-Stump, 2001).

Debido a su escasez y a la importancia que tienen como nutrimento, estos compuestos se han convertido actualmente en el foco de atención de la industria alimentaria en el mundo; a pesar de existir una gran cantidad de nitrógeno en la Tierra, este se encuentra en forma elemental en la atmósfera y no es aprovechable para llenar las necesidades biológicas del ser humano, ya que para la síntesis de sus proteínas, de ácidos nucleicos y de otras sustancias nitrogenadas de gran interés solo se utiliza el nitrógeno orgánico proveniente de los aminoácidos que obtiene de su dieta.

Estas sustancias desempeñan funciones biológicas en el organismo humano, entre las que se cuenta principalmente la regeneración y formación de tejidos, la síntesis de enzimas, anticuerpos y hormonas, y como constituyente de la sangre, entre otras;

forman parte del tejido muscular y conectivo de los animales y de otros sistemas rígidos estructurales (Badui, 1999).

La obtención de la carne de consumo se logra mediante el sacrificio de diversos animales, por ejemplo de la res.

Después de sacrificado el animal, el glucógeno presente en el tejido muscular es desdoblado por etapas en ácido láctico con la consecuente disminución del pH (Fox y Cameron, 2004). Con esto se logra, no solamente el mejoramiento de las cualidades organolépticas del producto, otorgándole mejor sabor, más suavidad y jugosidad; sino que también se le protege del crecimiento y consiguiente deterioro del mismo por diversos microorganismos, debido a la disminución del pH.

La experiencia ha demostrado que la carne y sus derivados plantean problemas de higiene alimentaria con mucha más frecuencia que otros alimentos (Jay, 1992).

Si la carne se mantiene por demasiado tiempo a temperatura ambiente se satura de agua y se descompone, debido en parte al desdoblamiento de las proteínas por las enzimas proteolíticas. Finalmente, se inicia la putrefacción con producción de material viscoso y olores desagradables causados por diversas bacterias. Además de la descomposición causada por el desdoblamiento de las proteínas, la carne puede verse afectada por la oxidación de las grasas que siempre están presentes. Las grasas insaturadas son más propensas a enranciarse por la oxidación, y es por esta razón que la carne de aves de corral, cerdo, cordero y ternera no se puede conservar tanto tiempo como la carne de res, ya que tienen una más elevada proporción de grasas insaturadas (Fox y Cameron, 2004).

Si un alimento no se protege del crecimiento de microorganismos, este se puede deteriorar y representar no solo un peligro para la salud humana, sino también se puede traducir en importantes pérdidas económicas para el productor. Por esto, es deseable el

establecimiento de medidas de control para evitar el deterioro de los alimentos, lo cual cobra particular importancia en el ámbito industrial, ya que procesos inadecuados de producción pueden representar enormes pérdidas económicas para el productor, y además un grave peligro para la salud pública debido a la presencia de microorganismos o sustancias capaces de comprometer la salud humana.

Además de causar la descomposición de los alimentos, algunos microorganismos producen diversas toxinas las cuales son nocivas para los seres humanos y si se ingieren alimentos contaminados por ellos pueden dar como resultado una intoxicación por alimentos (Fox y Cameron, 2004).

A nivel industrial se invierten grandes cantidades de dinero en mantener la producción, por lo que es muy importante obtener no solo grandes cantidades de carne, sino que además de segura (por los posibles riesgos legales que puede implicar un alimento poco seguro) esta debe ser de alta calidad y adecuadas propiedades organolépticas, satisfaciendo así las necesidades del cliente.

Un alimento que no está fresco no es necesariamente dañino pero por lo general es menos atractivo para el consumidor que uno más fresco. También puede ser menos nutritivo y por consiguiente tener un precio más bajo (Fox y Cameron, 2004).

Por esto, es importante para el productor controlar el desarrollo de microorganismos durante los procesos de producción cárnica, con el fin de obtener un producto más seguro, de calidad y de mayor valor comercial.

En nuestro país la carne y sus derivados representan una parte importante de la dieta normal. Costa Rica es un país altamente consumidor de carne, dado que en el 97,9% de los hogares costarricenses se consume algún tipo de carne (Aguilar, 1993), lo cual demuestra que el mercado costarricense de productos cárnica representa una parte

importante de la producción alimentaria. De hecho este porcentaje se amplía a 99,3% si se incluye a los hogares en los que se consumen embutidos (Aguilar, 1993).

En vista de que la carne es un producto de alto valor nutricional y de alto consumo en nuestro país, es deseable que los productores de carne nacionales implementen medidas de control para evitar el crecimiento de microorganismos cuyo desarrollo puede ir en detrimento de la seguridad y de la calidad organoléptica y nutricional del alimento, aparte de la disminución concomitante del valor comercial de la misma producto de la alteración de sus propiedades naturales, a causa de lo cual se obtendría un producto menos deseable para el consumidor, lo que finalmente se traduciría en un producto de menor rentabilidad para el productor (Kunigk y Almeida, 2001).

Industria cárnica

En el país, la industria alimentaria tiene un peso importante en la economía. El grueso de exportaciones de productos primarios incluye alimentos perecederos como frutas y hortalizas, carnes, pescado y mariscos, que son susceptibles a contaminaciones físicas, químicas y microbiológicas que pueden afectar la salud humana (Sáenz, 2001).

En el área de las exportaciones es muy importante la higiene y calidad microbiológica de los alimentos que se exportan a otros países. Los países desarrollados que representan un mercado muy importante para los productos costarricenses, tienen normas estrictas de control de calidad de los productos que pretenden atravesar sus fronteras, por lo que el industrial exportador debe encontrar los medios necesarios para lograr un producto de alta calidad y seguridad que sea aceptado por los otros países comerciantes. Además el propio país puede representar para el industrial un excelente mercado para sus productos.

En la década de 1990 al 2000, el sector de la industria alimentaria ha experimentado fuertes cambios, y de alguna manera ha sido un importante motor en el desarrollo económico de Costa Rica. La industria alimentaria ha aportado en promedio el 8% del producto interno bruto (PIB) (Sáenz, 2001).

Con el tiempo, las empresas dedicadas al sacrificio y preparación de carne para mercado han mejorado su nivel tecnológico y muchas de ellas ya cuentan con planes de control de riesgos sanitarios, en parte obligados por el mercado internacional, y en parte por la labor por el Departamento de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura. Las industrias de derivados de carne han mejorado también su nivel tecnológico, sin embargo aun subsisten muchas pequeñas empresas artesanales que carecen de las precauciones sanitarias básicas (Sáenz, 2001).

En muchas zonas rurales se mantiene la costumbre de sacrificar animales para consumo local o regional, que no pretende la exportación o venta masiva y por tanto no reciben la inspección más adecuada. Algunos investigadores han observado en estos establecimientos que tanto la infraestructura como el equipo son inapropiados o deficientes para el manejo higiénico de alimentos, por tanto las posibilidades de contaminación microbiológica de la carne son sustancialmente alta (Sáenz, 2001). Esto puede representar un riesgo para la salud de los consumidores de dichos productos, ya que es muy difícil lograr un control adecuado de los productos obtenidos.

Al año 2001 en el país existían cinco mataderos formalmente instalados a escala industrial, la mayoría de ellos reparten su producción entre el mercado local y el mercado de exportación (Sáenz, 2001). Debido a que existen fuertes regulaciones internacionales sobre inocuidad y riesgos asociados a los productos cárnicos, muchos de estos productores cuentan ya con planes de inocuidad de alimentos, que deben derivar hacia planes de riesgos y puntos críticos de control (HACCP), estos planes de inocuidad son supervisados por la Dirección de Sanidad Agropecuaria, Departamento de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería, quienes tienen la potestad tanto

nacional como internacional de hacer estas verificaciones de cumplimiento y otorgar los permisos de exportación (Sáenz, 2001).

La carne para mercado local que sale de estos mataderos industriales ha cumplido básicamente los mismos requisitos que la carne para exportación, excepto que no se ha empacado para exportación y su tiempo de almacenamiento es mínimo.

La razón básica para la instauración de programas de inocuidad de carnes radica en que este producto puede fácilmente contaminarse a lo largo del flujo del proceso por contacto con trabajadores, con superficies sucias, residuos fecales, equipo mal lavado, desarrollo de microorganismos por malas condiciones del almacén, entre otros. (Sáenz, 2001).

Contaminación de los productos cárnicos

Normalmente, los animales de consumo tienen una flora normal asociada, presente en grandes cantidades en piel, pelo, tracto gastrointestinal, etc. Al momento del sacrificio esta flora asociada puede alcanzar tejidos estériles del animal, por lo que si esta situación no se previene y controla, el alimento está en riesgo de convertirse en inseguro.

Antes del sacrificio, los tejidos internos comestibles de un animal sano se pueden considerar estériles. Se encuentran protegidos de la contaminación por la piel que funciona como la primera barrera inmunológica del animal. Además el tracto intestinal sirve como barrera efectiva a la inmensa masa de microorganismos que contiene. Normalmente, cualquier microorganismo que penetrase estas barreras sería destruido rápidamente por las defensas naturales del organismo. Tras el sacrificio, sin embargo, estos mecanismos quedan anulados, y los tejidos expuestos se hacen altamente perecederos.

Una vez que el animal ha sido sacrificado, y luego de pasar por varios procesos, es separado en dos mitades o canales, las cuales son almacenadas a bajas temperaturas en espera de nuevos procesos. Aquí la carne es almacenada para ser procesada y obtener diversos cortes o derivados, los cuales se pueden destinar a consumo local o a exportación.

Una vez en este punto, la canal puede destinarse a diversos procedimientos que pueden acarrear nueva contaminación o producir un aumento de la ya presente. Por tanto, es deseable que a este nivel se implementen acciones tendientes a controlar la carga microbiana del producto, ya que procedimientos como el despiezado y el recorte aumentan el área total del tejido disponible, por lo cual se favorecería el crecimiento microbiano.

En estos procesos, al manipularse las canales y ser transportadas en fracciones más pequeñas, las áreas de corte van obteniendo una carga microbiana creciente, siendo fuentes de contaminación los cuchillos, sierras, machetes, cuchillas giratorias, trituradoras, tablas de picar, entre otros. (Sáenz, 2001).

Esto es controlado de diversas formas en los mataderos más grandes, pero es sabido que en carnicerías más pequeñas, las medidas higiénicas de control microbiano podrían ser deficientes. Por esto, es importante el desarrollo de técnicas y métodos que ayuden al productor (grande y pequeño) en la obtención de carne de alta calidad y que ofrezca seguridad del consumidor.

La carne de consumo se ha asociado a menudo con múltiples microorganismos causantes de enfermedades en el humano. Entre las bacterias patógenas más frecuentes encontradas en la carne y sus derivados tenemos a *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum* (Freitas-Leitão, 1978).

Además, existen informes de que en carnes de bovinos de Costa Rica se ha detectado la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., y *Toxoplasma gondii*, todos causantes de problemas de salud humana (Reyes *et al.*, 2001).

Desinfección en la industria cárnica

En la industria alimentaria la desinfección juega un papel de especial interés. De esto depende en buena parte la seguridad e inocuidad de los productos de consumo obtenidos. Se han utilizado diversos métodos y sustancias para lograr un producto de calidad microbiológica, obteniendo en cada parte del proceso piezas seguras que no vayan a comprometer la eficacia de posteriores métodos o puntos de control en la línea de producción.

Así, se han aplicado desinfectantes y sanitizadores, productos utilizados con el fin de reducir o mitigar el crecimiento o desarrollo microbiológico de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y virus, en diversas superficies inanimadas (Food and Drug Administration, 1998).

En los últimos años se ha venido discutiendo el potencial de los microorganismos para adquirir resistencia a los antimicrobianos y sanitizadores utilizados en el procesamiento de alimentos (Davidson y Harrison, 2002), por lo que es importante el desarrollo de nuevas tecnologías y técnicas de desinfección en la industria alimentaria, con el fin de hacer frente a esta amenaza de posible resistencia.

Los sanitizadores son utilizados generalmente para inactivar microorganismos en superficies en contacto con alimentos o en equipo limpio de procesamiento o de servicios de alimentación. Sin embargo en los últimos tiempos se les ha empezado a dar un uso diferente, empleándolos en la inactivación de microorganismos en productos

alimenticios crudos no procesados, por ejemplo usándolos directamente sobre las canales de res o pollo o sobre frutas y vegetales frescos (Davidson y Harrison, 2002).

Además de la utilización de estos agentes sobre los productos no procesados, es innegable su importancia en la obtención de derivados y productos procesados, como lo son los embutidos, ya que la sanitización continuada de todos los locales, máquinas, aparatos, utensilios y objetos con sustancias eficaces, así como de las manos del personal que participe en la fabricación del embutido, es requisito indispensable para la obtención de productos en perfectas condiciones y con la adecuada capacidad de conservación (Coretti, 1971).

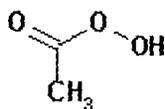
La desinfección adecuada de los equipos de proceso, las instalaciones, entre otras acciones, logra una reducción sustancial de la contaminación microbiológica de la carne, si a esto aunamos un producto ya tratado para reducir su carga intrínseca microbiana, el resultado es un producto cárnico de alta calidad microbiológica.

Todo esto podría permitir, no solamente obtener un producto de gran estabilidad, sino que también permitiría a su vez una reducción en la necesidad de recurrir a los preservantes sintéticos aplicados a los productos alimenticios (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1995).

Ácido peracético

El ácido peracético es un peroxiácido orgánico, cuya masa molecular es de 76.05g/mol, su punto de fusión es de -0.2°C, punto de ebullición de 105°C, densidad de 1.226g/mL y presión de vapor de 14.5mmHg a 25°C; es corrosivo a la mayoría de metales, incluyendo el aluminio, con pK_a de 8.20 a 25°C. A temperatura ambiente, es un líquido incoloro de olor fuerte y penetrante, altamente irritante a la piel y los ojos (Flemming, 1984), Su estructura química es la siguiente:

Figura 1.
Ácido peracético.



Es un agente altamente oxidante, el cual tiene un potencial de oxidación mayor que el cloro (Organic Materials Review Institute, 2000).

Su mecanismo de acción primario es la oxidación de la membrana externa de las células vegetativas bacterianas, endosporas, mohos y levaduras, mediante la transferencia de electrones (OMRI, 2000).

El ácido peracético fue patentado en 1950 para tratar frutas y vegetales con el fin de reducir el deterioro producido por hongos y levaduras, el desarrollo de formulaciones para tratamientos alternos al cloro y la irradiación se ha dado de manera relativamente frecuente (OMRI, 2000).

Actualmente el uso primario de esta sustancia es en el procesamiento y manejo de alimentos como sanitizador de superficies y como desinfectante para frutas, vegetales, huevos y carne (OMRI, 2000), y fue aprobado para estos usos por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos según el Código de Regulaciones Federales, en su título 21, partes 173.315 y 173.370 (FDA, 1998).

La formulación generalmente incluye ácido peracético, peróxido de hidrógeno y un agente estabilizante (a menudo ácido 1-hidroxietilidien-1,1-difosfónico) (OMRI, 2000).

Es ampliamente efectivo contra diversos microorganismos y no es inactivado por catalasa o peroxidasa, enzimas que sí afectan otros sanitizadores como el peróxido de hidrógeno (Davidson y Harrison, 2002), y tiene la particularidad de no haberse reportado resistencia microbiana al mismo hasta el momento (Kunigk y Almeida, 2001).

El ácido peracético es utilizado especialmente en instalaciones de manejo de alimentos a escala industrial, ya que actúa a baja temperatura y pH, y a que el producto de su degradación -ácido acético- apenas si necesita ser enjuagado. Además, se ha empleado en el proceso de blanqueamiento de pulpa virgen de papel libre de hipoclorito, debido a sus propiedades fuertemente oxidantes, contribuyendo a reducir la contaminación ambiental (Davidson y Harrison, 2002).

Aunque es un producto altamente irritante, se ha demostrado que no hay liberación de sustancias tóxicas evaporables en el aire luego de la desinfección, exceptuando los derivados mismos del ácido peracético (Flemming, 1984).

La exposición ocupacional a este ácido puede ocurrir mediante contacto dérmico o inhalación de vapores, por lo que equipo de protección personal debe ser utilizado por las personas que lo manipulan (Parmeggiani, 1983).

Siendo este un producto tan oxidante, sería posible pensar que puede alterar la composición de las moléculas que conforman los alimentos, lamentablemente, no se encuentra mucha información disponible sobre el impacto nutricional del ácido peracético en los alimentos tras su aplicación, aunque sí se han hecho trabajos, por ejemplo con arroz (Tamiguchi *et al.*, 1982).

PATÓGENOS, INDICADORES DE CONTAMINACIÓN Y DE VIDA ÚTIL

Indicadores de vida útil y *Escherichia coli*.

Es posible hacer un análisis de las poblaciones microbianas presentes en las piezas de carne de animales recién sacrificados, y de los productos derivados de los ulteriores procesamientos de estos.

Las carnes crudas presentan una flora normal muy heterogénea, consistente de bacterias mesófilas y psicrótrofas provenientes de diversas zonas del mismo animal, y algunas especies son introducidas por el humano y los equipos durante el procesamiento (Vanderzant y Splittstoesser, 1995).

La microbiota presente en la superficie de animales recién sacrificados, usualmente entre 10^2 a 10^4 bacterias por pulgada cuadrada, es principalmente mesófila, y es originaria de tracto gastrointestinal y superficies externas del animal. La contaminación proveniente del ambiente de la sala de sacrificio es también ampliamente mesófila, todo lo cual puede contribuir a la contaminación y consecuente deterioro del producto cárnico (Vanderzant y Splittstoesser, 1995).

Debido a que el ambiente post-proceso es habitualmente refrigerado, los psicrótrofos toman gran importancia, ya que incrementan su número, a pesar de que los productos se encuentren almacenados a temperaturas de refrigeración adecuadas. Eventualmente llegan a causar deterioro y de esta forma determinan la vida de anaquel del producto. (Vanderzant y Splittstoesser, 1995), por esto para el productor es de vital importancia aplicar medios de reducción de las poblaciones microbianas presentes en el producto, máxime si el interés principal es el de la exportación del producto, ya que este deberá pasar mucho más tiempo en refrigeración antes de llegar al mercado de destino, por lo que el aumento de la vida útil del alimento se debe alargar lo más posible.

Comúnmente se ha utilizado el nivel de coliformes como un buen indicador de las condiciones higiénicas de todo el proceso de obtención del producto cárnico (Vanderzant y Splittstoesser, 1995). Esto puesto que, como sugirió Sharding en 1982, aunque se podrían buscar otros microorganismos francamente patógenos directamente, el análisis de coliformes fecales es mucho más fácil de realizar que la búsqueda de especies de *Salmonella* (Vanderzant y Splittstoesser, 1995).

Pese a esto, es importante recordar que *E. coli* es en sí un patógeno importante, productor de diversos cuadros clínicos, entre los cuales cabe citar las enfermedades gastrointestinales, las cuales se asocian a al menos cinco clases principales de *E. coli* productoras de diarrea:

- Enteropatógena.
- Enterotóxigena.
- Enteroinvasiva.
- Enterohemorrágica.
- Enteroagregativa.

Esta clasificación se basa en factores de virulencia definidos, manifestaciones clínicas asociadas al cuadro, epidemiología y serotipos O:H (Mahon y Manuselis, 2000). Aparte de este grupo otros microorganismos se han asociado a las carnes frescas, por ejemplo enterococos, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* están a menudo presentes en los tejidos frescos ya que el proceso de sacrificio a menudo no incluye un paso bactericida (Vanderzant y Splittstoesser, 1995).

El grupo de coliformes fecales está restringido a organismos que crecen en el tracto gastrointestinal de humanos y otros animales de sangre caliente y se caracteriza por incluir bacterias tipo bacilares gram negativos no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos. Se incluye miembros de al menos tres géneros: *Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Debido a que mucha evidencia implica a diversas cepas de *E. coli* en eventos patogénicos, y dado que *Klebsiella* es mucho más ubicua de lo que se pensaba, algunos investigadores han propuesto la recuperación y enumeración de *E. coli* como un índice de contaminación fecal (Vanderzant y Splittstoesser, 1995).

***Staphylococcus aureus*:**

El crecimiento de *S.aureus* en los alimentos representa un riesgo importante para la salud pública (Arias *et al.*, 2006).

Este microorganismo es una bacteria cuya distribución en la naturaleza es bastante amplia, incluyendo piel, pelo y nasofaringe del ser humano, lesiones purulentas, aire, polvo, plumas, entre muchas otras (Arias *et al.*, 2006), y a nivel industrial, en el procesamiento de materias primas en la industria cárnica, es posible encontrar esta bacteria como microbiota indígena de los humanos encargados de los procesos de sacrificio y de los mismos animales sacrificados para consumo, y como tal, se puede considerar un buen indicador de la correcta o incorrecta manipulación de los productos alimenticios; además se puede asociar directamente con patologías humanas.

En alimentos crudos, especialmente en los productos animales, la presencia de *S aureus* es común y puede no estar relacionada con contaminación humana. La contaminación con *S. aureus* de piel, pelo y plumas de animales es común, y puede o puede no ser resultado de lesiones y tejidos dañados.

Algunas cepas de *S. aureus* producen enterotoxinas, las cuales en realidad son neurotoxinas que tienen su efecto a nivel de los centros reguladores de la náusea y el vómito, las cuales son las causantes de las intoxicaciones alimentarias asociadas a este microorganismo (Arias *et al.*, 2006). El cuadro clínico producido aparece entre una y siete horas después de ingerido el alimento contaminado, e incluye eventos como náuseas, vómito, dolor abdominal, postración, entre otras manifestaciones. Los alimentos habitualmente asociados a intoxicación por *S. aureus* son las carnes (res, cerdo y pollo) y los derivados de la carne (Vanderzant y Splittstoesser, 1995), la leche en polvo y fluida, repostería rellena de crema, queso, helados, ensalada de papa, entre otros (Arias *et al.*, 2006).

Además, su presencia en los alimentos puede indicar contaminación post-proceso, la cual usualmente se debe a contacto humano con los alimentos ya procesados o a exposición a superficies de procesamiento inadecuadamente higienizadas (Vanderzant y Splittstoesser, 1995).

***Clostridium perfringens*:**

Los microorganismos pertenecientes al género *Clostridium* tienen gran importancia en la salud humana al ser causantes de serias infecciones o intoxicaciones. Una de las especies más frecuentes del género es *C. perfringens*, antes conocida como *C. welchii*, descrita en 1882 por Welch y Nuttal como *Bacillus aerogenes capsulatus* nov. spec. (Welch y Nuttal, 1882).

C. perfringens produce una de las enfermedades de origen alimentario más frecuentes en el hombre (Vanderzant y Splittstoesser, 1995). Esta se presenta debido a la acción de una enterotoxina producida por las células al esporular, cuyo principal efecto se da directamente sobre el epitelio intestinal, inhibiendo el transporte de glucosa. Producto de esto, se presenta un cuadro clínico con diarrea y dolores abdominales de gran intensidad que se presentan entre seis y doce horas posteriores al consumo del

alimento contaminado y que resuelve por sí solo en menos de 24 horas (Gutiérrez *et al.*, 1999). Los alimentos usualmente involucrados son alimentos a base de carne de res o pollo conteniendo grandes cantidades de células viables. La carne y los productos cárnicos son los alimentos que más se asocian con el cuadro de toxiinfección producido por esta bacteria, debido principalmente a su necesidad de consumir 13 diferentes aminoácidos, los cuales no pueden sintetizar, y que se encuentran en la carne (Boyd, *et al.*, 1948). Una toxina termolábil producida y liberada *in vivo* en el intestino únicamente por células esporuladas induce los síntomas del envenenamiento por esta bacteria (Vanderzant y Splittstoesser, 1995).

Cuando los alimentos se mantienen a una temperatura de 43 a 45°C, las formas vegetativas de *C. perfringens* pueden multiplicarse rápidamente, debido a que esta es la temperatura óptima para su crecimiento. Incluso, la bacteria puede reproducirse en alimentos mantenidos en baño maría a temperaturas superiores a 50°C, alcanzando altos números en un período corto de tiempo (Labbé, 1991). Se ha visto que el cuadro de toxiinfección alimentaria asociado a esta bacteria se asocia principalmente al consumo de productos cárnicos mantenidos por largo tiempo a temperaturas por debajo de 70°C (Gutiérrez *et al.*, 1999).

Se ha comprobado que son más termorresistentes las cepas de *C. perfringens* que han estado expuestas a calentamientos repetitivos, ya que se van acostumbrando a temperaturas cada vez más altas. Por esto, esta bacteria se propone como indicador para monitorear la seguridad microbiológica, calidad sanitaria y vida útil de los productos cárnicos (Tompkin, 1983).

En nuestro país diversos estudios han demostrado la importancia de esta bacteria en el ámbito de los productos alimentarios. Por ejemplo, Montoya (1995) demostró que la incidencia de *C. perfringens* en las carnes molidas de comercios ubicados en la provincia de Alajuela es de hasta un 69%, valor que se considera muy elevado.

En otros estudios realizados en Costa Rica (Gutiérrez *et al.*, 1999) se ha demostrado hasta un 63% de positividad para este microorganismo en muestras de alimentos de diferentes servicios de alimentación pública y hasta un 44% de positividad para esta bacteria en diferentes procesados de carne como chorizo, salchichón o mortadela, demostrando así que los embutidos y no solamente las carnes procesadas son importantes como riesgo de toxiinfección alimentaria por *C. perfringens* (Morera *et al.*, 1999).

JUSTIFICACIÓN.

Debido a que el control del crecimiento microbiano juega un papel preponderante en el deterioro de la carne de consumo, y puesto que de esto depende no solo la inocuidad del alimento, sino también la calidad y la ganancia obtenida del producto, es importante el desarrollo de nuevas sustancias utilizables en el control bacteriano. Además es importante comprobar que estas nuevas tecnologías están funcionando correctamente. Por tanto se justifica la determinación de la efectividad de un desinfectante nuevo utilizado en la industria cárnica nacional, con el fin de verificar su funcionalidad real y proteger así al consumidor de carne, y a las empresas interesadas en implementar estos nuevos sistemas.

MARCO METODOLÓGICO

Objetivo General

- Determinar la efectividad del desinfectante ácido peracético en el procesamiento de productos cárnicos.

Objetivos específicos

- Determinar la supervivencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* en carnes tratadas con ácido peracético.
- Determinar la supervivencia de *S. aureus*, *E. coli* y *C. perfringens* según aumentos en el tiempo de exposición al ácido peracético.
- Determinar la capacidad microbicida del agente desinfectante a base de ácido peracético utilizándolo a concentraciones mayores de las indicadas por el fabricante.

METODOLOGÍA

Materiales y Métodos

Materiales

Lozas estériles.

Cuchillos y tenedores estériles.

Balanza granataria.

Bistec comercial.

Placas de agar McConkey (AMC).

Placas de agar Baird Parker (ABP).

Placas de agar *Perfringens* de Oxoid (OPSP).

Placas de agar sangre.

Sobrecapas de agar-agar.

Jarras de anaerobiosis.

Sobres generadores de anaerobiosis GasPak[®].

Tubos de medio "Chopped-meat" (PRAS).

Tubos con 9mL de agua peptonada estéril (APE) 0.1%

Botellas con 225mL de APE 0.1%.

Pipetas estériles de 1mL.

Pipetas estériles de 5mL.

Micropipeta y puntas estériles.

Placas de petri de vidrio estériles.

Probeta de 1L estéril.

Probetas de 50mL estériles.

Botellas con 50mL de Caldo Tripticasa Soya (CTS) estéril.

Tubos con 50mL de medio BHI anaerobio.

Cultivos puros de *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *C. perfringens* ATCC 13124.

Bolsas para Stomacher[®].

Incubadoras a 35°C y a 45°C.

Jeringas de tuberculina.

Araña de gas nitrógeno.

Congelador a -70°C.

Refrigeradora.

Stomacher[®].

Métodos

Determinación de la efectividad *in vitro* de un desinfectante a base de ácido peracético, utilizando tres indicadores bacterianos sobre muestras de carne.

Se cortaron de manera estéril 30 trozos de carne y se ajustó el peso de cada uno a 25g. Cada trozo fue almacenado individualmente en bolsas para Stomacher® a una temperatura de -70°C. Para descongelar las muestras a trabajar, se colocaron dieciocho horas antes de iniciar el trabajo a temperatura refrigeración. Simultáneamente se inocularon sendas botellas de CTS con cultivos de *E. coli* ATCC 25922 y de *S. aureus* ATCC 25923, y un tubo de BHI anaerobio con *C. perfringens* ATCC 13124 y se incubaron, los primeros 2 a 35°C por 18-24 horas, y el medio anaerobio a 44,5°C por 18-24 horas.

Una vez cumplidos estos tiempos, se preparó un pool de bacterias mezclando 5mL de cada uno de los caldos de cultivo, y paralelamente se preparó la solución de trabajo del desinfectante ajustando la dilución de trabajo aproximadamente a 80 p.p.m. (según instrucciones del fabricante).

Se tomaron los trozos de carnes en pares, a los cuales se les inoculó 1mL del *pool* bacteriano y se dejó en reposo por 1 minuto. Posteriormente a uno de los trozos se le añadió 1mL de la solución de trabajo del desinfectante y al otro 1mL de APE 0.1% y se dejaron en reposo durante 1 minuto.

Se agregó a cada uno 225mL de APE 0.1% (obteniéndose una dilución de 10^{-1}) y se homogenizó en Stomacher®. A partir de esta dilución inicial, se prepararon diluciones decimales hasta 10^{-5} con APE 0.1%. Se sembraron las diluciones según el método de esparcimiento en agar (Vanderzant y Splittstoesser, 1995), utilizando platos de AMC, ABP y OPSP. Posteriormente se agregó a los platos de OPSP una sobrecapa de agar-agar y se dejó solidificar.

Se incubó las placas de AMC y de ABP a 35°C durante 24 horas y las de OPSP a 44,5°C en jarra de anaerobiosis durante 24 horas. Al término del tiempo de incubación, se realizó el recuento de bacteriano (con y sin aplicación del desinfectante) en cada medio de cultivo.

Para esto, se contaron como unidades formadoras de colonia (UFC) de *E. coli*, todas aquellas colonias que se observaron en AMC como colonias secas, rosadas (lactosa positivas), con un halo rosado alrededor de sales biliares precipitadas (Mahon y Manuselis, 2000); y a su vez, se contaron como UFC de *S. aureus* todas aquellas colonias que se observaron en ABP como colonias negras, convexas, con borde blanco y con una zona de aclaración alrededor (Arias *et al.*, 2006).

Para el caso de *C. perfringens*, se tomaron como UFC todas aquellas colonias que se observaran luego de la incubación anaerobia como colonias de color negro (Hauschild y Hilsheimer, 1974).

Determinación de la influencia del tiempo de exposición a un desinfectante a base de ácido peracético sobre la efectividad de este como agente microbicida.

Se utilizaron 8 muestras de carne cortadas y almacenadas de la misma forma que en el punto anterior. Se preparó de la misma forma el *pool* bacteriano y se aplicaron sobre cada uno de los 4 pares de muestras a probar 1mL de dicho *pool*, se dejaron reposar durante 1 minuto y se agregó a 3 pares de ellos 1 mL de la solución de trabajo recién preparada del desinfectante a base de ácido peracético y se dejaron reposar cada uno durante 5, 10 y 20 minutos (un par de muestras por cada tiempo de exposición). Finalmente, se agregó 1mL de APE 0.1% al cuarto par de trozos con el fin de establecer un recuento basal de microorganismos.

Se agregaron 225mL de APE 0.1% a cada uno de los pares de muestras y se homogenizaron en Stomacher® (dilución 10^{-1}) y a partir de aquí se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-5} . Se sembraron dichas diluciones según el método de esparcimiento en agar (Vanderzant y Splittstoesser, 1995) en AMC, ABP y OPSP (al que se le agregó sobrecapa) y se incubaron según procedimiento del apartado anterior.

En la determinación de las colonias a considerar en cada medio de cultivo se emplearon los criterios descritos anteriormente.

Se calcularon los recuentos bacterianos en cada medio de cultivo como un promedio de los dos platos inoculados para cada tiempo de exposición al desinfectante y se utilizó el par de muestras a las que no se les aplicó el desinfectante como medida del recuento bacteriano sin exposición al agente desinfectante (representado en el cuadro II y en el gráfico 4 como “tiempo 0”).

Determinación de la capacidad microbicida del agente desinfectante a base de ácido peracético a concentraciones mayores que las indicadas por el fabricante.

Se partieron y almacenaron de forma estéril, 12 trozos de carne de 25g cada uno. Se preparó un *pool* bacteriano de la misma forma que en los apartados anteriores. Se inoculó 1mL del mismo a 3 trozos de carne y se dejó interactuar por 1 minuto. Posteriormente, se agregó a uno de ellos 1mL de APE 0.1% (control), a otro 1 mL del desinfectante ajustado a una concentración de 160 p.p.m. y a la tercer muestra de carne con 1mL del desinfectante a una concentración de 220 p.p.m. y se dejó actuar por 1 minuto. Una vez hecho esto, se agregaron 225mL de APE 0.1% y se homogenizó en Stomacher® (dilución 10^{-1}). Se sembraron dichas diluciones según el método de esparcimiento en agar (Vanderzant y Splittstoesser, 1995) en AMC, ABP y OPSP (al que se le agregó sobrecapa) y se incubaron según procedimiento del apartado anterior.

Se repitieron dichas pruebas con el mismo esquema básico, pero utilizando tiempos de contacto con el desinfectante de 5, 10 y 20 minutos para cada uno de los tríos faltantes de muestras. Se realizaron diluciones e inoculación de medios de cultivos siguiendo procedimientos y criterios del apartado anterior.

En la determinación de las colonias a considerar en cada medio de cultivo se emplearon los criterios descritos anteriormente.

Se calcularon los recuentos bacterianos en cada medio de cultivo para cada tiempo de exposición al desinfectante.

RESULTADOS

Se probó la efectividad de un desinfectante para carnes a base de ácido peracético determinando su capacidad bactericida mediante la aplicación de este sobre trozos de carne comercial de consumo previamente tratada con un *pool* bacteriano preparado con tres microorganismos asociados fuertemente a enfermedades de origen alimentario por consumo de carnes. Dichos trozos de carne tratados con la mezcla de bacterias y el desinfectante en estudio, eran luego procesados para obtener los recuentos bacterianos de cada una de las bacterias inoculadas en el *pool*. A su vez, se procesaban de manera similar, y para cada muestra de carne en la que se probó el desinfectante, sendos trozos de carne a los que se les inoculó el *pool* pero no el desinfectante. Se determinaron de igual forma los recuentos para las muestras en las que no se aplicó el desinfectante. El resultado de los recuentos de dichas pruebas se muestra en el cuadro I.

Cuadro I. Recuentos coloniales de tres indicadores microbiológicos con y sin aplicación de un agente desinfectante a base de ácido peracético para quince muestras.

Muestra	Sin aplicación del desinfectante			Con aplicación del desinfectante		
	AMC ¹ (UFC/g)	ABP ² (UFC/g)	OPSP ³ (UFC/g)	AMC ¹ (UFC/g)	ABP ² (UFC/g)	OPSP ³ (UFC/g)
1	1.3*10 ⁷ (Est)	6.7*10 ⁶	2.3*10 ⁸	1.0*10 ⁶	3.8*10 ⁶	3.0*10 ⁶
2	4.1*10 ⁶	1.8*10 ⁷	1.6*10 ⁷	1.9*10 ⁶	1.1*10 ⁷	2.8*10 ⁷
3	3.2*10 ⁶	7.0*10 ⁶	1.7*10 ⁵ (Est)	2.6*10 ⁶	5.0*10 ⁶	1.6*10 ⁵ (Est)
4	5.8*10 ⁶	1.3*10 ⁷	2.2*10 ⁵	4.2*10 ⁶	6.7*10 ⁶	1.3*10 ⁵
5	9.7*10 ⁶	1.4*10 ⁷	1.2*10 ⁵	9.7*10 ⁶	1.2*10 ⁷	3.0*10 ⁴
6	7.4*10 ⁶	2.1*10 ⁷	1.2*10 ⁵	5.4*10 ⁶	1.9*10 ⁷	2.1*10 ⁵
7	5.6*10 ⁶	2.3*10 ⁷	2.4*10 ⁵ (Est)	3.8*10 ⁶	1.8*10 ⁷	1.8*10 ⁵ (Est)
8	3.3*10 ⁷	2.1*10 ⁷	4.1*10 ⁵	1.1*10 ⁷	2.0*10 ⁷	4.2*10 ⁵
9	1.4*10 ⁷	1.4*10 ⁸	2.6*10 ⁵	1.3*10 ⁷	1.4*10 ⁸	3.1*10 ⁵
10	9.0*10 ⁶	2.0*10 ⁷	2.1*10 ⁵ (Est)	8.8*10 ⁶	1.9*10 ⁷	2.0*10 ⁵ (Est)
11	1.2*10 ⁶	2.0*10 ⁶	8.4*10 ⁶	9.5*10 ⁵	2.5*10 ⁵	1.4*10 ⁶
12	2.5*10 ⁶	1.8*10 ⁶	6.5*10 ⁶	7.8*10 ⁵	1.3*10 ⁶	3.9*10 ⁶
13	1.2*10 ⁶	1.7*10 ⁶	3.8*10 ⁶	4.2*10 ⁵	6.5*10 ⁵	2.3*10 ⁶
14	1.4*10 ⁶	6.7*10 ⁶	6.9*10 ⁶	1.3*10 ⁶	1.8*10 ⁶	1.6*10 ⁶
15	8.7*10 ⁵	6.2*10 ⁵	6.3*10 ⁶	5.8*10 ⁵	5.9*10 ⁵	1.5*10 ⁶

¹ Recuento de *E. coli*.

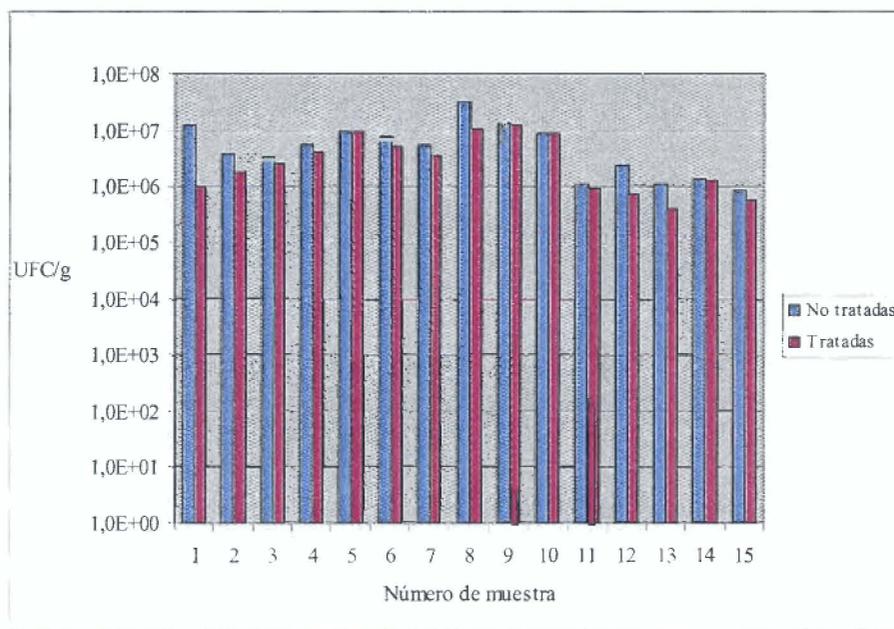
² Recuento de *S. aureus*.

³ Recuento de *C. perfringens*.

"Est": placas en las que el número de UFC se encontraba por fuera del rango contable (25-250UFC), por lo que el recuento es un estimado.

De los datos contenidos en el cuadro I se puede extraer información importante sobre la capacidad desinfectante del ácido peracético. Es posible determinar que la magnitud de la reducción obtenida es bastante discreta. Por ejemplo, para el caso de *Escherichia coli* ATCC 25922, como se puede observar en el gráfico 1, los recuentos obtenidos luego de la aplicación del desinfectante son bastante similares a los obtenidos en las muestras que no se trataron con el bactericida:

Gráfico 1. Resultados de los recuentos bacterianos (UFC/g) obtenidos para *E. coli* ATCC 25922, en quince muestras tratadas y quince muestras no tratadas con ácido peracético.



Como se ve en el gráfico 1, la reducción de los recuentos no es muy marcada, y este fenómeno, se presenta también para el caso de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Clostridium perfringens* ATCC 13124, como es posible observarlo a su vez en los gráficos 2 y 3 respectivamente:

Gráfico 2. Resultados de los recuentos bacterianos (UFC/g) obtenidos para *S. aureus* ATCC 25923, en quince muestras tratadas y quince muestras no tratadas con ácido peracético.

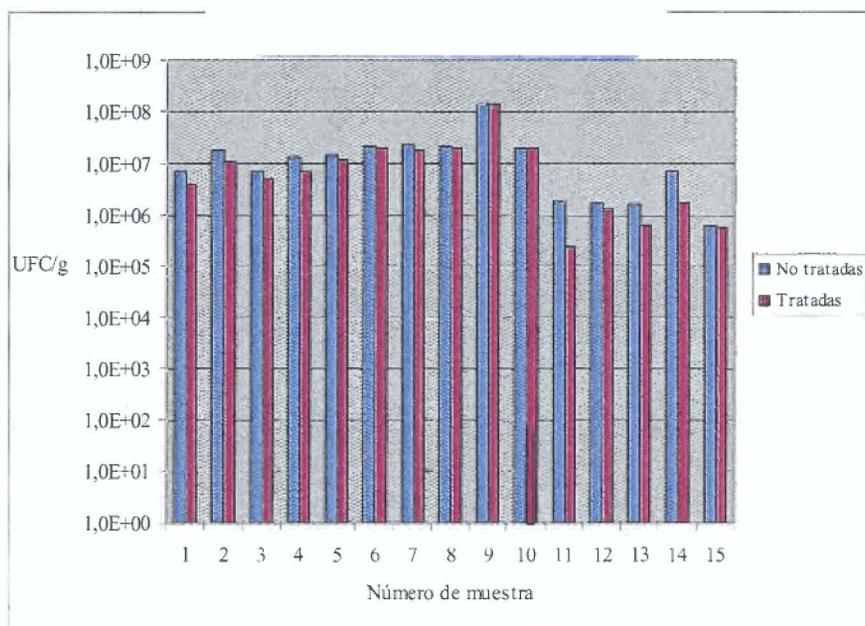
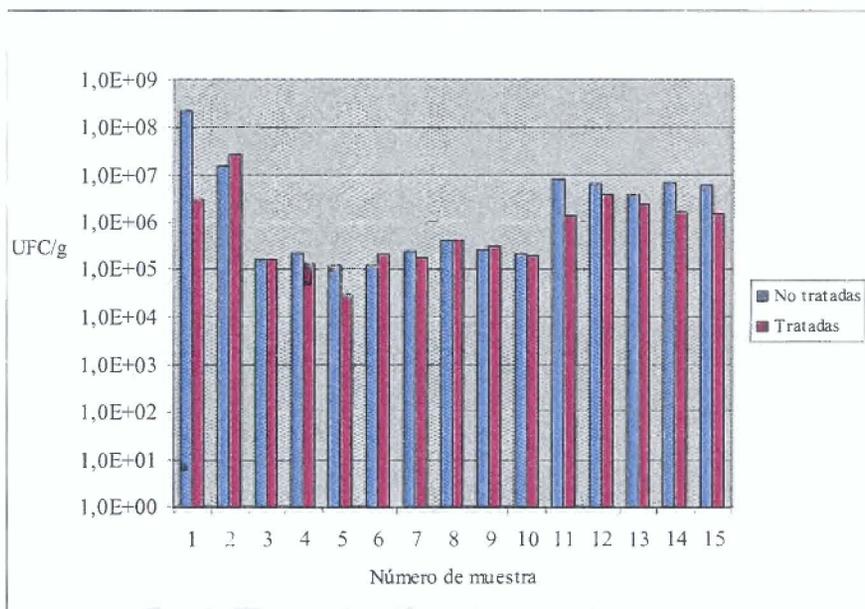


Gráfico 3. Resultados de los recuentos bacterianos (UFC/g) obtenidos para *C. perfringens* ATCC 13124, en quince muestras tratadas y quince muestras no tratadas con ácido peracético.



Como se puede observar de estos tres gráficos, se presenta una disminución en los recuentos bacterianos para cada uno de los microorganismos probados al aplicar el desinfectante sobre las muestras, sin embargo, estas disminuciones observadas no son tan importantes.

Por este motivo, se decide iniciar una nueva fase metodológica, intentando determinar si existe realmente algún grado de efectividad del agente desinfectante, probando diferentes tiempos de exposición y contacto con el mismo.

Para esto, se mantuvo el esquema de trabajo básico inicial, con la modificación de los tiempos de contacto con el desinfectante utilizados, con esto se pretende determinar si existe un tiempo adecuado de interacción microorganismos-desinfectante para lograr un proceso de sanitización idóneo y efectivo, y si existiese, determinar cuánto tiempo de exposición se requiere para lograr exitosamente este proceso reductivo de la carga microbiana presente en las carnes que se tratan.

Para esto se aplicó el desinfectante sobre las muestras y se dejó en contacto por tiempos de 5, 10 y 20 minutos, pese a que esto supera por mucho los tiempos de contacto empleados del producto a nivel industrial.

Los resultados de estas pruebas se pueden observar en el cuadro II:

Cuadro II. Influencia del aumento del tiempo de exposición al agente desinfectante a base de ácido peracético sobre el recuento de tres indicadores microbiológicos.

Tiempo de exposición (minutos)	Recuentos		
	AMC ¹ (UFC/g)	ABP ² (UFC/g)	OPSP ³ (UFC/g)
0	1,4*10 ⁶	8,2*10 ⁶	2,3*10 ⁶
5	9,8*10 ⁵	7,2*10 ⁶	2,2*10 ⁶
10	8,5*10 ⁵	6,6*10 ⁶	2,2*10 ⁶
20	5,2*10 ⁵	9,8*10 ⁵	2,0*10 ⁶

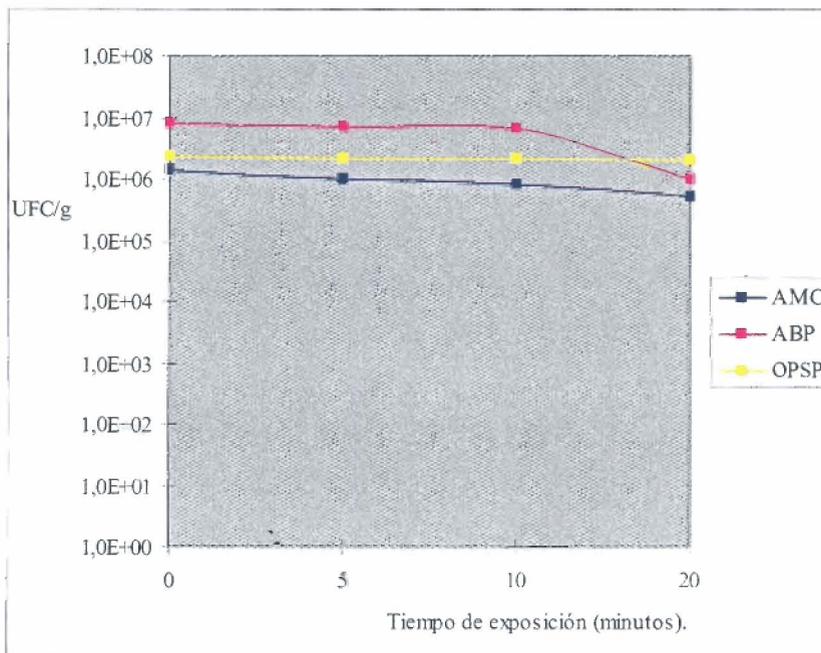
1 Recuento de *E. coli*.

2 Recuento de *S. aureus*.

3 Recuento de *C. perfringens*.

Con estos datos, se construyó una curva de aumento del tiempo de exposición al agente desinfectante, para cada bacteria probada. Como es posible extraer del gráfico 4, el agente desinfectante presenta ciertamente algún grado de efectividad reduciendo los recuentos bacterianos, la cual es mayor en un punto cercano a los 20 minutos, sin embargo, al igual que en la primera fase del trabajo, dicha efectividad es más bien bastante discreta.

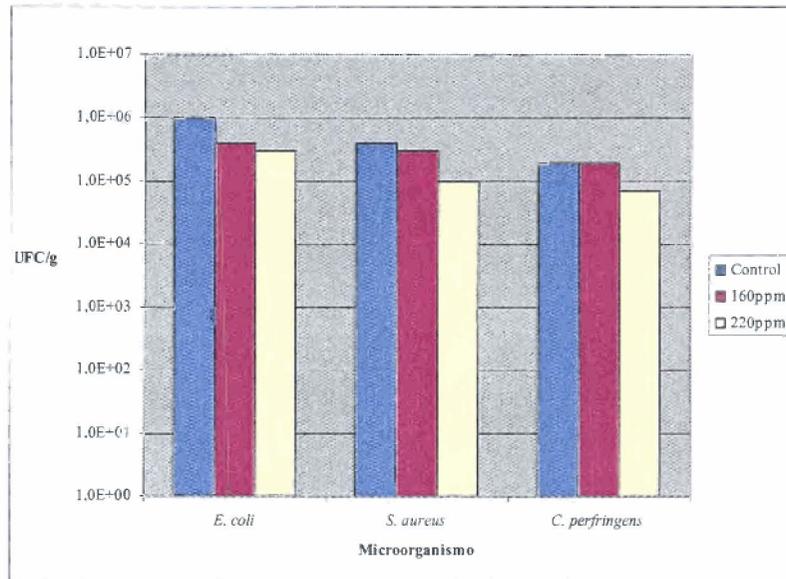
Gráfico 4. Recuentos bacterianos para *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *C. perfringens* ATCC 13124 según aumentos en los tiempos de exposición al agente desinfectante a base de ácido peracético.



AMC: Recuento de *E. coli*.
 ABP: Recuento de *S. aureus*.
 OPSP: Recuento de *C. perfringens*.

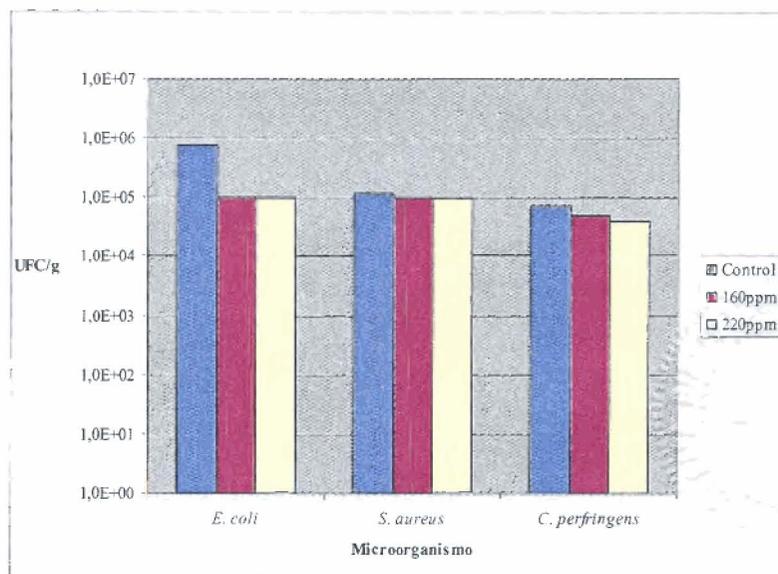
Puesto que se aceptan como seguras concentraciones mayores del ácido peracético para ser usadas sobre carnes, se decide probar la actividad de este utilizándolo a una concentración de 160 p.p.m. y de 220 p.p.m. Pese a que son concentraciones mayores a las que indica el fabricante para la preparación de la solución de trabajo del producto, la regulación estadounidense califica como segura la utilización de este tipo de productos hasta una composición de ácido peracético de 220 p.p.m., por lo que se ajustan las soluciones de trabajo a 160 p.p.m. y 220 p.p.m. y se prueba la capacidad de las mismas para reducir los recuentos bacterianos presentes en las muestras de carne inoculadas con el *pool* bacteriano. Los resultados se pueden observar para cada bacteria y tiempo de exposición en los gráficos 5 a 8.

Gráfico 5. Recuentos bacterianos para *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *C. perfringens* ATCC 13124 al ser expuestos a una dilución de ácido peracético de 160 p.p.m. y 220 p.p.m durante 1 minuto.



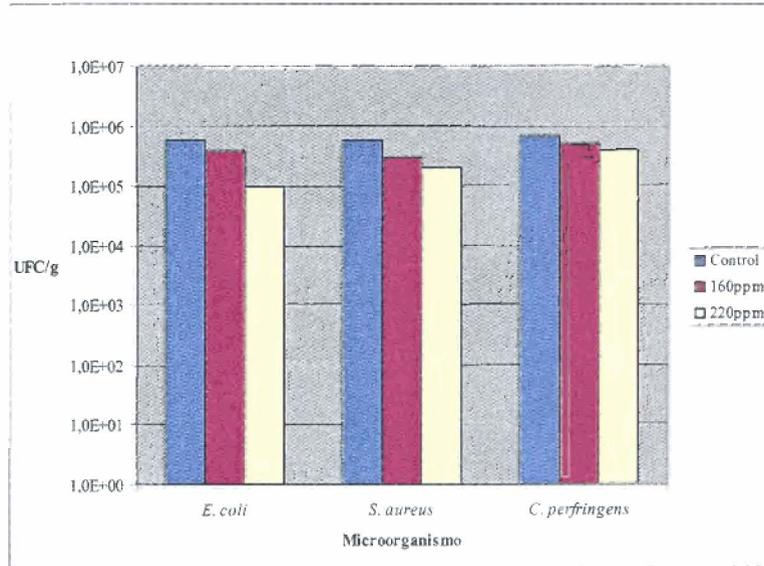
Control: muestra a la que no se le añadió agente desinfectante.

Gráfico 6. Recuentos bacterianos para *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *C. perfringens* ATCC 13124 al ser expuestos a una dilución de ácido peracético de 160 p.p.m. y 220 p.p.m durante 5 minutos.



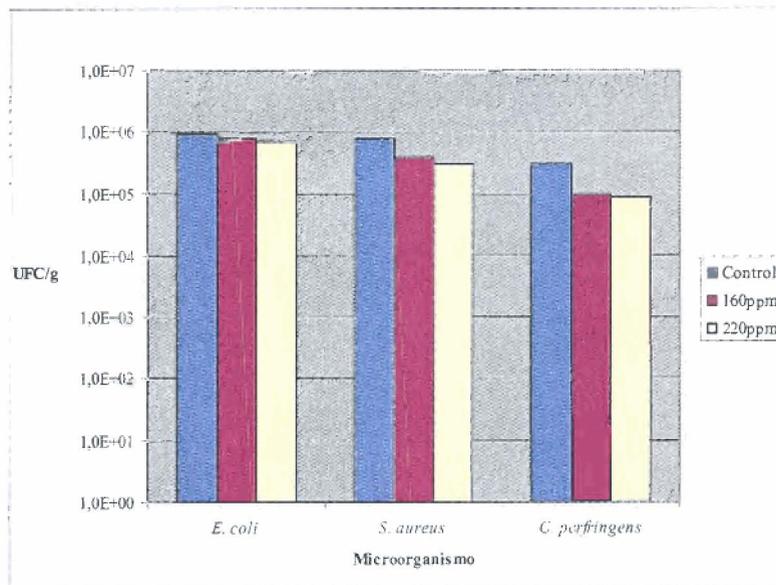
Control: muestra a la que no se le añadió agente desinfectante.

Gráfico 7. Recuentos bacterianos para *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *C. perfringens* ATCC 13124 al ser expuestos a una dilución de ácido peracético de 160 p.p.m. y 220 p.p.m durante 10 minutos.



Control: muestra a la que no se le añadió agente desinfectante.

Gráfico 8. Recuentos bacterianos para *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *C. perfringens* ATCC 13124 al ser expuestos a una dilución de ácido peracético de 160 p.p.m. y 220 p.p.m durante 20 minutos.



Control: muestra a la que no se le añadió agente desinfectante.

DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se pretendió determinar la efectividad del ácido peracético como agente desinfectante, probando su acción directamente sobre trozos de carne de consumo.

Previamente, con el fin de determinar la efectividad de este desinfectante, se desarrollaron diferentes metodologías. Por ejemplo la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC), presentó un método para este tipo de investigación, pero la metodología se basa en la interacción de bacterias en suspensión con una dilución del desinfectante (Williams, 1984), técnica que no reproduce en gran medida las condiciones reales en las que se este se utilizaría en la industria, para este caso específico, la industria cárnica.

Aunque este tipo de técnicas tienen gran aceptación, los desinfectantes pueden también ser probados bajo condiciones diseñadas para simular las situaciones de uso normal. Este tipo de técnicas permiten una determinación mucho más precisa de la concentración apropiada de un desinfectante dado bajo condiciones particulares de uso (Prescott *et al.*, 1999)

Por este motivo, se diseña un plan metodológico novedoso que pretende lograr un acercamiento del trabajo *in vitro* al trabajo y aplicación real del producto desinfectante, procurando reproducir en la medida de lo posible las condiciones de utilización del producto en la práctica. Así, se prueba el desinfectante sobre trozos de carne, los cuales son finalmente la materia sobre la cual se utilizará a nivel industrial.

Para esto se utilizaron trozos de carne pesados y almacenados de manera adecuada a los cuales se les inoculó un *pool* de bacterias indicadoras de gran importancia en el ámbito de la salud pública relacionadas con la aparición de

enfermedades gastrointestinales asociadas con el consumo de carnes (Vanderzant y Splittstoesser, 1995).

Como indicadores se utilizaron cepas tipo de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* las cuales, luego de ser inoculadas sobre los trozos de carne, fueron tratadas con la dilución de trabajo del desinfectante a base de ácido peracético, preparado según las instrucciones del fabricante ajustándolo a una concentración de 0.05% del reactivo comercial, que correspondería a una composición aproximada de 80 p.p.m. de ácido peracético, y comparando los resultados de los recuentos de estos trozos de carne con los recuentos de trozos de carne de igual peso, asimismo inoculados con el *pool* bacteriano pero a los que no se les aplicó el desinfectante.

Los resultados obtenidos de los recuentos bacterianos para cada microorganismo en específico, al aplicar el desinfectante sobre trozos de carne, se pueden observar en el cuadro I. Aquí, se puede observar que el agente desinfectante no parece producir reducciones importantes en los recuentos bacterianos. Se refiere en algunas técnicas que un desinfectante debe lograr una reducción de al menos 5 logaritmos (Prescott *et al.*, 1999) en los recuentos bacterianos de las superficies a las que se aplica, y como se ve claramente de los gráficos 1, 2 y 3, en ninguno de los casos y para ninguna de las bacterias probadas las reducciones observadas se acercan por mucho a esas cifras.

Con los datos obtenidos, se podría afirmar que la actividad bactericida del producto probado es prácticamente nula. Sin embargo, esta observación contradice el hecho de que la FDA haya aprobado ya el producto para su uso como sanitizante de uso en industrias de alimentos, como consta en el Código de Regulaciones Federales, título 21, partes 173.1010, 173.315 y 173.370 (FDA, 1998).

Por este motivo, y con el fin de determinar si existe realmente una efectividad del producto, se decide reestructurar la metodología aumentando los tiempos de

exposición al ácido peracético, con el fin de determinar si de esta forma se lograría una actividad bactericida importante. Así, se mantiene el esquema básico de trabajo alterando únicamente el tiempo de contacto con el agente desinfectante.

Para esto se utilizaron muestras de carne en pares para cada tiempo de exposición al agente desinfectante, siendo estos tiempos 0, 5, 10 y 20 minutos. Los resultados obtenidos de los recuentos bacterianos se calcularon como promedios para cada par de muestras y se pueden ver en el cuadro II. De los datos presentes en este cuadro, se puede obtener una gráfica que describe claramente el comportamiento de los recuentos bacterianos a través de todo el intervalo de tiempos de exposición al desinfectante probados.

Como se puede observar en el gráfico 4, se ~~obtiene~~ un porcentaje relativamente marcado de eliminación bacteriana en un punto cercano a los 20 minutos, fenómeno que es mucho más acentuado para el caso de *S. aureus* que para las otras dos bacterias utilizadas en el experimento; no obstante, dicha reducción no es significativa ya que ni siquiera llega a ser un logaritmo de reducción, por tanto el efecto bactericida no es del nivel esperado para que un desinfectante sea considerado como efectivo. Al contrastar los resultados obtenidos con los descritos por Kunigk y Almeida (2001), se observa una discrepancia importante. Este equipo de investigadores probó el ácido peracético como agente desinfectante contra *E. coli* y *S. aureus*, demostrando grandes proporciones de eliminación bacteriana, contrario a lo observado durante la realización de este trabajo. No obstante, las pruebas realizadas por dichos investigadores fueron hechas sobre superficies no orgánicas y libres de proteínas y otras moléculas orgánicas que puedan interferir con la acción del agente desinfectante en cuestión.

Del análisis del gráfico 1 se determina fácilmente que las reducciones obtenidas, aún para el caso de *S. aureus*, no se acercan por mucho a una reducción verdaderamente importante, por lo que nuevamente los datos indican una falta de actividad bactericida del producto utilizado.

Pese a esto, otros estudios previos, aunque basados en metodologías diferentes y utilizando concentraciones mucho más altas del desinfectante, demuestran una eficacia importante del ácido peracético como agente bactericida y hasta esporicida. Por ejemplo, Kunigk y Almeida (2001) demostraron reducciones importantes de los recuentos de *E. coli* y *S. aureus* probando el ácido peracético según la metodología de la AOAC antes mencionada y con un método diseñado por uno de los autores utilizando placas de acero inoxidable; a su vez, Baldry (1983) no solo demostró reducciones de los recuentos bacterianos de hasta 6 logaritmos sino también la actividad contra esporas de hongos, levaduras y esporas bacterianas de este agente utilizando concentraciones relativamente altas del mismo. Sin embargo, es importante que las metodologías empleadas en estos estudios se basan en condiciones de prueba bastante artificiales, ya que se utilizan suspensiones bacterianas en solución salina u otras sustancias; o películas bacterianas establecidas en láminas de acero inoxidable, lo cual tiene grandes implicaciones en lo que a efectividad se refiere, ya que al realizar las pruebas sobre la una matriz orgánica como la carne, se puede presentar un efecto protector de esta sobre las bacterias inoculadas ya que de alguna forma puede prevenir el contacto directo entre los microorganismos y el agente; y adicionalmente dicha matriz orgánica puede consumir o inactivar las sustancias aplicadas disminuyendo su efectividad (Mahon y Manuselis, 2000).

En vista de lo expuesto hasta este punto, no se puede demostrar la eficacia del producto, puesto que, los resultados obtenidos en las pruebas indican que las reducciones en las poblaciones bacterianas no son lo suficientemente altos como para considerarlos eficaces.

En una extensa revisión de la regulación estadounidense para la utilización de este tipo de productos, se determinó que la FDA, en el Código de Regulaciones Federales, título 21, sección 173.370, fija los niveles de concentración apropiados para la utilización de este producto sobre carnes rojas crudas como seguros si estos se encuentran por debajo de 220 p.p.m. (FDA, 1998).

En vista de estos datos, es posible que en las primeras secciones del presente trabajo no se obtuvieran resultados satisfactorios debido a que se estaba utilizando una concentración muy por debajo de este límite superior (80 p.p.m. con respecto a 220 p.p.m.). De hecho, una concentración de 80 p.p.m. es útil para el trabajo con frutas y vegetales crudos en procesos de limpieza durante fases como el pelado, el empaque y otros según lo estipula la FDA en el Código de Regulaciones Federales, título 21, sección 173.315 (FDA, 1998).

Por tanto, y en vista de lo estipulado por la FDA como seguro, se inicia una prueba de la capacidad de reducción de los recuentos bacterianos de diluciones del ácido peracético comercial en concentraciones que están por encima de lo indicado por la casa comercial del producto, pero que se encuentran dentro de las concentraciones consideradas como seguras por la agencia estadounidense.

Se utilizaron concentraciones del ácido de 160 p.p.m. y 220 p.p.m., a la vez que se probaron diferentes tiempos de exposición al agente con el fin de comparar con recuentos basales de las poblaciones bacterianas presentes.

Claramente se observa en los gráficos 5 a 8, que pese a que sí es posible observar reducciones en los recuentos, y pese a que se empleó una concentración del desinfectante en el tope de lo considerado como seguro por la FDA (220 p.p.m.), las reducciones obtenidas son, para el caso de las tres bacterias probadas, para cada concentración utilizada y para cada tiempo de exposición, bastante discretas.

Por tanto y en vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, es imposible afirmar una efectividad significativa del producto probado como agente bactericida, no solamente a las concentraciones indicadas por la casa fabricante, sino también a concentraciones mayores a esta y según lo estipula la FDA. Por tanto, deberían realizarse estudios que determinen la razón del fallo de este agente desinfectante, con el fin de obtener un arma adecuada en la lucha contra los

microorganismos asociados a los alimentos cárnicos, que a la larga llevarán a la obtención de productos más seguros y de mejor calidad para el consumo nacional y la exportación a otros mercados más amplios y exigentes.

CONCLUSIONES

La aplicación del desinfectante comercial a base de ácido peracético utilizado en las presentes pruebas, ajustándolo a una concentración de 80 p.p.m., 160 p.p.m. y 220 p.p.m., y permitiendo un tiempo de contacto de hasta 20 minutos, no representa un método satisfactorio de reducción de las poblaciones bacterianas al ser aplicado sobre cultivos de cepas tipo de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* inoculadas sobre muestras de carne de consumo

BIBLIOGRAFÍA.

- Aguilar, F. (1993). El consumo de productos cárnicos en Costa Rica. San José. Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos. Editorial Universidad de Costa Rica.
- Arias, M.; Antillón, F.; Chaves, C. y Villalobos, L. (2006). Microbiología de aguas y alimentos: Principios y prácticas de laboratorio. (1ª Edición). Costa Rica, Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Badui, S. (1999). Química de los Alimentos (4ª Edición). México: Editorial Pearson Educación.
- Baldry MG. (1983). The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Journal of Applied Bacteriology*. 54(3):417-23
- Boyd, M.; Logan, M. y Tytell, A. (1948). The growth requirements of *Clostridium perfringens* BPK6K. *Journal of Biological Chemistry*. 174: 1013-1025.
- Bundgaard-Nielsen, K. y Nielsen, P. (1995). Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. *Journal of Food Protection*. 59: 268-275.
- Coretti, K. (1971) Embutidos: elaboración y defectos. España: Editorial Acribia.

- Davidson, P. y Harrison, M. (2002). Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology*. 56(11): 69-78.

- Flemming H. (1984) Revisión: El ácido peracético como desinfectante. Oficina Central para la Bacteriología, Microbiología e Higiene. (B) 179 (2): 97-111.

- Food and Drug Administration. (1998). Substances utilized to control growth of microorganisms. Sanitizing solutions. Washington, D.C. Code of Federal Regulations, título 21.

- Fox, B. y Cameron, A. (2004) Ciencia de los alimentos, Nutrición y Salud. México: Limusa Noriega Editores.

- Freitas-Leitão, M. (1978). Microorganismos patogénicos en la carne y sus derivados. *Boletín del Instituto de Tecnología de Alimentos*. 59: 15-48.

- Gutiérrez, A.; Gamboa, M.; Rodríguez, E. y Arias, M. (1999) Presencia de *Clostridium perfringens* en preparaciones a base de carne en servicios de alimentación pública del Cantón Central de San José, Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 49(3): 275-278.

- Hauschild A.H. y Hilsheimer R. Enumeration of food-borne *Clostridium perfringens* in egg yolk-free tryptose-sulfite-cycloserine agar. *Applied Microbiology*. 1974; 27(3):521-6

- Jay, J. (1992). Modern Food Microbiology (4ª Edición). New York: Van Nostrand Reinhold.

- Kunigk, L. y Almeida, M.C.B. (2001) Action of peracetic acid en *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32: 38-41.

- Labbé, R. (1991). Symposium on microbiology update: old friends and new enemies. *Clostridium perfringens*. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 74(4):711-714.

- Mahan, K. y Escott-Stump, S. (2001). Nutrición y Dietoterapia de Krause (10ª Edición). México: Editorial McGraw-Hill Interamericana.

- Mahon, C. y Manuselis, G. (2000). Textbook of Diagnostic Microbiology. (2ª Edición). USA: Editorial W.B. Saunders Company.

- Montoya, M. (1995). “Estudio de la calidad microbiológica de la carne molida de res que se expende en el distrito primero de la provincia de Alajuela.” Tesis para optar por el grado de licenciatura en Tecnología de Alimentos. San José. Universidad de Costa Rica.

- Morera, J.; Rodríguez, E. y Gamboa, M. (1999). Determinación de *Clostridium perfringens* en embutidos de carne de cerdo del Área Metropolitana de Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 49(3): 279-282.

- Organic Materials Review Institute (OMRI). Nacional Organic Standard Board, Technical Advisory Panel. Materials Database Compiled by OMRI [en línea]. [USA]: Actualizado al 06.11.2000. [Consulta: 13.06.2007]. <http://www.omri.org/peracetic_acid.pdf>

- Prescott, LM.; Harley, JP. Y Klein, DA. Microbiology. (4ª Edición). Madrid: Editorial McGraw-Hill.

- Parmeggiani L. (1983). Enciclopedia de Salud y Seguridad Ocupacional (3ª Edición). Suiza: Oficina Internacional del Trabajo.
- Reyes, L.; Chinchilla, M.; Guerrero, O.; Arias, M. y Castro, A. (2001). Transmisión de *Toxoplasma gondii* en Costa Rica: un concepto actualizado. Acta Médica Costarricense. 43(1): 22-26.
- Sáenz M. (2001) Diagnóstico General sobre la Situación de Inocuidad de Alimentos en Costa Rica. Editores: Sandra Murillo Fernando Rocabado, Consultores de OPS/INCAP, San José, Costa Rica.
- Tamiguchi, M., Tanka, M., Matsuno, R., y Kamikubo, T. 1982. Evaluation of chemical pre-treatment for enzymatic solubilization of rice straw. Journal of Applied Microbiological Biotechnology. 14(1): 35-39.
- Tompkin, R. (1983). Indicator microorganisms in meat and poultry products. Food technology. 37: 107-116.
- Vanderzant y Splittstoesser. (1995). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA. Washington D.C.
- Welch, W. y Nuttal, G. (1882). A gas producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus* nov. spec.) capable of rapid development in the food vessels after death. Bulletins of the Johns Hopkins Hospital. 3: 81-91.
- Williams, S. (1984). Association of Official Analytical Chemists. Oficial Methods of Analysis. AOAC, Arlington.