

1. DATOS GENERALES DEL PROYECTO

Código:	CILEC-020213
Centro de Investigación:	Centro de Investigación de la Leche
Programa:	Inocuidad alimentaria
Título del Proyecto:	Calidad microbiológica en quesos frescos artesanales del Cantón Cayambe
Grupo de Investigación:	Sistemas de gestión de la calidad e inocuidad alimentaria en leche y
Area de Conocimiento:	Ciencias de la Vida
Línea de Investigación:	Sistemas de gestión de la calidad e inocuidad
Tipo de Investigación:	Aplicada
Campo :	Tecnologías
Investigador Principal :	ROCIO ELIZABETH CONTERO CALLAY
Proyectos Vinculados :	CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN LECHERA DE ECUADOR, 2012. Buenas prácticas de Ordeño y la Calidad higiénica de la Leche en el
Duración del Proyecto :	12 Meses
Localización del Proyecto :	Provincia: Pichincha- Cantón Cayambe
Fecha de ingreso :	29/09/2013 11:16

2. ANTECEDENTES

El Cantón Cayambe centra su economía en actividades agrícolas y pecuarias. La producción de lácteos tiene un volumen 43.000 litros leche/día (Contero, 2011), que se procesan como leche fluida y otros derivados lácteos valorados por sus características nutricionales y sensoriales. Actualmente existen 65 empresas lácteas registradas y muchas clandestinas, que procesan promedio 600-1200 litros/día. El queso fresco es el producto de mayor venta y aceptación, seguido del yogurt, manjar de leche y otros derivados lácteos.

Muchos de los productos de procesadoras artesanales no registradas son vendidos en ferias populares. En ellas no se exigen registros sanitarios, cadena de frío, marcas, ni detalles del producto, haciendo que los quesos sean libremente comercializados y adquiridos a un precio económico. Sus productores mayoritariamente disponen de poca leche y elaboran quesos por tradición familiar, que representa su fuente de ingresos.

Los riesgos de inocuidad de los quesos artesanales, pueden ser mayores debido a que algunos productores, no pasterizan adecuadamente y eventualmente utilizan leche excedente proveniente de otros productores, con bajos estándares de acidez o peso.

El presente proyecto pretende establecer un diagnóstico de la calidad microbiológica de los quesos frescos expendidos en ferias populares, determinando la presencia de Enterobacterias, Samonella y Listeria monocytogenes requisitos incluidos en la revisión de norma NTE INEN 1528:2012 de quesos frescos, a vistas de salvaguardar la competitividad del producto, la salud de los consumidores y verificar el cumplimiento de normas.

3. JUSTIFICACIÓN

En el contexto nacional, la producción de leche en Ecuador es de 5,200.000 litros de leche/día, es una actividad de mucha importancia para la economía de los ecuatorianos. El 22% de las UPAs que se dedican a producción son unidades de menos de 5 hectáreas (SICA, 2001) y corresponden a los sectores más vulnerables del país.

A pesar que la leche es considerada un alimento primario especialmente para infantes, el consumo de productos lácteos en el Ecuador no llega a 85 kg/año/persona. Se asume que la calidad de la leche y sus derivados, es un determinante en la confianza del comprador, pero el consumidor ecuatoriano se guía fundamentalmente por el precio.

La leche fluida disponible se destina el 25% para la elaboración industrial y 75% para consumo y utilización de leche cruda. El mercado más dinámico en el Ecuador es el queso fresco, con el 92,8% (Hoy, 2005).

Los quesos frescos artesanales son fabricados a pequeña escala, con un volumen limitado de producción. Su fabricación con técnicas empíricas, generalmente se realiza sin una adecuada pasterización, ni la observación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) constituyendo un producto de "riesgo", desde la seguridad alimentaria. La contaminación microbiana por este tipo de quesos, ha involucrado brotes de enfermedades con patógenos como Enterobacterias, Salmonella, Listeria monocytogenes entre otros (Benadette y Landgraf 2003; Santana et al. 2008; Giammanco et al. 2011; Gardênia, y Vantti 2012).

La presencia de Enterobacterias y Samonellas son indicativos de la falta de higiene durante la colecta de la leche, transporte y conservación (Giammanco et al. 2011). Alrededor del mundo cientos de brotes alimenticios "outbreaks" se han presentado en países en desarrollo y desarrollados (Benadette y Landgraf 2003; Jay, 2005). La Listeria monocytogenes es un microorganismo incluido recientemente en la normativa ecuatoriana para quesos frescos (INEN, 2012), que puede ser aislado de diferentes tipos de alimentos, provoca fuertes infecciones con resultados letales, especialmente en niños, mujeres gestantes, inmunosuprimidos y ancianos. (Benadette y Landgraf 2003; Jay, 2005). La Universidad Politécnica Salesiana, dentro de su línea de investigación de Gestión de Calidad e Inocuidad de leche y derivados, trabaja con queserías artesanales, monitoreando la calidad de la materia prima, estableciendo procesos de asistencia - capacitación y, ejecutando proyectos de investigación que fortalezcan la calidad de los productos.

El Plan Nacional de Desarrollo del Ecuador ha establecido políticas que enmarcan una visión del sector agropecuario solidario, productivo y competitivo, apoyando las actividades que permitan el acceso seguro y permanente de alimentos sanos y nutritivos preferentemente producidos a nivel local [¿], garantizando la seguridad y soberanía alimentaria (SENPLADES, 2009).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la calidad microbiológica de quesos frescos artesanales del Cantón Cayambe, mediante análisis microbiológicos como indicadores de inocuidad alimentaria.

4.2 Objetivos Específicos

- 1 Determinar la calidad microbiológica de quesos frescos artesanales del Cantón Cayambe, mediante análisis microbiológicos como indicadores de inocuidad alimentaria
- 2 Analizar la presencia de Enterobacterias, Salmonella y Listeria monocytogenes y en quesos frescos expendidos en ferias populares del Cantón Cayambe, mediante análisis microbiológicos.
- 3 Difundir la información a la comunidad científica, productores, consumidores, entidades públicas, privadas y comunitarias a través de eventos académicos y artículos científicos

5. ESTADO DEL ARTE

A nivel mundial la fabricación de derivados lácteos producidos localmente y a pequeña escala industrial, se presentan. Comúnmente la leche cruda para la elaboración de quesos, raramente provienen de sistemas de producción controlados, medios de colecta apropiados y transporte refrigerados. Factores que pueden incrementar el riesgo de contaminación de la leche por bacterias patógenas (Kongo, et. al. 2008; Santana et al. 2008; Rosengren 2010; Schmitt y Cereser, 2011).

De acuerdo con la literatura la calidad de la materia prima, es decisiva en las características sensoriales y la vida útil del producto final, así como la higiene durante la fabricación, envasado y manipulación. La determinación de números de viables de enterobacterias en muestras de quesos, en pequeñas cantidades son comunes (Kongo et al., 2008), pero números altos, son indicativos de malas prácticas de higiene pecuaria y condiciones de conservación los pobres (Tornadijo et al. 2001, Lafarge et al 2004).

Los procesos de pasteurización debidamente controlados, permitirían la eliminación de bacterias presentes en la leche cruda. (Benadette y Landgraf, 2003; Jay, 2005). A pesar que, a nivel mundial las legislaciones para alimentos recomiendan la utilización de leche pasteurizada para la elaboración de quesos, cientos de litros /día son subpasteurizados o termizados, entre 57-68 °C por 15 -20 segundos en diferentes países. En Italia las regulaciones para este tipo de quesos exigen al menos 60 días de almacenamiento (Giammanco et. al. 2011).

Los quesos blandos son un sustrato apropiado para la multiplicación severa de bacterias debido a la humedad, alto pH y bajas concentraciones de NaCl. Muchos estudios reportan outbreaks causados por derivados lácteos, señalando al queso fresco como vehículo potencial de patógenos alimentarios, como Salmonella spp. Listeria monocytogenes y Staphylococcus aureus (Benadette y Landgraf, 2003; Jay, 2005; Lund y O'Briend, 2011; Gardêia, 2012).

Si bien las dosis de infección para Enterobacterias y Salmonella son muy altas en un rango de 10⁶ a 10⁸ UFC/ml, sus efectos en personas vulnerables pueden ser letales (Jay, 2005). La listeriosis, actualmente está calificada como una enfermedad emergente. En países desarrollados como Estados Unidos y Reino Unido, entre el 15-20% de la población entre 60 a 65 años, tiene mayor susceptibilidad a enfermedades transmitidas por alimentos. Pero también otros factores además de la edad influyen, personas con diferentes enfermedades como inmunosuprimidos, receptores de trasplantes, enfermos del riñón, personas con cáncer, portadores del virus HIV, entre otros, y fundamentalmente gestantes y niños menores de 5 años (Lund y O'Briend, 2011).

Brasil el quinto mayor productor de leche a nivel mundial, destina un tercio de su producción a la fabricación artesanal de diversos quesos blandos, moviendo anualmente una importante actividad económica y social (Schmitt y Cereser, 2011). En el Ecuador el queso fresco se obtiene por coagulación de la leche con enzimas y/ o ácido cítrico. Fabricado con leche entera, tiene 80% de humedad y 45-60 % de grasa (INEN, 2012). Su producción en el país, se realiza principalmente en industrias lácteas pequeñas. Actualmente no se tiene información de su calidad microbiológica, con respecto a Enterobacterias, Salmonella y Listeria monocytogenes.

6. METODOLOGÍA

La presente investigación propone responder la siguiente hipótesis:

Hipótesis Alternativa: Los quesos frescos que se expenden en las ferias populares del Cantón Cayambe, cumplen con los límites microbiológicos exigidos en la norma NTE INEN 1528:2012.

Hipótesis Nula: Los quesos frescos que se expenden en las ferias populares del Cantón Cayambe, no cumplen con los límites microbiológicos exigidos en la norma NTE INEN 1528:2012.

O.E.1. Analizar la presencia de Listeria monocytogenes, Salmonella y Enterobacterias en quesos frescos expendidos en ferias populares del Cantón Cayambe, mediante análisis microbiológicos.

OE1.A1 Determinar los puntos de muestreo en ferias populares de las parroquias urbanas y rurales del cantón Cayambe.

Se establecerá un cronograma con los días y horarios de las ferias populares, por parroquia urbana y rural. Y un mapa de ruta para la toma de muestras.

OE1.A2. Definición de ficha de registro de información de datos a la compra del producto (condiciones de venta, manipulación, procesamiento del producto y otros).

Se establecerá una ficha para registro de información básica del producto. Con los siguientes criterios:

Manipulación de producto:

Protección en las manos al manipular los quesos
Usa mandil.

Conservación del queso

Están protegidos del sol, lluvia u otros factores ambientales.
Protegidos con embalaje plástico.
Pre- embalados.

Condiciones a la venta

Temperatura, a la compra del producto (4- 10°C)
Cuentan con registro sanitario.
Tiene una marca definida

Proceso

Volumen de litros de leche usados para hacer un queso
Realiza una pasteurización o terminación (65- 75°C)

Entorno de venta

Dispone de un espacio apropiado y limpio para la venta
Productos alrededor no alimenticios.
Animales cercanos (perros, etc.)

Con esta información se establecerán criterios y recomendaciones con respecto a los factores de higiene del producto. Adicionalmente se consultará si la persona que vende es quien fabrica el producto para tener certeza de la información.

OE1.A3 Toma de muestras de quesos frescos y análisis

En cada punto de muestreo serán adquiridos 3 quesos del mismo vendedor para homogenizar el lote. La colecta de las muestras se realizará siguiendo los procedimientos de norma para toma de muestras alimenticias, uso de materiales y fundas estériles y cadena de frío a 4 °C, hasta su análisis. Ver tabla 1.

Para los análisis microbiológicos, se utilizará los instructivos definidos para la determinación de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*, con la metodología aplicada por MiniVidas BioMérieux S.A, de inmuno análisis, sistema ELFA (Ensayo de Fluorescencia Ligado a Enzimas) validada con el método de ensayo ISO 11290-1 Anexo 1. Instructivo para la determinación microbiológica de *Salmonella*, *Listeria m*, en el laboratorio de Calidad de Leche de la UPS.

Para Enterobacterias se utilizará el sistema por conteo en placa, según método de ensayo NTE INEN 1529-13. (INEN, 1998).

Tabla. 1 Número de muestras de quesos frescos a adquirir en las parroquias urbanas y rurales del Cantón Cayambe, 2013.

Parroquias urbanas Número de muestras

1. Ayora 10
2. Cayambe 15
3. Juan Montalvo 5

Sub total muestras por parroquias urbanas 30

Parroquias rurales Número de muestras

1. Ascázubi 4
2. Cangahua 4
3. Cusubamba 4
4. Olmedo 4
5. Otón 4

Sub total muestras parroquias rurales 20

Total muestras quesos en un mes 50

Colecta será por tres meses 3

Total muestras quesos en toda la investigación 150.

OE.2. Comparar la calidad microbiológica de los quesos frescos artesanales con los límites de la norma NTE INEN 1528:2012 vigente en el Ecuador.

OE2.A1 Discusión de los resultados microbiológicos obtenidos

Se realizará la discusión de los resultados análisis microbiológicos de los quesos frescos, para *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* y Enterobacterias.

OE2.A2 Tabulación de resultados analíticos y comparación con los límites microbiológicos de la normativa vigente.

Por cada uno de los parámetros microbiológicos analizados se establecerá la comparación con los registros de norma vigentes y registrará el porcentaje de quesos que presenten desviación. Ver tabla 2.

Tabla. 2 Requisitos microbiológicos en norma NTE INEN 1528:2012, para quesos frescos

Requisito	Límite máximo nivel aceptable de calidad
Enterobacterias, UFC/g	2X10 ³
Salmonella en 25 g	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i> /25g	Ausencia

OE.3. Difundir la información a la comunidad científica, productores, consumidores, entidades públicas, privadas y comunitaria.

Los resultados intermedios y finales, serán presentados en congresos o seminarios nacionales y/o internacionales. Y la investigación será publicada en revistas indexadas para su difusión a la comunidad en general. En la difusión los resultados se mantendrán la reserva de las marcas, nombres de personas, empresas o asociaciones. La investigación tendrá un carácter académico y no de demanda.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Benadette, D.G y Landgraf, M. 2003. Microbiología dos Alimentos. Atheneu.
- Contero, R. 2011. Con acento grupal. Revista Infortambo Andina Internacional 38: 12-15.
- Gardênia, M., & Vanetti, M. C. 2012. Comparison of convetional and Rapid methods for Samonella detection in artisanal Minas Cheese. Journal of Food Research (1) 3:178-183.
- Giammanco, G., Arcangelo, P., Aleo, A., D'Agostino, V., Milone, S., & Caterina, M. 2011. Microbiological quality of Pecorino Siciliano "primosale" cheese on retail sale in the street markets of Palemo, Italy. New microbiological 34: 179-185.
- Hoy. 10 de Noviembre de 2005. El queso un manjar, milenario. Recuperado el 12 de Mayo de 2013, de www.hoy.com.ec: <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/el-queso-un-manjar-milenario-218324.html>.
- INEN 2012. Norma General para quesos frescos no madurados. Requisitos. NTE INEN 1528:2012. Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- INEN 1998. Control microbiológico de los alimentos. Enterobacteiaceae. Recuento en placa por siembra en profundidad. NTE INEN 1529-13:98. Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- Jay, M.J. 2005. Microbiología de alimentos. Artmed.
- Kongo J.M., Gomes A.P., Malcata F.X., 2008. Monitoring and identification of bacteria associated with safety concerns in the manufacture of Sao Jorge, a Portuguese traditional cheese from raw cow's milk. Journal Food Protection. 71 (5): 986-992.
- Lund B.M., y O'Brien S. 2011. The occurrence and Prevention of Foodborne disease in vulnerable people. Foodborne Pathogens and Disease 8 (9): 961-973.
- Rosengren, A., Fabricius, A., Guss, B., Sylvén, S., & Lindqvist, R. 2010. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm dairies. Internationa Journal of Food Microbiology 144: 263-269.
- Santana, R. F., Santos, D. M., Martinez, A. C., & Lima, A. S. 2008. Qualidade microbiologica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. Archivo Brasileño de Medicina Veterinaria Zootecnia (60) 6: 1517-1522.
- Schmitt, C. I., & Cereser, N. D. (2011). Qualidade Microbiologica do Queijo colonial produzido na regio de Ijuí e Cruz Alta -RS. XVI Seminario Interinstitucional de Ensino Pesquisa e Extensao. Rio Grande do Sul: Universidade de Cruz Alta.
- SENPLADES. 2009. Plan Nacional para el Buen Vivir 2009-2013. Recuperado el 12 de Mayo de 2013, de www.senplades.gob.ec: plan@senplades.gob.ec
- SICA. 2001. Recuperado el 12 de Mayo de 2013, de Análisis e Interpretación del III Censo Agropecuario: www.agroecuador.com/HTML/Censo/Censo.htm
- Tornadijo M.E., Garcia M.C., Fresno J.M., Carballo J. 2001. Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simòn cheese. Food Microbiology, 18 (5): 499-509.

8. RESULTADOS ESPERADOS

Se generará una propuesta tesis de pregrado con las carreras que tiene la Universidad Politécnica Salesiana y/o universidades afines, para la validación del método de Listeria monocytogenes.

Publicación en revistas y/o congresos internacionales de papers con las primeras evaluaciones realizadas en el proyecto, en la Universidad de Universidade de São Paulo y/o revistas Brasileñas vinculadas u otras internacionales indexadas.

Artículo científico escrito y publicado en revista indexada de la Universidad Salesiana y /o en Revistas Brasileñas y internacionales indexadas.

9. TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA Y/O SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN

La Universidad Politécnica Salesiana cuenta con diferentes medios de comunicación como la revista indexada La Granja, donde se publicarán los resultados finales de la investigación, además de la participación en foros de Calidad de leche y otros.

A nivel de pregrado se establecerán seminarios estudiantiles.

Se trabajará con estudiantes vinculados a las carreras afines para el apoyo en actividades puntuales.

Otras posibilidades son:

Se planteará un proyecto similar en otras ciudades del país y con diferentes tipos de queso, como el queso manaba, expendido en ferias populares.

Los resultados intermedios serán presentados en seminarios y/o congresos vinculados a la temática, nacionales y/o internacionales

10. IMPACTOS DEL PROYECTO

Se propondrá una tesis para establecer la validación del método alternativo utilizado en el MiniVidas BioMérieux S.A para Listeria monocytogenes, con el método de ensayo ISO 11290-1 de conteo en placa. Esta puede ser una tesis de pregrado para la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la UPS, o para Carreras de Químicos de Alimentos o Ingeniero en Alimentos de otras universidades afines del Ecuador.

A través de vinculación con la colectividad de establecerán acercamientos con los productores artesanales de quesos para informar los resultados obtenidos, y los efectos en la salud de Enterobacterias, Salmonella y Listeria monocytogenes.

Con el proyecto se pondrá énfasis en vincular tanto a los actores primarios como estudiantes y profesionales de las carreras afines de la universidad con el fin de actualizar y afianzar conocimientos de la lechería nacional.

Acuerdos y presentación de resultados de la información a la Asociación de productores lácteos Mitad del Mundo (Asoprolamm) y ejecución de otras actividades y proyectos.

Se establecerá un acuerdo con el Ministerio de Salud para presentar los resultados encontrados y establecer acciones conjuntas para fomentar información.

11. INFORMACIÓN DE COFINANCIADORES (en caso de que existieran)