



**Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado.  
Maestría en Salud Pública y Enfermedades Transmisibles**

**Maestranda  
Bqca. Débora A. López**

## **Evaluación de parámetros microbiológicos de inocuidad e higiene en Yerba Mate elaborada en la provincia de Misiones**

**Tesis de Maestría presentada para obtener el título de “Magíster  
en Salud Pública y Enfermedades Transmisibles”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto,  
queda sujeto al cumplimiento de la Ley N°26.899”.

**Director  
Mgter. Ramón Alejandro Martínez**

**Posadas, Misiones 2018**



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Facultad De Ciencias, Exactas, Químicas Y Naturales  
**Maestría En Salud Pública Y Enfermedades Transmisibles**

2018

# **Evaluación de parámetros Microbiológicos de inocuidad e higiene en Yerba mate elaborada en la provincia de Misiones**

**Autor: Bioquímica Débora A. López**  
**Director: Magister Ramón Alejandro**  
**Martínez**

## DEDICATORIA

*A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.*

*Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.*

**EVALUADORES:**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero mostrar mi gratitud a todas aquellas personas que estuvieron presentes en la realización de esta meta, de este sueño que es tan importante para mí, agradecer todas sus ayudas, sus palabras motivadoras, sus conocimientos, sus consejos y su dedicación.

Muestro mis más sinceros agradecimientos a mi Director de proyecto, quien con su conocimiento y su guía fue una pieza clave para que pudiera desarrollar una clave de hechos que fueron imprescindibles para cada etapa de desarrollo del trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Aguas y Alimentos del Ministerio de Salud Pública de la provincia quienes a través de tiempo fuimos fortaleciendo el equipo de trabajo, muchas gracias por toda su colaboración, por convivir todo este tiempo conmigo, por compartir experiencias, por aportarme su tiempo y dedicación y por crecer juntos en este proyecto.

Por último, quiero agradecer a la base de todo, a mi familia, en especial a mis padres, que quienes con sus consejos fueron el motor de arranque y mi constante motivación, muchas gracias por su paciencia y comprensión, y sobre todo por su amor.

¡Muchas gracias por todo!

## Resumen

La calidad higiénico sanitaria de Yerba Mate Elaborada (*Ilex paraguariensis* var. ST Hilare) no está legislada en el Código Alimentario Argentino (CAA).

El mate es una bebida clásica de frecuente empleo diario en la mayor parte de la población. El consumo de esta bebida podría implicar un riesgo para la salud si estuviera contaminada con cualquier tipo de patógeno.

Existen factores ambientales que favorecen la contaminación y la supervivencia de microorganismos.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar parámetros microbiológicos de inocuidad e higiene en muestras de Yerba mate elaboradas en Establecimientos inscriptos en el Registro Nacional de Establecimientos (RNE) de la provincia de Misiones, esto a partir de determinar la frecuencia de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, y *Bacillus cereus*, y su relación con el cumplimiento de las Buenas Prácticas de manufactura en la elaboración a partir de los valores obtenidos en las auditorias.

El estudio microbiológico de las muestras de yerba obtenidas se realizó mediante la aplicación de recuento de *Escherichia coli*, el recuento de esporas de presunto *Bacillus cereus*, y la presencia de *Salmonella spp.*

De 146 muestras analizadas, se determinó la ausencia de *Salmonella spp.*, para *E. coli* se obtuvo una frecuencia del 9%, y para esporas de presuntos *Bacillus cereus* de 26% sobre el mismo total de muestras procesadas. Resultados que permiten concluir que la yerba mate no sería una matriz adecuada para la supervivencia de *Salmonella spp.* En el caso de *E. coli* y esporas de *Bacillus cereus* reflejarían que, existen condiciones para su desarrollo, debido a deficiencias en diferentes condiciones del proceso de elaboración, almacenamiento y/o manipulación de la yerba mate elaborada.

Se concluye que el cumplimiento de las Buenas Prácticas de manufactura de los establecimientos elaboradores y el recuento de microorganismos aislados en las muestras de yerba mate muestran una correlación, y a su vez se observa la relación entre el uso del acta con los estándares y ponderaciones con los criterios microbiológicos establecidos en el estudio.

**Palabras Claves:** Yerba Mate, Inocuidad, Higiene, Patógenos.

## Abstract

The hygienic and sanitary quality of yerba mate (*Ilex paraguariensis* var. *Hilare* ST) is not legislated in the Argentine Food Code (CAA).

The Mate is a classic drink of frequent daily use in most of the population. Consumption of this drink could pose a risk to health if it was contaminated with any type of pathogen.

There are environmental factors that favor contamination and survival of microorganisms.

This paper aims to evaluate microbiological parameters of safety and hygiene samples Yerba mate produced in registered establishments in the National Register of Establishments (RNE) in the province of Misiones, this from determining the frequency of *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* and *Bacillus cereus*. And its relationship with the compliance of the Good Manufacturing Practices in the elaboration.

The microbiological analysis of samples was performed yerba obtained by applying *Escherichia coli* count, the count of *Bacillus cereus* spores, and the presence of *Salmonella spp.*

Over 146 samples analyzed, was determined the absence of *Salmonella spp.*, *E. coli* was obtained prevalence of 9%, and *Bacillus cereus* spores of 26% over the same total number of samples processed. Results allow us to conclude that yerba mate would not be a suitable matrix for the survival of *Salmonella spp.* In the case of *E. coli* and *Bacillus cereus* spores they reflect that there are conditions for development due to deficiencies in different process conditions of processing, storage and manipulation of the processed yerba mate.

It is concluded that compliance with the Good Manufacturing Practices of the processing establishments and the counting of microorganisms isolated in the yerba mate samples show a correlation, and in turn the relationship between the use of the record with the standards and weightings with the microbiological criteria established in the study.

Keywords: Yerba Mate, Safety, Hygiene, Pathogen

## TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE TABLAS .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE IMAGENES .....	8
NOMENCLATURA.....	9
Capítulo I: Introducción .....	11
ALCANCES Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	11
Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) .....	20
Los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento P.O.E.S .....	22
Manejo Integrado de Plagas (M.I.P.) .....	23
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos.....	27
Justificación .....	28
CAPITULO II: ANTECEDENTES .....	33
Metodología.....	41
<b>Tipo de estudio y diseño</b> .....	41
Resultados y Discusión.....	54
Cumplimiento de Buenas Prácticas de Manufactura en establecimientos elaboradores de yerba mate en la provincia. ....	59
Asociación entre la implementación las Buenas Prácticas de manufactura en los establecimientos elaboradores de yerba Mate con cada uno de los microorganismos estudiados.....	61
Conclusión.....	63
Bibliografía.....	64
TRABAJOS FUTUROS, PROPUESTA O RECOMENDACIONES A FUTURO.....	70



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Criterios de la ICMSF: Planes por atributos de dos o tres clases para evaluaciones microbiológicas: 15 categorías .....	19
<b>Tabla 2:</b> valores límites para <i>coliformes</i> a 45 °C, <i>Salmonella spp.</i> , y <i>Bacillus cereus</i> -ANVISA – Brasil.....	31
<b>Tabla 3:</b> valores límites para coliformes a 45 °C y <i>Salmonella spp.</i> ANVISA –Brasil. ....	31
<b>Tabla 4:</b> valores límites para coliformes totales, coliformes a 44 °C, <i>E.coli</i> y <i>Salmonella spp.</i> , INTN – Paraguay. ....	32
<b>Tabla 5:</b> valores límites para Mohos y Enterobacterias. RM N° 615-2003 SA/DM - Chile.	32
<b>Tabla 6:</b> Reunión del grupo de Criterios Microbiológicos del 25/08/2013.Criterios Microbiológicos para Yerba Mate.....	33
<b>Tabla 7:</b> Índices de NMP y límites de intervalo de confianza (95%) cuando se utilizan tres porciones analíticas de 1 g(ml) tres de 0.1g (ml), y tres de 0,01g (ml) .....	49
<b>Tabla 8:</b> tabla de valores limites microbiológicos utilizados en yerba mate.....	52
<b>Tabla 9:</b> valores límites utilizados como referencia según metodología aplicada.....	54
<b>Tabla 10:</b> Recuento de esporas de <i>Bacillus cereus</i> en establecimientos que cumplen y no cumplen con las B.P.M. ....	60
<b>Tabla 11:</b> Recuento de <i>Escherichia coli</i> en Establecimientos que cumplen y no cumplen con las B.P.M.....	60

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 6:</b> Distribución de valores de <i>E. coli</i> , obtenidos en muestras de yerba mate. ....	56
<b>Figura 7:</b> Distribución de valores de esporas de <i>B. cereus</i> en muestras de yerba mate...	57
<b>Figura 8:</b> Cumplimiento de las B.P.M. y presencia de <i>E. coli</i> en muestras de yerba mate .....	61
<b>Figura 9:</b> Test de Fischer, distribución de medias para el cumplimiento de las B.P.M. y la presencia de <i>E. coli</i> en muestras de yerba mate.....	62
<b>Figura 10:</b> cumplimiento de las BPM y presencia de <i>B. cereus</i> en muestras de yerba mate. ....	62
<b>Figura 11:</b> test de Fisher, distribución de medias para el cumplimiento de las BPM y la presencia de esporas de <i>B. cereus</i> en muestras de yerba mate.....	62

## LISTA DE IMAGENES

<b>Imagen 1:</b> Proceso de Zapecado de Yerba mate .....	12
<b>Imagen 2:</b> Estacionamiento de Yerba mate.....	13
<b>Imagen 3:</b> diagrama de flujo-Molino Yerbatero.....	14

## NOMENCLATURA

**A.N.L.I.S.:** Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud

**A.N.V.I.S.A.:** Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria

**A.O.A.C.:** Association of Official Analytical Chemists

**A.P.H.A.:** American Public Health Association

**B.A.M.:** Bacteriological Analytical Manual

**B.P.M.:** Buenas Prácticas de Manufactura

**B.P.W.:** Buffered Peptone Water

**C.A.A.:** Código Alimentario Argentino

**C.I.P.:** Control Integrado de Plagas

**C.O.N.A.L.:** Comisión Nacional de Alimentos

**E.C:** Escherichia coli

**E.T.A.:** Enfermedades Transmitidas por Alimentos

**G.M.C.:** Grupo Mercado Común

**I.C.M.S.F.:** International Commission on Microbiological Specifications for Foods

**I.M.V.I.C.:** Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato

**I.N.T.N.:** Instituto Nacional de Tecnología Normalización y Metrología dependiente del Ministerio de Industria y Comercio.

**I.R.A.M.:** Instituto Argentino de Normalización y Certificación

**I.S.O.:** International Organization for Standardization

**L.S.:** Lauril Sulfato

**M.I.P.:** Manejo Integrado de Plagas

**M.K.T.T.n.:** MULLER-KAUFFMANN Tetracionato Novobiocina

**M.S. y A.S.:** Ministerio de Salud y Acción Social.

**M.S.P.:** Ministerio de Salud Pública

**M.Y.P.:** Manitol-Yema de huevo-Polimixina

**N.M.P:** Número Más Probable

**N.O.A.:** Noroeste argentino

**P.O.E.S.:** Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento

**R.N.E.:** Registro Nacional de Establecimientos

**R.N.P.A.:** Registro Nacional de Productos Alimenticios

**U.F.C.:** Unidad Formadora de Colonias

**V.P.:** Voges Proskauer

**X.L.D.:** Xilosa Lisina Desoxicolato

## Capítulo I: Introducción

### ALCANCES Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La yerba mate (*Ilexparagueriensis* Saint Hilaire) es un árbol nativo del bosque subtropical de Sudamérica, (Nordeste de la Provincia de Corrientes, Provincia de Misiones, Paraguay y Sur de Brasil). Pertenece a la familia de las aquifoliáceas. Tiene el aspecto de un pequeño arbusto con hojas alternas. La floración es de tipo racimosa y tiene lugar entre los meses de Octubre a Diciembre. Sus flores son muy pequeñas, de color blanquecino o pálido verdoso. Después de la fecundación se desarrollan los frutos que consisten en una pequeña baya, que madura entre los meses de Enero a Marzo, adquiriendo un color azul oscuro o negro violáceo. Cada fruto contiene generalmente de 4 a 8 semillitas de color amarillo pálido, ligeramente rugosas (1).

La yerba mate es una especie cuyo producto de importancia económica son las hojas y ramas finas que a través de las sucesivas podas de las plantas de debe lograr una arquitectura adecuada para asegurar y mantener importantes producciones. Estas podas de producción o cosecha inciden directamente en los rendimientos del cultivo, por lo tanto es importante considerar el tipo de corte a realizar, época, estado de la planta, fertilidad del suelo entre otros(2).

Existen distintos sistemas de cosecha de yerba mate, el más utilizado es la cosecha tradicional, es un conjunto de técnicas de poda manual individualizada, efectuada en diferentes épocas y formas. Una variante de la cosecha tradicional es el corte parejo que consiste en dos operaciones de extracción simultáneas, en el cual las hojas y ramas finas (virutas) son retiradas a mano (viruteo) y las ramas maduras mayores a 0.02 m de diámetro son cortadas a 0.08-0.10 m de la inserción. Por otro lado, la cosecha se puede realizar en dos etapas del año denominada comúnmente melena y consiste en un viruteo con poda de limpieza eventualmente en verano u otoño y en una segunda etapa se cortan las maduras

dominantes (2). Independientemente del corte o poda, se debe dejar en la planta entre el 30 y el 40% de follaje y ramas subdominantes bien distribuidas (3).

El proceso de producción primaria consta de tres etapas: el zapecado, el secado y



una molienda gruesa (canchado). En general existe un alto grado de uniformidad en el tipo de zapecado llevado a cabo, no así en los tipos de secado. El zapecado es un proceso térmico donde las ramas frescas son expuestas al contacto directo con llamas por pocos segundos para

**Imagen 1:** Proceso de Zapecado de Yerba mate

inhibir las reacciones enzimáticas y lograr un 60% de reducción de la humedad inicial. Luego del zapecado la materia prima ingresa a la etapa de secado para lograr el contenido de humedad final adecuado. En la argentina se utilizan tres tipos de secado: *barbacuá* (lecho de ramas en contacto directo durante 9 y 24 horas con gases de combustión de leña alcanzando temperaturas entre 60 y 90 °C); *cinta* (lecho móvil de baja velocidad en contacto con aire caliente y gases de combustión de leña, durante 2 – 5 horas, a temperaturas entre 80 y 130 °C) *rotatorio o tubular* (tambores rotatorios, en algunos modelos las ramas no toman contacto directo con los gases de combustión sino únicamente con aire caliente (secaderos neumáticos) con tiempos de residencia entre 10 - 20 minutos y temperaturas superiores a los 200 °C) (4).

La aplicación de calor sirve para varios propósitos, tales como destrucción de patógenos y microorganismos causantes de deterioro, inactivar las enzimas, la reducción de la humedad y de ablandamiento de tejido. Junto a estas reacciones

deseables existen otras reacciones indeseables también se producen, como la degradación de nutrientes, la decoloración y el pardeamiento no enzimático.

Argentina produce más del 60% del total mundial de yerba mate canchada (molienda gruesa) seguida de Brasil y Paraguay. Constituye la materia prima de los molinos y además es uno de los grados de transformación en los que se comercializa la yerba mate(5).



En cuanto al estacionamiento de la yerba mate se lleva a cabo de dos maneras diferentes, una de ellas es el estacionamiento acelerado, que se realiza en cámaras con ambientes controlados y el estacionamiento natural que se lleva a cabo en depósitos donde prácticamente no se realiza el control de las condiciones ambientales.

El primer método tiene una duración de 30 a 60 días; mientras que el segundo se realiza durante nueve o más meses(6).

Una vez estacionada la yerba ingresa al proceso

**Imagen 2:** Estacionamiento de Yerba mate

de molienda que es el que mediante varias y sucesivas operaciones de zarandeo, trituración y mezcla permite llegar al envasado en la presentación de productos listos para consumir según los distintos gustos de los consumidores. Aparecen así en yerbas molidas las opciones con y sin palo y luego una serie de “sabores” suaves, fuertes e incluso mezclas con distintas hierbas.

Finalmente, una vez obtenida la mezcla deseada de la yerba molida se procede al envasado que para el caso de la yerba mate tradicional se realiza en paquetes herméticos con papeles especiales con capas de distintos materiales para

mantener las características del producto. Por otra parte, existen envases prensados y vibrados y asimismo algunas presentaciones para obsequios con perfil regional. (Bolsas de Lienzo “Sobornales”, Envases metálicos litografiados, etc.)

i

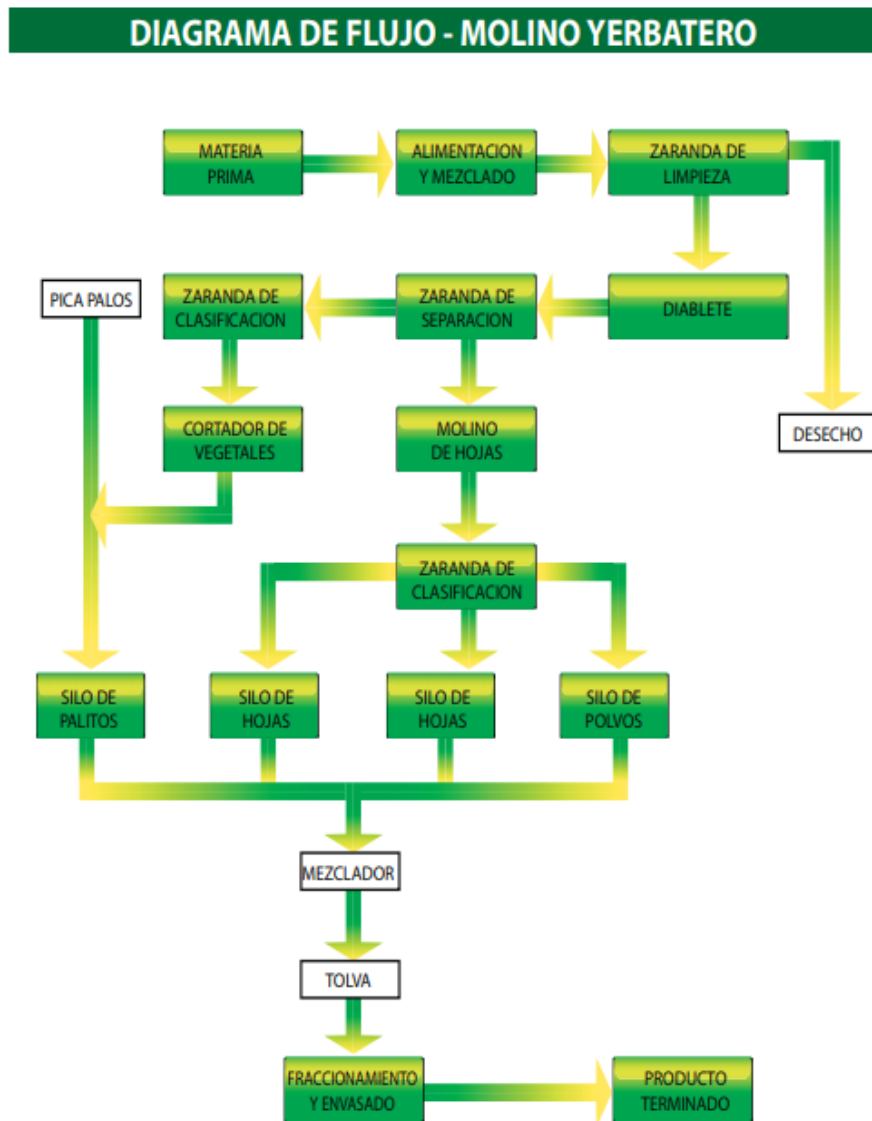


Imagen 3: diagrama de flujo-Molino Yerbatero



El mate es una bebida clásicamente utilizada por los habitantes de nuestra región geográfica y es frecuente su empleo diario en la mayor parte de la población adulta o infanto-juvenil, ya sea en su forma clásica, el mate caliente o en sus otras formas, mate cocido o tereré. La producción de yerba mate en nuestro país alcanza las 310 mil toneladas, de las cuales el 90% se destina al consumo doméstico; el resto es exportado, principalmente, a los mercados sirio, chileno, uruguayo, brasileño, entre otros. El consumo nacional se ha mantenido estable, en la última década, con un valor de 5,5 Kg./hab/año; la particularidad es que comienza a percibirse un mayor grado de exigencia por parte del consumidor, en cuanto a genuinidad y calidad, motivado por cambios en los hábitos de consumo.(7)

La yerba mate es una planta rica en vitaminas, produce una sensación de bienestar, vigor y lucidez intelectual, basado en la presencia del alcaloide mateína (xantina similar a la cafeína) Es diurética, digestiva y optimiza la absorción nutricional del organismo regulando en general todas sus funciones de asimilación. También posee propiedades laxantes debido a su contenido en colina (8).

El consumo frecuente de esta bebida podría implicar un riesgo para la salud si la yerba mate estuviera contaminada con cualquier tipo de microorganismo patógeno (Bacterias y Hongos) o incluso productos derivados de estos últimos como son las micotoxinas.

Varios años atrás los empresarios e industriales del sector yerbatero comenzaron a ofrecer productos diferenciados, con mayor variedad de sabores y amplios beneficios para la salud. Esto se originó en los años 70, cuando Florentino Orquera propuso un sabor nuevo para la yerba mate, con agregado de hierbas serranas y litoraleñas que actualmente se conoce como yerba mate compuesta.(1)

La yerba mate compuesta (YMC) es un producto derivado de la yerba mate, con un porcentaje de hierbas que le confieren un sabor diferente al mate tradicional,

motivo por el cual en los últimos años fue adquiriendo mayor aceptación por los consumidores, apuntando de esta manera a insertarse como alternativa comercial entre aquellos alimentos denominados con el término de "alimentos funcionales". Las hierbas están alcanzando una gran popularidad en el mundo globalizado(1).

La Yerba Mate se emplea también en la preparación de una infusión conocida con el nombre de "Mate cocido" la que una vez preparada se puede consumir parcialmente durante el día, en forma fría o caliente, por lo que el peligro se incrementa debido que los esporos pueden desarrollarse durante el mencionado tiempo y producir toxinas, hasta alcanzar las concentraciones consideradas de riesgo (9),(10).

Existen diferentes factores ambientales que favorecen la contaminación, multiplicación y la sobrevivencia de microorganismos que son capaces de alterar los alimentos o producir un daño en el que los consume. Factores como la actividad del agua el pH y la acidez o el contenido de nutrientes (factores intrínsecos). Y otros como la Temperatura y la humedad (factores Extrínsecos).

Los alimentos pueden ser ácidos o alcalinos, dependiendo de su concentración iones de hidrógeno. Por lo tanto, los fenómenos acidez y la alcalinidad dependen de la ionización de sustancias. El potencial de hidrógeno (pH) de una solución se refiere a concentración molar de iones de hidrógeno (expresado por la concentración de iones H (+). Los alimentos producidos por la naturaleza y consumidos por el hombre en su mayoría son alimentos ácidos. Las frutas tienen un pH entre 3,0 y 4,5; y verduras, tienen un pH que oscila desde 4,6 hasta 6,5. Los valores de pH en los alimentos es uno de las principales factores que influyen en el crecimiento, la supervivencia y/o destrucción de microorganismos que están presentes en él(11).

El contenido de humedad corresponde a la pérdida de peso sufrida por el producto cuando calentado a condiciones en las que se elimina el agua. El aumento de la humedad se produce en alimentos a baja la actividad del agua, haciendo que el deterioro del producto debido al crecimiento microbiológico, cambios sensoriales, la actividad enzimática, la aglomeración y la pérdida de nutrición. La pérdida de humedad en los alimentos también conduce a cambios químicos, físicos y sensoriales(11).

Los agentes biológicos que se ven favorecidos por estos factores constituyen un riesgo alimentario muchas veces con consecuencias asintomáticas pero que en otras de consecuencias graves (12).

Se sabe que el contenido de agua aumenta la velocidad de las reacciones químicas y bioquímicas en los alimentos. Además, después de cierto valor crítico (correspondiente a una actividad del agua igual a 0,6) permite el crecimiento de microorganismos por lo que las variaciones de humedad son de gran importancia, ya que puede poner en riesgo la calidad del producto final (6).

Si bien existen descripciones técnicas precisas acerca de las operaciones involucradas en el procesamiento de vegetales como yerba mate, por lo general el rango de humedad, temperatura e higiene empleadas en el mismo varían ampliamente. Esta situación genera condiciones favorables para la proliferación de contaminantes; los cuales pueden modificar la calidad bromatológica, microbiológica y comercial de yerba mate elaborada y sus formas comerciales (13) (14).

El adición de hierbas o de saborizantes a la yerba mate elaborada, podría representar un riesgo de contaminación microbiológica adicional dado que estos aditivos no pueden ser sometidos a tratamientos de descontaminación térmica o química que asegurarían su inocuidad microbiológica dado que perderían sus propiedades de aroma, sabor y/o actividad medicinal, por la que son empleadas.

Las principales fuentes de contaminación de la yerba mate y de las hierbas son el suelo y el aire. Diferentes suelos poseen su propia flora de bacterias, hongos, protozoos y algas que pueden convertirse en potentes organismos de alteración si se hallan en la superficie de los alimentos(1).

Debido a las características de cultivo y cosecha que presenta la yerba mate en donde el producto está en contacto con tierra y polvo del suelo la probabilidad de contaminación con microorganismos como ser *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*, ampliamente distribuidos en la naturaleza, y a su vez por las características del proceso de elaboración estos microorganismos se podrían encontrar en la yerba Mate elaborada.

*Escherichia coli*. Bacteria más importante dentro del grupo de los coliformes totales que se caracterizan por ser indicadores de contaminación del agua y de los alimentos y que se encuentran; principalmente en el intestino de los humanos y animales de sangre caliente. Ampliamente distribuidos en la naturaleza, suelos semillas y vegetales. *E. coli* es capaz de producir dolor abdominal, diarreas, vómitos, pudiendo llegar hasta una deshidratación severa (15) (16).

*Bacillus cereus*, Se trata de un microorganismo Gram positivo, aerobio mesófilo, esporulado, que tiene un hábitat de crecimiento en tierra. El mismo es productor de toxinas algunas de las cuales son termorresistentes. Este microorganismo produce dos tipos de toxinas preformadas, una de ellas termorresistente que tolera 126°C durante 90 minutos, lo que constituye un riesgo importante para la salud debido a la temperatura del agua a la que generalmente se toma el mate (entre 70 y 80 °C) no constituye una barrera para su destrucción (17) (18).

Las esporas de *Bacillus cereus* son mucho más resistentes a la radiación ionizante que las células vegetativas. Requiriendo mayor cuidado en el diseño y evaluación de los experimentos y la aplicación de tecnología (19).

*Salmonella spp.*, una de las enterobacterias que es causa importante de afectación a la salud del hombre. Puede contraerla cualquier persona en cualquier rango de edad. Con una temperatura óptima de crecimiento de 37° C es capaz de producir fiebre, dolor abdominal, cefaleas, diarreas, vómitos y también septicemias y meningitis (15).

La ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods ) establece 15 “casos” distintos de planes de muestreo teniendo en cuenta, la clase y gravedad de los peligros que entrañan los microorganismos y las condiciones previstas de manipulación y consumo del producto alimenticio tras el muestreo las cuales se observa en la siguiente tabla.

GRADO DE IMPORTANCIA EN RELACIÓN CON LA UTILIDAD Y RIESGO SANITARIO	CONDICIONES ESPERADAS DE MANIPULACIÓN Y CONSUMO DEL ALIMENTO O BEBIDA LUEGO DEL MUESTREO		
	Grado de peligrosidad reducido	Sin cambio de peligrosidad	Aumento de Peligrosidad.
Vida útil y alteración	<b>Categoría 1</b> 3 clases n = 5, c=3	<b>Categoría 2</b> 3 clases n = 5, c=2.	Categoría 3 3 clases n = 5, c=1.
Indicadores de riesgo bajo indirecto para la salud	riesgo Categoría 4 3 clases n = 5, c=3	Categoría 5 3 clases n = 5, c=2	Categoría 6 3 clases n = 5, c=1.
Patógenos de riesgo moderado directo, de diseminación limitada	Categoría 7 3 clases n = 5, c=2	Categoría 8 3 clases n = 5, c=1.	Categoría 9 3 clases n = 10 c=1
Patógenos de riesgo moderado directo, de diseminación potencialmente extensa.	Categoría 10 2 clases n = 5, c=0	Categoría 11 2 clases n = 10 c=0.	Categoría 12 2 clases n = 20 c=0.
Patógenos de riesgo grave directo para la salud.	Categoría 13 2 clases n = 15, c=0	Categoría 14 2 clases n = 30 c=0	Categoría 15 2 clases n = 60 c=0.

**Tabla 1:** Criterios de la ICMSF: Planes por atributos de dos o tres clases para evaluaciones microbiológicas: 15 categorías

1. Vida útil y alteración: Recuento. de aerobios mesófilos

2. Indicadores de riesgo bajo indirecto para la salud: Recuento. de coliformes, Recuento de *E.coli*, Recuento de enterobacterias
3. Patógenos de riesgo moderado directo, de diseminación limitada: causan brotes de infección alimentaria pero su diseminación es rara o no se produce Ej.: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter fetus subsp. Jejuni*
4. Patógenos de riesgo moderado directo, de diseminación Potencialmente extensa: Patógenos de proceso menos graves, con baja dosis infectiva, con infecciones secundarias por contacto persona-persona pueden diseminarse fácilmente de un alimento crudo a cocido. Ej: *E. coli* patógeno, *Salmonella typhimurium* y otras serovariedades, *Shigella flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*
5. Patógenos de riesgo grave directo para la salud: Patógenos que Producen enfermedades graves y pueden ocasionar la muerte: *Clostridium botulinum tipos A, B, E y F*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A y B*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae O1*, *E.coli O157:H7*

**Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)** en los establecimientos elaboradores es la manera más eficaz de prevenir y controlar la contaminación microbiológica causante de enfermedades que producen estos agentes.

Para cada establecimiento elaborador de yerba mate, como para cualquier establecimiento elaborador de alimentos, cosméticos y medicamentos es obligatorio el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), en el caso de la industria alimentaria están incluidas en el Código Alimentario Argentino (C.A.A.) Ley N° 18.284 decreto 2126/71, artículo N° 18 y en la resolución técnica del Mercosur, Resolución GMC N° 080/96 (Incorporada por Res MSyAS N° 587 del 1.09.97).(20)

Las BPM constituyen un conjunto sistematizado de recomendaciones que permiten asegurar la producción uniforme y controlada del producto, se centralizan en la higiene y forma de manipulación. Son reglas mínimas para la obtención de

productos con la calidad esperada, que previenen o reducen los riesgos que dan lugar a fallas.

No son ni técnicas, ni procesos ni métodos. Estos se cambian, pueden volverse obsoletos, incluso desechables; aunque las Buenas prácticas de fabricación que son implementadas por una empresa se elaboran con la idea de que no cambien en muchos años hasta el punto en que son obsoletas o deben ser reemplazadas. Constituyen una guía para la organización y realización de los procesos productivos con miras a la obtención de un producto que responda a las características de calidad específicas.

Siendo una guía, es a la vez un mecanismo estratégico, un instrumento preventivo que indica que hacer, y cómo hacer para reducir al máximo los errores humanos en procesos tan complejos como lo son los de manufactura.

Los principios de las BPM se adaptan sin dificultades a las condiciones específicas de cada establecimiento y son sin duda el camino más eficaz para asegurar la calidad. Pueden extremarse en una escala de intensidad, pero no tienen tolerancia.

Las BPM incluyen Instalaciones y Equipos, Higiene y forma de manipulación, recursos humanos, procesos de elaboración, transporte de materia prima y producto terminado, envases, Almacenamiento, documentación y registros. A su vez permiten diseñar adecuadamente una planta y las instalaciones, realizar en forma eficaz los procesos y operaciones de elaboración, control de calidad, almacenamiento, transporte y distribución de los productos. (21)

Las buenas prácticas de manufactura (BPM) en el estacionamiento y la elaboración de la yerba mate constituyen el último paso del sistema dentro de su proceso de manufactura, estableciendo un lazo de unión entre la actividad yerbatera y el consumidor.

Esencialmente conforma una serie de operaciones sucesivas, en su mayoría térmicas, con los objetivos de detener los procesos biológicos de degradación de los tejidos del vegetal y lograr su deshidratación casi total. Llevando al material a un contenido de humedad de 2-4% y una  $a_w$  0,6 (actividad agua)

Para alcanzar estos objetivos hay que cumplir con los requisitos básicos de las B.P.M. Con el objetivo de reducir los riesgos de contaminación, confusiones de cualquier tipo asociadas a la elaboración o a las adulteraciones. (7)

El cuidado y mantenimiento del estado higiénico en las instalaciones de una organización procesadora/elaboradora de alimentos, es una condición esencial, pero no suficiente, para la implementación de sistemas que aseguren la inocuidad y calidad de los productos que emanan de ella.

Por lo cual, con conciencia, se debe implementar acciones en dicho sentido de saneamiento, razón por la cual se acude a la implementación de los llamados **Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES)**.

**Los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento P.O.E.S.**, son prácticas y procedimientos de saneamiento escritos que un establecimiento elaborador de alimentos debe desarrollar e implementar para prevenir la contaminación directa o la adulteración de los alimentos que allí se producen, elaboran, fraccionan y/o comercializan. Se aplican antes, durante y después de las operaciones de elaboración.

La organización debe contar con un plan escrito que, al detalle, describa sus propios

procedimientos que se llevarán a cabo antes, durante y posteriores a las operaciones, así como las medidas correctivas previstas, la frecuencia con la que se realizarán, el objetivo, todo para prevenir la contaminación u otro inconveniente, en los productos elaborados.



Cada Procedimiento Operativo Estandarizado de Saneamiento, debe estar firmado (en el inicio del plan y cuando se realice cualquier modificación) por personal de la empresa con la suficiente autoridad in situ o, de ser necesario, por una persona de alta jerarquía organizacional. La importancia de este considerando, radica fundamentalmente en que la higiene constituye un fiel reflejo de los conocimientos, actitudes, habilidades y políticas de la dirección y los mandos medios de tal organización. En general., los problemas asociados con una inadecuada higiene, podrían evitarse con la selección, motivación y capacitación continua del equipo de saneamiento, estando esta última a cargo de la Dirección del establecimiento, la cual debe tomar disposiciones para que todas las personas que manipulen alimentos reciban una instrucción adecuada y continua en materia de manipulación higiénica de los alimentos e higiene personal.

**Manejo Integrado de Plagas (M.I.P.)** o control integrado/integral de plagas (C.I.P.) es una estrategia que usa una gran variedad de métodos complementarios: físicos, mecánicos, químicos, biológicos, para el control de plagas. Estos métodos se aplican en tres etapas: prevención, observación y aplicación.

El método aspira a reducir o eliminar el uso de plaguicidas y de minimizar el impacto al medio ambiente mediante a través de utilizar de todos los recursos necesarios, por medio de procedimientos operativos estandarizados, para minimizar los peligros ocasionados por la presencia de plagas. A diferencia del control de plagas tradicional (sistema reactivo), el M.I.P. es un sistema proreactivo que se adelanta a la incidencia del impacto de plagas en los procesos productivos.

Las pérdidas económicas que pueden causar las plagas son mercaderías arruinadas, potenciales demandas por alimentos contaminados y los productos mal utilizados para su control. A estos impactos económicos deben sumarse los daños en las estructuras físicas del establecimiento, y por sobre todas las causas la pérdida de imagen de la empresa.

Para garantizar la inocuidad de los alimentos, es fundamental protegerlos de la incidencia de las plagas mediante un adecuado manejo de las mismas. El MIP es un sistema que permite una importante interrelación con otros sistemas de gestión y constituye un prerrequisito fundamental para la implementación del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP, según su sigla en inglés).

El C.A.A. en el Art 6° de la Ley 18284 junto con la Resolución 091/93 del GMC del Mercosur establece que las autoridades competentes encargadas de la implementación de las BPM (BPM, POES, MIP) serán Ministerio de Salud y Acción Social; Ministerio de Economía y Obras y Servicios Públicos; Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación; Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal; Servicio Nacional de Sanidad Animal; Secretaría de Industria; Instituto Nacional de Vitivinicultura.

En el caso de la provincia de Misiones la autoridad jurisdiccional es el Ministerio de Salud Pública de la provincia. El control y seguimiento de la implementación de las BPM se realiza a través de auditorías programadas a los establecimientos elaboradores utilizando para como herramienta un acta de inspección confeccionada para tal fin.

Para adaptar las tareas de fiscalización de alimentos, al nuevo paradigma basado en la evaluación de los peligros y la estimación de los riesgos presentes o potencialmente presentes en cada producto y la identificación de los escenarios de riesgos que se presentan en los establecimientos elaboradores de alimentos es necesario que el auditor realice una AUDITORÍA basada en peligro/riesgo.(22)  
(23)

Dicha auditoria abarcara todo el proceso de elaboración de la yerba mate tomando como base o punto de partida la identificación de los peligros potenciales para la

inocuidad del alimento y las medidas de control establecidas para dichos peligros en el establecimiento en cuestión.

El proceso de auditoría implicará establecer acciones planificadas en el tiempo, con objetivos de mediano, largo plazo y orientadas a prevenir y controlar los peligros y factores de riesgo en los distintos procesos de elaboración de los productos en cuestión.

Antes de iniciar la recorrida por el establecimiento, el auditor deberá poder identificar si los procesos llevados a cabo en el establecimiento son abiertos, cerrados o ambos. Se definirá a un proceso cerrado cuando el alimento o las MP no tengan contacto directo con el operario ni con el ambiente. Se definirá como un proceso abierto cuando el operario y el medio ambiente tomen contacto con el alimento o las MP.

El auditor deberá poder identificar si las MP utilizadas en el establecimiento tienen asociados peligros químicos, físicos y biológicos.

El auditor deberá relacionar si esos peligros son eliminados o reducidos por el proceso llevado a cabo en el establecimiento, así como evaluar si se evita introducir peligros nuevos o que los preexistentes no proliferen. Los diferentes procesos llevados a cabo en el establecimiento como ser cocción, pasteurización, esterilización, lavado, liofilización, etc. deben tener parámetros a ser controlados, ya que dichos controles van a garantizar la inocuidad del alimento.

El auditor debe poder identificar las etapas de elaboración, aquellas que son críticas y cuáles son las medidas utilizadas para asegurar la inocuidad del alimento, prevención de la contaminación cruzada y controlar los factores de riesgo identificados.(22,23)

Una vez finalizada la auditoria, el auditor deberá reunirse con la persona responsable por la empresa para comunicarle acerca de los hallazgos observados durante la auditoria que figurarán en el Acta de Auditoria. El acta de Auditoría es un documento legal que permite analizar las BPM mediante un checklist que contiene todos los requisitos que deben ser verificados para establecer el cumplimiento de las mismas.

A través del acta se cuantifica el porcentaje de cumplimiento de un establecimiento elaborador asignando valores a cada uno de los puntos críticos que se observan durante una auditoria.

El acta evalúa un establecimiento o planta elaboradora en distintos sectores físicos y condiciones; materia prima, sector elaboración y manipulación, producto terminado, sanitarios y vestuarios, personal manipulador, los POES y el MIP y el suministro de agua.

Analiza dentro de cada uno de estos sectores la infraestructura, las condiciones de higiene, la forma de manipulación y disposición del producto y los registros. A su vez evalúa la idoneidad y conducta del personal, y los procesos y controles de calidad que realiza cada establecimiento.

Por último, permite realizar recomendaciones y mejoras en cada uno de los sectores y puntos analizados durante la auditoria.

El acta asigna un puntaje por cada uno de los parámetros observados basado en los riesgos asociados a procesos de elaboración y calidad e inocuidad del producto terminado, otorgando al establecimiento una categoría como establecimiento elaborador de alto riesgo cuando el porcentaje que se obtiene como resultado de la auditoria es menor al 40%, mediano cuando esta entre el 40% a 70% y por ultimo de bajo riesgo cuando obtiene un porcentaje mayor al 70%.

## **Objetivo general**

- Evaluar parámetros microbiológicos de inocuidad e higiene en muestras de Yerba mate elaboradas en Establecimientos inscriptos en el RNE de la provincia de Misiones y su relación con la implementación de buenas prácticas de manufactura.

## **Objetivos específicos**

- Determinar la frecuencia de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, y Esporas de *Bacillus cereus* en muestras de Yerba mate elaboradas en Establecimientos inscriptos en el RNE de la provincia de Misiones.
- Evaluar el cumplimiento de Buenas Prácticas de Manufactura en establecimientos elaboradores de yerba mate en la provincia.
- Analizar la relación entre la valoración de la auditoria de los establecimientos elaboradores de yerba Mate con cada uno de los microorganismos estudiados.

## **Justificación**

La calidad higiénico sanitaria de la Yerba Mate Elaborada (*Ilex Paraguariensis* var. ST Hilare) no está legislada en el Código Alimentario Argentino (CAA), ya que no existen registros epidemiológicos de enfermedades transmitidas por alimentos para este producto (20). Esto además ha llevado a que en algunos casos se emplee materia prima de menor calidad para su elaboración, con el objeto de reducir el costo final del producto (10).

Existe una escasa de uniformidad en la normativa que regula la comercialización de la yerba mate en el MERCOSUR, sobre la denominación y clasificación, Argentina, Paraguay y Uruguay, denominan la yerba mate canchada -materia prima de la yerba mate elaborada-, figurando sólo en Uruguay y Argentina, condiciones de porcentajes de hojas y palos, tamaño de los mismos y cantidades máximas de polvo a efectos de ser considerada como tal.(20)

Si bien en cuanto a los requisitos microbiológicos se observa que la legislación sanitaria de alimentos de los distintos países se halla en constante actualización - con base en un enfoque de evaluación del riesgo y la prevención del daño a la salud de la población-, Argentina y Uruguay, no contemplan para este producto parámetros microbiológicos de control.

Los países que presentan requisitos microbiológicos son Brasil, Paraguay y Chile. Estos países tomaron como base de criterios microbiológicos la clasificación, los

parámetros de control y planes de muestreo de la ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods), otorgando a la yerba mate la categoría N<sup>a</sup> 5: peligro para la salud bajo, indirecto. Sin cambio de peligrosidad (condiciones normales que se supone será manipulado y consumido el alimento tras el muestreo) (20), (24), (25).

Brasil presenta diferentes valores para la Muestra Indicativa, para el valor del parámetro microbiológico por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud (m) y para el valor del parámetro microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud (M) en el producto "cimarrón", consumido con agua caliente y el producto "tereré" consumido con agua fría, siendo los valores más exigentes en este último.

Con respecto a las técnicas de análisis, sólo la norma Paraguaya describe detalladamente la metodología, equipamiento, instrumental y materiales necesarios para la realización de los ensayos microbiológicos y fisicoquímicos. El Código Alimentario Argentino sólo especifica para el producto yerba mate, el método a ser utilizado en la determinación de cada parámetro fisicoquímico. Los restantes países no incluyen en la normativa analizada en este trabajo las técnicas de análisis (26).

En cuanto a la definición de yerba mate compuesta encontramos notables diferencias en lo normado por cada país para este producto. Argentina a través del Código Alimentario Argentino, Capítulo XV, Artículo 1194, establece los porcentajes máximos permitidos para el palo y la hoja en la yerba mate elaborada, siendo esta de 35% para el contenido de palo y del 65% para el contenido de Hoja. En el artículo 1195, los parámetros Fisicoquímicos a cumplir en la yerba mate elaborada (Humedad, Cenizas, cafeína, semillas, sustancias vegetales extrañas, etc.)

El Artículo 1196 del Capítulo XV, admite la incorporación de hasta un 40 % de una o varias hierbas sávido-aromáticas a la yerba mate elaborada despalillada o con

palo para su consumo como infusión o mate. Agrega un pequeño listado de las mismas mencionando los nombres comunes de siete hierbas sápidas-aromáticas dejando abierta la posibilidad de incorporar otras hierbas que apruebe la autoridad sanitaria nacional.

En Argentina solamente como para todos los alimentos, está reglamentada la ausencia de microorganismos patógenos.

En Brasil la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA), a través de su Reglamento Técnico para café, cebada, Te, Yerba mate y productos solubles Resolución RDC nº 277, 2005; establece los Criterios microbiológicos (Resolución 12-01) a cumplir.

### **Resolución RDC nº 277, 2005 Criterios microbiológicos (Resolución 12-01)**

- 1) Deben obedecer a la legislación específica, utilizando para productos a ser consumidos después de la adición de un líquido con el empleo de calor, cuando las instrucciones de preparación indiquen el uso exclusivo de agua caliente.
- 2) Deben obedecer a la legislación específica, utilizando para productos a ser consumidos después de la adición de un líquido, cuando las instrucciones de preparación indiquen el uso exclusivo de agua fría.

La Tabla 1, contiene los valores límites para *coliformes a 45°C*, *Salmonella spp.*, y *Bacillus cereus* para productos a ser consumidos después de la adición de un líquido con empleo de calor (75 °C durante 20 seg.) excluidos los de base láctea y de chocolate (cacao y similares) como se observa en la Tabla 2.

<b>Microorganismo</b>	<b>N</b>	<b>C</b>	<b>m</b>	<b>M</b>
<i>Coliformes a 45°C</i>	5	2	5	10
<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia	-----



<i>spp/25g</i>				
<i>B.cereus/g</i>	5	2	10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>3</sup>

**Tabla 2:** valores límites para *coliformes* a 45 °C, *Salmonella spp.*, y *Bacillus cereus*- ANVISA – Brasil.

La Tabla 3 muestra los valores límites para *coliformes a 45°C* y *Salmonella spp.*, en productos a ser consumidos después de la adición de un líquido sin el empleo de calor excluidos los de base láctea y de chocolate (cacao y similares).

<b>Microorganismo</b>	<b>N</b>	<b>C</b>	<b>m</b>	<b>M</b>
<i>Coliformes a 45°C/g</i>	5	2	5	5x10
<i>Salmonella spp/25g</i>	5	0	Ausencia	-----

**Tabla 3:** valores límites para *coliformes* a 45 °C y *Salmonella spp.* ANVISA –Brasil.

Métodos de ensayo: la validación de la identidad y calidad deberá ser realizada de acuerdo con los métodos de muestreo y análisis adoptados y recomendados por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), ISO (organización internacional de normatización), por el instituto Adolfo Lutz, APHA (American Public Health Association), BAM (Bacteriological Analytical Manual), y por la comisión del Codex Alimentarius y sus comités específicos.

En el caso de Paraguay el INTN (Instituto Nacional de Tecnología Normalización y Metrología dependiente del Ministerio de Industria y Comercio), en su resolución 3500193, establece los valores límites para *coliformes totales*, *coliformes a 44°C*, *E.coli* y *Salmonella spp.*, para la yerba mate como se ve en la Tabla 4.

<b>Agente microbiano</b>	<b>n</b>	<b>C</b>	<b>m</b>	<b>M</b>
<i>Hongos y Levaduras</i> <i>UFC/g</i>	5	2	150	1500
<i>Coliformes totales NMP/g</i>	5	2	90	200
<i>Coliformes a 44°C NMP/g</i>	5	2	7	15

<i>E.coli/g</i>			0	
<i>Salmonella spp/25g</i>			0	-----

**Tabla 4:** valores límites para *coliformes totales*, *coliformes a 44 °C*, *E.coli* y *Salmonella spp.*, INTN – Paraguay.

En Chile la norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano RM N° 615-2003 SA/DM, establece como valores límites para *Mohos* y *Enterobacterias*, para hierbas de uso alimentario para infusiones (té, mate, manzanilla, boldo, otros) que puede verse en la Tabla 5.

<b>Hierbas de uso alimentario para infusiones (té, mate, manzanilla, boldo, otros)</b>						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g.	
					m	M
<i>Mohos</i>	3	3	5	1	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
<i>Enterobacterias</i>	5	3	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>

**Tabla 5:** valores límites para Mohos y Enterobacterias. RM N° 615-2003 SA/DM - Chile.

El comité de expertos de la comisión Nacional de Alimentos (CONAL) en 2013 realizo una propuesta de criterios Microbiológicos a ser incorporados al Código Alimentario Argentino (CAA) basándose en Normativas Internacionales, estudios científicos y publicaciones previas realizadas por la Universidad Nacional de Misiones (UNaM), y el Ministerio de Salud Pública de la provincia de Misiones, en vegetales, hierbas y estudios en yerba mate. La propuesta refiere a realizar los siguientes determinaciones microbiológicas en yerba mate elaborada, recuento de *E. coli* , recuento de esporas de *Bacillus cereus* y *Salmonella spp.* Tabla 6 (INAL: PROGRAMA FEDERAL. DE CONTROL DE ALIMENTOS, 19/11/2013)

Parámetro	Criterios de aceptación	Metodología
-----------	-------------------------	-------------

Enumeración de <i>E.coli</i> NMP/g	n=5 c=0 m=0,3	ISO 16649-3;2005
Recuento de esporas de <i>Bacillus cereus</i> UFC/g	n=5 c=0 m=10 <sup>2</sup> M=10 <sup>3</sup>	ISO 7932;2004
<i>Salmonella spp</i> /25g	n=5 c=0 m=0	ISO 6579:2002 Co:2004 BAM-FDA:2011

**Tabla 6:** Reunión del grupo de Criterios Microbiológicos del 25/08/2013. Criterios Microbiológicos para Yerba Mate

## CAPITULO II: ANTECEDENTES

La calidad microbiológica de los productos alimenticios se determina estableciendo límites cuali - cuantitativos para parámetros microbianos de interés. La calidad y el cuidado del procesamiento de la yerba mate son decisivos para que el producto mantenga inalterables sus cualidades organolépticas y microbiológicas.

Considerando que Argentina posee la norma IRAM 20517:2007, que establece los métodos y el perfil microbiológico para el control de calidad microbiológica de yerba mate elaborada y yerba mate canchada, pero no establece los límites admitidos(27) (28).

Las principales fuentes de contaminación de la yerba mate son el suelo y el aire, Diferentes suelos poseen su propia flora de bacterias, hongos, protozoos y algas que pueden convertirse en potentes organismos de alteración si se hallan en la superficie de los alimentos (1). La presencia de microorganismos en los alimentos no significa necesariamente un peligro para el consumidor o una calidad inferior de estos productos.

Los alimentos deshidratados o secados como yerba mate no suelen ser estériles; sin embargo, debido a su baja actividad de agua, pueden permanecer estables

microbiológicamente durante mucho tiempo, solo cuando se humedecen puede comenzar su alteración. Si bien los parámetros empleados en la elaboración de yerba mate están estrictamente controlados, por lo general el rango de humedad, temperatura e higiene varían ampliamente, generando condiciones favorables para la proliferación de hongos y bacterias contaminantes; los cuales pueden modificar su calidad bromatológica, microbiológica y comercial(27).

Wood et al., encontraron que durante el almacenamiento la humedad tanto de las hojas como de los palos tuvieron un aumento rápido los primeros días hasta alcanzar el equilibrio, produciéndose luego oscilaciones que dependían de las condiciones externas (6).

Otro parámetro a tener en cuenta es la temperatura, si bien en las primeras etapas las altas temperaturas hacen que disminuya la carga microbiana existente en el momento de la cosecha (29) no garantizan con total seguridad que, en las etapas posteriores del proceso, el producto presente distintos microorganismos provenientes del suelo y del aire, que puedan llegar a alterar la calidad final del mismo (30)(31)

Con respecto a estudios microbiológicos existen muy pocos antecedentes de trabajos realizados en las etapas de elaboración industrial de la yerba mate, en especial a su calidad bacteriológica, habiendo más trabajos realizados sobre su calidad micológica y sobre la capacidad de algunas especies de hongos productores de micotoxinas.(32)

Estudios de calidad microbiológica en Yerba mate canchada, considerada como la materia prima de los molinos, mostraron una contaminación microbiana inferior en relación a lo encontrado en yerba mate elaborada y yerba mate compuesta.

El estudio consistió en el análisis microbiológico de 20 muestras de yerba mate canchada mediante recuentos de bacterias aeróbicas mesófilas totales (BAMT), coliformes totales (CT), coliformes termotolerantes (CTT), hongos y levaduras

(RHL) y detección de *Escherichia coli* y además observar si el período de estacionamiento influye en la proliferación de microorganismos en el procesamiento de la yerba mate, con respecto a esto último concluyeron que la baja contaminación microbiana de la yerba mate durante las primeras etapas del proceso de elaboración, se ve incrementada luego de la etapa de estacionamiento. (5)

Jerke y colaboradores(1) realizaron estudios microbiológicos en 41 muestras de yerba mate compuesta, Con un variado contenido de hierbas sápidas aromáticas. Basándose en las normas IRAM 20517, el mismo consistió en la determinación de bacterias aeróbicas mesófilas totales (BAMT), coliformes totales (CT), coliformes termotolerantes (CTT), mohos y levaduras (RML) y detección de *Escherichia coli*. En el estudio conformaron dos grupos tomando como punto de corte 15% de hierbas adicionales de diferente composición.

Obteniendo como conclusión que en la yerba mate compuesta presenta una importante contaminación microbiana, siendo mayor en la yerba mate compuesta con un agregado de hierbas superior al 15%. Además, concluyeron que el grado de contaminación no estaría relacionado con alguna especie de hierba en particular sino con el porcentaje total de hierbas agregadas, y que los parámetros microbiológicos analizados en yerba mate compuesta resultaron ser superiores a los obtenidos en yerba mate elaborada en estudios regionales previos destacando la importancia de realizar controles microbiológicos en la yerba mate compuesta

Estudios realizados en la búsqueda de hongos productores de micotoxinas en yerba mate elaborada mostraron En todas las muestras procesadas hubo desarrollo fúngico, observándose que el desarrollo de hongos filamentosos fue cuantitativamente más importante con un 89 % de mohos y de levaduras en promedio (11,9 %), y que el predominio era de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Emericella* entre otros. Caracterizando 6 géneros de levaduras con predominio de *Rhodotorula* y *Candida*. Concluyendo de esta manera que la yerba mate es un

sustrato favorable para la contaminación fúngica y que la presencia de géneros micotoxigénicos, debe alertar la posibilidad de hallar micotoxinas en yerba mate con el consiguiente riesgo para la población, perteneciente a todos los grupos etarios, que habitualmente la consume.(33) (13)

J. A. Duce et al., investigaron la presencia de *Bacillus cereus* en más de 30 muestras de yerba mate elaborada donde se determinó la presencia en el 19% del total de muestras analizadas donde además concluye que el riesgo para este tipo de microorganismo estaría dada por una de las formas de consumo de la yerba mate infusión conocida con el nombre de “mate cocido”, la que una vez preparada se consume parcialmente durante el día, en forma fría o caliente, por lo que el peligro se incrementa debido a que los esporos pueden desarrollarse durante el mencionado tiempo y producir las toxinas, hasta alcanzar las concentraciones consideradas de riesgo.(9)

En otro estudio realizado por el Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), Brasil, Moura y colaboradores, analizaron la calidad microbiológica en muestras de yerba mate elaboradas de diferentes marcas provenientes de las zonas productoras estados de Paraná, Santa Catarina y Rio Grande do Sul. Se basaron en las normas de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) RDC nº12 (BRASIL, 2001), los parámetros analizados fueron bacterias aerobias mesófilas, hongos y levaduras, de Coliformes totales e termotolerantes, y *Salmonella* spp. De la investigación se destaca la detección en una de las muestras de la presencia de *Salmonella* spp., mientras que para todos los demás parámetros estaban dentro de lo exigido por la normativa.(34)

En cuanto a la epidemiología asociada a los parámetros microbiológicos propuestos es importante destacar que en el mundo entero los brotes de intoxicación por patógenos como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, o *Bacillus cereus*; están ampliamente distribuidos y se presentan en forma de cuadro diarreico.

La intoxicación alimentaria causada por estos microorganismos se produce debido a la ingestión de Alimentos, cuyo contenido del Microorganismo sea mayor a  $10^5$  unidades formadoras de colonia/gramo (UFC/g) ,(15) (16). La transmisión se produce a través de vía fecal- oral, alimentos contaminados con las heces de animales, agua contaminadas con heces, o por utensilios o superficies de trabajo contaminados (15).

Para el caso de la salmonelosis es considerada una zoonosis de distribución mundial y de origen alimentario. La vía de transmisión es fecal-oral a través de alimentos y agua contaminada con heces humanas o animales, materiales y utensilios de cocina contaminados o por contacto directo de persona a persona. La salmonelosis se puede presentar como una enfermedad no sistémica o gastroenteritis que se caracteriza por un período de incubación de 12 a 72 horas. Puede manifestarse en forma aguda con fiebre ligera que resuelve en dos a tres días, náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea que perdura durante unos días o una semana. La gravedad de los síntomas puede variar desde ligero malestar a deshidratación grave y en algunos casos pueden quedar secuelas crónicas con síntomas de artritis que pueden aparecer 3 a 4 semanas después de los síntomas agudos.

Otra manifestación clínica de la enfermedad es la sistémica, también conocida como fiebre entérica o fiebres tifoidea y paratifoidea, con una incubación de entre 3 y 56 días y síntomas de fiebre, dolor de cabeza, sensibilidad abdominal, constipación, manchas en la superficie del cuerpo de color rojo, infección del flujo biliar, hemorragias provocadas por úlceras y perforación del intestino causando peritonitis(35).

Patógenos como *Bacillus cereus* ha sido implicado en toxiinfecciones alimentarias particularmente asociado al consumo de arroz contaminado, y también en algunos procesos infecciosos en seres humanos y animales (9).

Distintos autores describen la presencia de esporos de *Bacillus cereus* en vegetales deshidratados, especialmente en especias y condimentos (17) ,(18). Entre los años 1960 y 1968 *B. cereus* fue la tercera causa de intoxicación en Hungría con 117 brotes. Otros países fueron Finlandia con 50 brotes, Holanda con 11 y Canadá con 9. Una amplia variedad de alimentos que incluye sopas de vegetales, carne de pollo, vegetales, carne vacuna, pastas, leche y helados estuvieron implicados.

Las intoxicaciones gastrointestinales que produce tienen corto período de incubación (menos de 12 horas), son sintomáticas (principalmente diarrea, dolor abdominal, náuseas y vómito) y son autolimitadas, se resuelven en 12 a 24 horas sin necesidad de tratamiento con antimicrobianos. En la mayoría de los casos para el tratamiento alcanza con la hidratación adecuada del paciente durante el proceso.

Sobre la base de diversos estudios realizados en productos lácteos, se ha determinado un 27% de contaminación en leche en polvo, 52% en helados de máquina y un 17% en leches fermentadas.

Si bien es cierto que no hay estudios de prevalencia de contaminación por *B. cereus* en otro tipo de alimentos de alto riesgo, es importante mencionar que se ha detectado contaminación por este tipo de microorganismos en condimentos y especias (9).

Existen trabajos sobre inactivación térmica de esporas de *Bacillus cereus* donde se demuestra que la temperatura de 55 a 60 y 70 °C no es suficiente para su destrucción. Teniendo en cuenta que a esta temperatura se consume la infusión



del mate cocido, sería importante considerar implementar controles exhaustivos para determinar la presencia de los microorganismos patógenos en Yerba Mate.

La presencia de *Bacillus cereus* (Bordenave y colaboradores, 2006) está estrechamente relacionada con el contacto con polvo circundante tanto en la cosecha como en la elaboración y almacenamiento, en depósitos que en muchos casos no reúnen las condiciones de higiene necesarias, en algunos establecimientos el proceso se lleva a cabo en instalaciones con ventilación inadecuada, sin paredes laterales o sin ventanas (9).

Desde el punto de vista epidemiológico, puede manifestarse como casos esporádicos o brotes con un número variable de afectados. La susceptibilidad es universal.

En el período 1995-1999, Salmonella fue el segundo agente causal más importante (35,3%) de brotes de enfermedad transmitida por alimentos (ETA) en América Latina y el Caribe.

Durante el período 1993-2002 ocurrieron en Argentina 60 brotes de salmonelosis que produjeron 889 enfermos y 4 muertos. El 6,7 % de los brotes fue causado por *Salmonella* serovariedad *enteritidis*, el 1,7% por *S. arizonae* y en el 90% de los casos no se pudo identificar la serovariedad correspondiente.

Con relación a otros alimentos involucrados con dichos patógenos el 25% correspondió a derivados de huevo, mayonesa y carne de aves. Según el Ministerio de Salud de la Nación el porcentaje acumulado a la semana 47 del año 2010 para las gastroenteritis por fiebre tifoidea y paratifoidea es de 22 % contra 38 % correspondiente a la misma semana del año 2009, siendo la región más afectada la del Noroeste Argentino (NOA) para ambos años (36).

*Escherichia coli* es especialmente exitosa en colonizar el tracto gastrointestinal de varios animales. Sus cepas se agrupan en seis distintos grupos diarragénicos: E. coli enteropatógenicos (EPEC); E. coli enterotoxogénicos (ETEC); E. coli enteroinvasiva (EIEC); E. coli enteroagregativas (EAggEC); E. coli de adhesión difusa (DAEC), y E. coli productor de toxina Shiga (STEC).

Los casos de ETA son mayormente asociados con cepas STEC y en menor medida con EPEC, ETEC y EAggEC. El grupo EPEC es considerado potencial productor de ETA a través de su asociación con alimentos como las carnes vacuna y aviar. Otros grupos (ETEC y EAggEC) son también asociados a ETA, aunque infrecuentemente. Dentro de los STEC el serotipo O157:H7 es el principal causante de ETA desde 1982.

La tendencia de los últimos años ha demostrado también como causa frecuente de ETA en el mundo al aumento de la prevalencia de otros serogrupos de STEC no-O157 (O26, O45, O103, O111, O121, O145). STEC ha sido asociado primordialmente con el consumo de carne vacuna, especialmente la picada. Sin embargo, otros alimentos también adquirieron últimamente mayor importancia como causantes de brotes con relación a STEC O157 y no-O157, como es el caso de los vegetales frescos, cortados, lavados y empacados. Resulta importante marcar que otras fuentes tales como el contacto directo con animales de granja y la contaminación ambiental de los alimentos son importantes vías de transmisión de STEC.(37)

## **Metodología**

El estudio microbiológico de las muestras de yerba obtenidas se realizó mediante la aplicación de la siguiente metodología.

### **Descripción del ámbito de estudio**

Se estudiaron las muestras de Yerba Mate elaborada que fueron remitidas al laboratorio de Agua y Alimentos y de muestras de visitas programadas a establecimientos elaboradores (seguimiento de implementación de Buenas Prácticas (BPM), Inscripción de RNE y RNPA).

### **Tipo de estudio y diseño**

Análisis descriptivo. Las muestras que se sometieron al estudio a través de un plan de muestreo en el que se tuvo en cuenta establecimientos elaboradores de yerba mate elaborada de la provincia de Misiones, la localización de los establecimientos, procedimientos de Auditorias a establecimientos elaboradores, muestras remitidas por las empresas elaboradoras de yerba mate elaborada, y las

muestras de yerba mate elaborada provenientes de locales de expendio (góndolas).

### **Población:**

#### **α. Universo o población objetivo;**

Establecimientos elaboradores de yerba mate elaborada de la provincia de Misiones de la provincia de Misiones.

#### **β. Unidad de análisis, criterios de inclusión y exclusión;**

Unidad de análisis. Establecimientos elaboradores de yerba mate elaborada de la provincia de que comercialicen o no en la provincia de Misiones

Inclusión: Secaderos y Molinos que elaboran y comercializan yerba mate elaborada destinada al consumo humano

Exclusión: Secaderos y Molinos que no elaboran o comercializan yerba mate elaborada destinada al consumo humano

#### **χ. Población accesible. Muestra. Selección y tamaño de la muestra. Análisis de sesgos.**

Quedaron incluidos en el estudio todos los Establecimientos elaboradores de yerba mate elaborada de la Provincia de Misiones que comercializan productos destinada al consumo humano y que accedieron a participar en el proyecto y por lo tanto firmaron el consentimiento informado.

#### **Selección de técnica e instrumento de recolección de datos. Fuentes primarias y secundarias. Prueba piloto del instrumento.**

Se completaron los datos necesarios para la identificación de las muestras en la planilla correspondiente. Incluyendo datos del elaborador, del establecimiento,

RNE (Registro Nacional de Establecimiento), RNPA (Registro Nacional de Producto Alimenticio), Tipo de Yerba Mate, Condiciones de la Muestra al ser emitida al laboratorio, número de lote, fecha de elaboración, fecha de vencimiento.

Este proceso de obtención de muestras y análisis de muestras y de resultados se realizó durante el periodo comprendido desde el día 01/01/2015 al 01/12/2015

El estudio microbiológico de las muestras de yerba obtenidas se realizó mediante la aplicación de la siguiente metodología.

ICMSF método 1 para la enumeración de *Escherichia coli*

ISO 7932:2004 para el recuento de Esporas de *Bacillus cereus*

ISO 6579: 2002 para la determinación de la presencia de *Salmonella spp.* en 25 g.

**ICMSF Método 1: Recuento de *Escherichia coli* Técnica del Número Más Probable**

**1. Preparación de la suspensión inicial:**

Xg de la muestra + 9 Xg ml de diluyente (dilución 1/10)

Ej. 10 g+/- 0.5 g de la muestra + 90 ml +/- 4.5 ml del diluyente

Homogeneizar: de 1 a 3 minutos

**1. Preparación de diluciones decimales:**

1 ml de la suspensión inicial + 9 ml del diluyente (dilución 10<sup>-2</sup>)

Mezclar (preferentemente con vortex durante 5s a 10s)

Proceder de la misma manera para las siguientes diluciones. Utilizando un nuevo tips o pipeta para cada dilución.

**Método de Enumeración: Se informa NMP/g**

Se siembran 10 ml de la dilución  $10^{-1}$  una series tres tubos de caldo Lauril sulfato Triptosa doble concentración, y 1ml de la dilución  $10^{-1}$  en tres tubos de caldo Lauril sulfato Triptosa simple concentración y 1ml de la dilución  $10^{-2}$  en tres tubos de caldo Lauril sulfato Triptosa simple concentración. Incubar  $35-37^{\circ}\text{C}$  / 24-48h

Cada tubo positivo de caldo LS (presencia de gas) repicar en caldo EC e Incubar a  $44^{\circ}\text{C}$  48 hr.

Todos los tubos positivos de caldo EC (presencia de gas) se pasan a agar selectivo EMB) siembra por aislamiento) Incubar  $35-37^{\circ}\text{C}$  / 24-48h.

Observar desarrollo de colonias características. Identificación a través de pruebas bioquímicas IMVIC.

Calcular el NMP (tabla) en función de los tubos positivos de cada dilución.

### **ISO 7932:2006 para el recuento de Esporas de *Bacillus cereus***

En un frasco estéril o bolsa de plástico estéril pesar con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  una cantidad de masa x g o medir con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  un volumen x ml (como mínimo 10 g ó 10 ml a menos que se indique otra cantidad).

Agregar una cantidad del diluyente igual a 9 x g ó 9 x ml (dilución 1/10) y homogeneizar de 1 a 3 minutos dependiendo del alimento.

Para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos de temperatura, la temperatura del diluyente debería ser aproximada a la temperatura ambiente.

Transferir con una pipeta 1ml (con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$ ) de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril, para obtener la dilución  $10^{-2}$ .

Transferir por medio de una pipeta estéril, 0.1 ml de la muestra si el producto es líquido ó 0.1 ml de la suspensión inicial (dilución 1/10), por duplicado, a placas de

agar MYP. Si es necesario repetir el procedimiento para las sucesivas diluciones decimales.

Para algunos productos se puede aumentar el límite de detección por un factor de diez, examinando 1 ml de la muestra inicial si es líquida ó 1 ml de la suspensión inicial para otros productos. Distribuir 1 ml del inóculo en la superficie de una placa de Petri de 140 mm de diámetro con agar MYP o en tres de placas 90 mm de diámetro con agar MYP utilizando una espátula de Drigalsky.

En ambos casos preparar duplicados usando dos placas de 140 mm o seis placas de 90mm. Distribuir el inóculo tan pronto como sea posible sobre la superficie del medio sin tocar los bordes de las placas con una espátula estéril. Utilizar una espátula para cada placa. Dejar las placas con la tapa puesta por 15 minutos a temperatura ambiente para permitir que el inóculo sea absorbido en el agar.

Invertir las placas e incubarlas a 30°C entre 18 y 24 horas. Si no hay colonias claramente visibles, incubar las placas por 24 horas adicionales antes del conteo.

Las colonias presuntas son grandes, rosas (indicando que no ocurre fermentación del manitol) y generalmente rodeadas de una zona de precipitación (producción de lecitinasa).

Estriar, pinchar o sembrar como mancha las colonias seleccionadas a partir de las placas de MYP en la superficie de agar sangre de oveja de modo de obtener colonias aisladas que permitan una buena interpretación de la reacción de hemólisis.

Incubar a 30°C durante 24 h y leer la reacción de hemólisis. Cada colonia rodeada de una zona clara se considera hemólisis positiva.

El término “presunto” se utiliza con el fin de reconocer el hecho que la fase de confirmación no permite la distinción entre *Bacillus cereus* y otras especies de *Bacillus* estrechamente relacionadas. Las cepas aisladas se enviarán al centro de referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. Dr. Carlos Malbran, para una mayor tipificación.

**ISO 6579: 2002 para la determinación de la presencia de Salmonella spp. en 25 g**

Para la preparación de la suspensión inicial se utiliza en general como diluyente Agua Peptona Bufferada (BPW). Si la cantidad de la porción a analizar es mayor de 25 g utilizar la cantidad necesaria del diluyente de pre-enriquecimiento para llevar a una dilución 1/10.

Enriquecimiento para chocolate y alimentos que contienen chocolate (ej. Más de un 20%): agregar al BPW 50 g/l de caseína (evitar el uso de caseína ácida) o 100 g/l de leche en polvo descremada estéril. Después de 2 horas de incubación agregar 0.018 g/l de verde brillante si el alimento es sospechoso de tener una alta contaminación con flora Gram positiva.

Enriquecimiento para alimentos ácidos: asegurarse que el pH no caiga por debajo de 4.5 durante el pre-enriquecimiento. En este caso el pH es más estable si se utiliza agua peptona bufferada (BPW) doble concentración. Incubar el pre-enriquecimiento a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ .

Transferir 0.1 ml del cultivo obtenido a un tubo con 10 ml de caldo RVS e incubar a  $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ . Transferir 1 ml del cultivo obtenido a un tubo con 10 ml de caldo MKTTn e incubar  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ .

Tomar un ansada de los cultivos obtenidos en 3.3.2. (caldo RVS y MKTTn) y estriar en una placa de agar XLD. Utilizar las placas de Petri grandes ó 2 del



menor tamaño usando el mismo ansa. Proceder de la misma manera con el segundo agar selectivo.

Incubar las placas de XLD a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  y el segundo agar selectivo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Examinar las placas después de la incubación para la determinación de la presencia de colonias típicas de Salmonella y colonias atípicas que podrían ser Salmonella.

Las colonias típicas de Salmonella en el agar XLD son transparentes, del mismo color del medio con centro negro.

Para la confirmación por propiedades bioquímicas pueden utilizarse kits comerciales para los cuales deben seguirse las instrucciones del fabricante.

Para la confirmación bioquímica y serológica utilizar cultivos puros. Agar TSI: con una aguja de inoculación hacer una punción en el fondo y estriar el pico de flauta. Incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ . Agar urea,  $\beta$ - Galactosidasa y medio para Voges –Proskauer (VP) e indol.

Confirmación serológica y serotipificación

General: La detección de la presencia de los antígenos O, Vi Y H de Salmonella se realiza por aglutinación en placa con los sueros apropiados a partir de colonias puras.

Determinación del antígeno O: colocar una gota del suero anti O en una placa de vidrio, con un ansa dispersar parte de la colonia para obtener una suspensión turbia y homogénea. Mover la placa de vidrio en círculos por 30 a 60 segundos. Observar el resultado contra un fondo oscuro preferiblemente con ayuda de una lupa. Si se observa aglutinación la reacción es considerada positiva.

Determinación del antígeno Vi: colocar una gota del suero anti Vi en una placa de vidrio, con un ansa dispersar parte de la colonia para obtener una

## Expresión de los resultados

De acuerdo a los resultados de la interpretación; indicar presencia o ausencia de Salmonella en la cantidad de muestra analizada (por gramos o mililitros para muestras líquidas).

### • Definición operacional de las variables y categorías

#### ICMSF método 1 para la enumeración de *Escherichia coli* Técnica del Número Más Probable

Para obtener los valores se calcula el NMP (tabla) en función de los tubos positivos (turbidez y presencia de gas) de cada dilución y el desarrollo de colonias características e Identificación a través de pruebas bioquímicas IMVIC.

El mínimo valor obtenido será menor a 0.3 NMP/g de acuerdo con la “Tabla 7” y máximo mayor 110 NMP/g.

				Límites de intervalos de confianza (95%)		
Número de resultados positivos			Índice de NMP	Categorías	Límite inferior	Límite superior
0	0	0	<0,30		0,00	0,94
0	0	1	0,3	3	0,01	0,95
0	1	0	0,3	2	0,01	1
0	1	1	0,61	0	0,12	1,7
0	2	0	0,62	3	0,12	1,7
0	3	0	0,94	0	0,35	3,5
1	0	0	0,36	1	0,02	1,7
1	0	1	0,72	2	0,12	1,7
1	0	2	1,1	0	0,40	3,5
1	1	0	0,74	1	0,13	2
1	1	1	1,1	3	0,4	3,5
1	2	0	1,1	2	0,4	3,5
1	2	1	1,5	3	0,5	3,8
1	3	0	1,6	3	0,5	3,8
2	0	0	0,92	1	0,15	3,5
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5
2	0	2	2	0	0,5	3,8
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8
2	1	1	2	2	0,5	3,8
2	1	2	2,7	0	0,9	9,4
2	2	0	2,1	1	0,5	4
2	2	1	2,8	3	0,9	9,4

2	2	2	3,5	0	0,9	9,4
2	3	0	2,9	3	0,9	9,4
2	3	1	3,6	0	0,9	9,4
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4
3	0	2	6,4	3	1,6	18,1
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9
3	1	2	12	3	3,0	36
3	1	3	16	0	3,0	38
3	2	0	9,3	1	1,8	36
3	2	1	15	1	3,0	38
3	2	2	21	2	3,0	40
3	2	3	29	3	9,0	99
3	3	0	24	1	4,0	99
3	3	1	46	1	9,0	198
3	3	2	110	1	20,0	400
3	3	3	>110			

**Tabla 7:** Índices de NMP y límites de intervalo de confianza (95%) cuando se utilizan tres porciones analíticas de 1 g(ml) tres de 0.1g (ml), y tres de 0,01g (ml)

### ISO 7932:2004 para el recuento de Esporas de *Bacillus cereus*

Método de cálculo Para que un resultado sea válido, se suele considerar necesario que el recuento de colonias se realice al menos en una placa que contenga un mínimo de 15 colonias sospechosas (de acuerdo a la norma específica ISO 7932 para recuento de *Bacillus cereus* en placa).

Método de cálculo después de la confirmación. En este método donde se requiere de una confirmación para el recuento, se identifica un número de colonias sospechosas (A) que se someten a confirmación. Tras la confirmación en el agar sangre, se calcula el número de colonias de cada placa (a) que cumplen con los criterios de la confirmación, utilizando la ecuación (1):

$$a = \frac{b}{A} X C$$

#### Dónde:

b: es el número de colonias que cumplen con los criterios de confirmación dentro de las colonias sospechosas A que se someten a confirmación

C: es el número total de colonias sospechosas contadas en cada placa

El resultado calculado se aproxima al número entero más próximo. Cuando se realiza esta operación, si la primera cifra decimal es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior; si la primera cifra decimal es igual o superior a 5, la cifra anterior se

incrementa en una unidad. El número de microorganismos N presentes en la muestra de análisis se calcula reemplazando  $\Sigma C$  por  $\Sigma a$  en la ecuación general:

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d} \text{ quedando } N = \frac{\Sigma a}{V \times 1,1 \times d}$$

Donde:

V: es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en mililitros

d: es la dilución correspondiente a la primera dilución elegida (d = 1 cuando se utiliza el producto líquido sin diluir)

El resultado calculado se redondea a dos cifras significativas. Cuando se realiza esta operación, si la tercera cifra es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior; si la tercera cifra es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad. Preferiblemente el resultado se expresa como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos cifras significativas. El resultado se expresa como número de microorganismos N por gramo de producto. (UFC/g).

Las cepas aisladas de presunto *Bacillus cereus* se remitieron al centro de referencia Dr. Carlos Malbran, para su tipificación y distinción entre B. cereus y otras especies estrechamente relacionadas.

Los aislamientos se caracterizaron e identificaron adicionalmente mediante el sistema fenotípico API 50CH / 20E utilizando el software APILAB Plus. Técnicas moleculares para detección de genes para toxinas (PCR)

### **ISO 6579: 2002 para la determinación de la presencia de *Salmonella spp* en 25 g.**

Expresión de los resultados De acuerdo a los resultados de la interpretación de las pruebas bioquímicas de confirmación se indica presencia o ausencia de *Salmonella spp.*, en la cantidad de muestra analizada (en este caso en 25 gramos de muestra).

### **Plan de muestreo**

Se tomó una sola unidad de muestra por lo que se aplica el criterio de muestra indicativa, donde el criterio de aceptación para la muestra indicativa es de dos (2) clases.

De igual manera en los casos en donde se cuenta con una sola muestra de yerba mate ( $n=1$ ) para el análisis microbiológico se procederá en la interpretación de los resultados como una muestra indicativa.

#### Criterio de aceptación para la muestra indicativa:

Para parámetros que presentan un plan de muestreo de 2 clases mantener el plan y la alícuota de muestra analizada en gramos para cada parámetro; o sea aceptación o rechazo, en función de la presencia o ausencia del microorganismo investigado en la muestra indicativa.

Se considerará no conforme todo elemento contaminado que presente una concentración superior a **m**

En este proyecto se utilizaron como valores de corte los que se detallan en la tabla 8.

Determinaciones	Valores de referencia
<i>Recuento de esporas de presunto Bacillus cereus (UFC/g)</i>	n: 5; c:1; m: 10 <sup>2</sup>
<i>Recuento de Escherichia coli (NMP/g)</i>	n: 5; c:0 m: <0,3
<i>Salmonella spp. 25/g</i>	Ausencia

**Tabla 8:** tabla de valores limites microbiológicos utilizados en yerba mate

### Evaluación del cumplimiento de las Buenas Practicas

Previo a la toma de muestras y su posterior análisis, se realizaron auditorías a los establecimientos elaboradores de yerba mate donde se evaluó el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) exigidas por el Código Alimentario Argentino, utilizando un acta de auditoria que otorga una valor para cada ítem evaluado en las Buenas Practicas en cada uno de los sectores del establecimiento elaborador, estos incluyen, condiciones edilicias, personal manipulador, Procedimientos de limpieza y desinfección, Manejo integrado de plagas, análisis de materia prima y producto terminado y registros. (Ver anexo 1). Se estableció una ponderación del cumplimiento para cada ITEM y se caracterizó a los establecimientos como cumplimiento y no cumplimiento de las BPM tomando como punto de corte un puntaje de 70 %

Plan de análisis estadístico de los datos en las muestras de yerba elaboradas se utilizó la prueba de Fisher para un nivel de confianza del 95 %.

## Resultados y Discusión

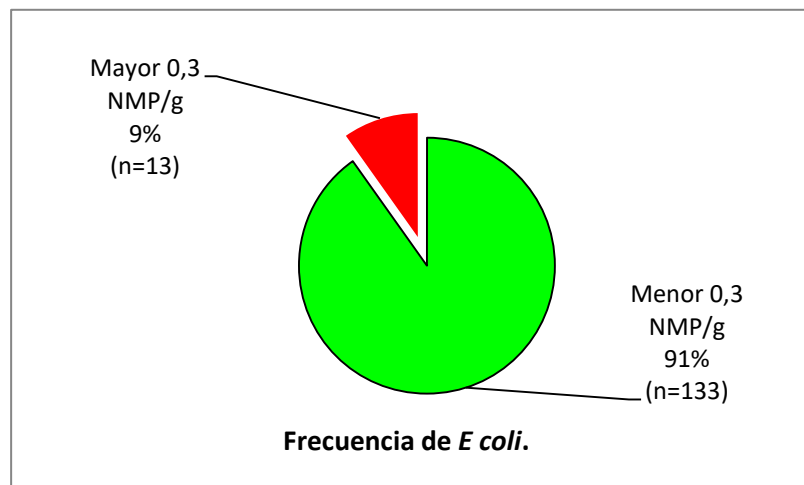
### -Frecuencia de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, y esporas de *Bacillus cereus* en muestras de yerba mate elaborada.

Para el análisis de los datos obtenidos para los diferentes parámetros analizados, se estableció como valores límites como puede observarse en la Tabla 9.

Parámetros	limites	metodología
Recuento de <i>E. coli</i> (NMP)	<0.3 NMP/g	ICMSF-Met 1
<i>Salmonella spp</i> /25gr	Ausencia/25g	ISO 6579:2002
Recuento de esporas de presunto <i>Bacillus cereus</i>	<100 UFC/g	ISO 7932:2004

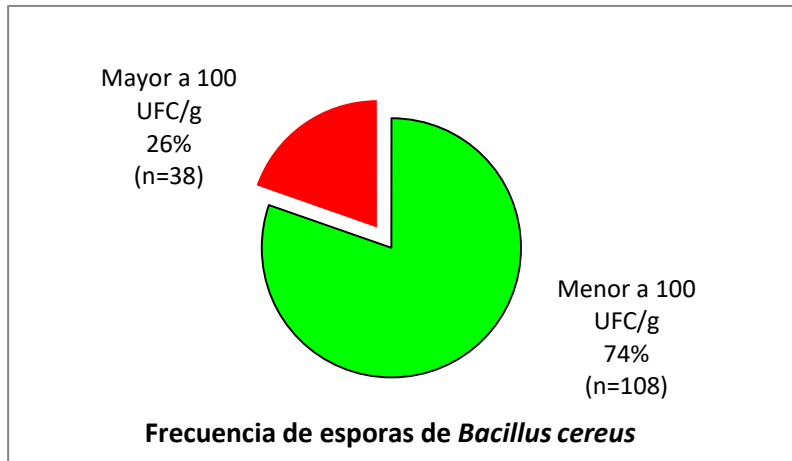
**Tabla 9:** valores límites utilizados como referencia según metodología aplicada

A partir de 146 muestras que corresponden a 87 marcas de 39 establecimientos elaboradores (molinos) de la provincia de Misiones analizadas, los resultados obtenidos muestran que no se aisló *Salmonella spp.*, con la esta metodología utilizada, mientras que para *E. coli* se obtuvo una frecuencia de 9% (n=13) como observamos Figura 1, y para esporas de *Bacillus cereus* de 26% (n=38) de la Figura 2, sobre el mismo total de muestras. Mientras que para la presencia de ambas bacterias en una misma muestra fue solamente del 8,2% (n=12) que se observa en la Figura 3.

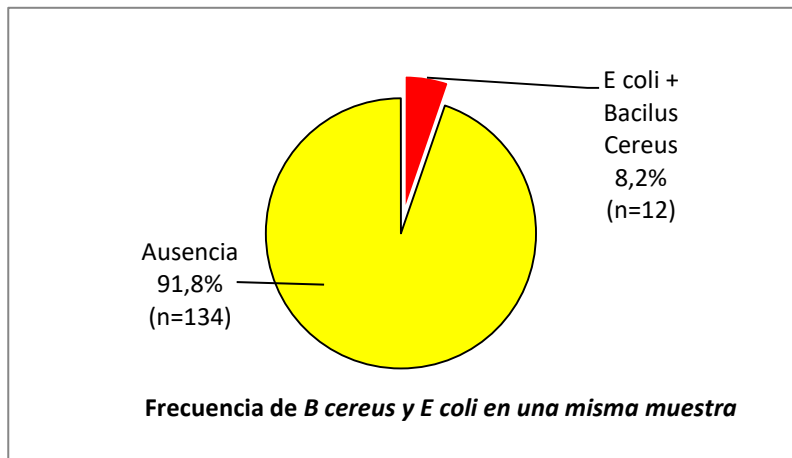


**Figura 1:** frecuencia de *E. coli* detectadas en muestras de yerba mate



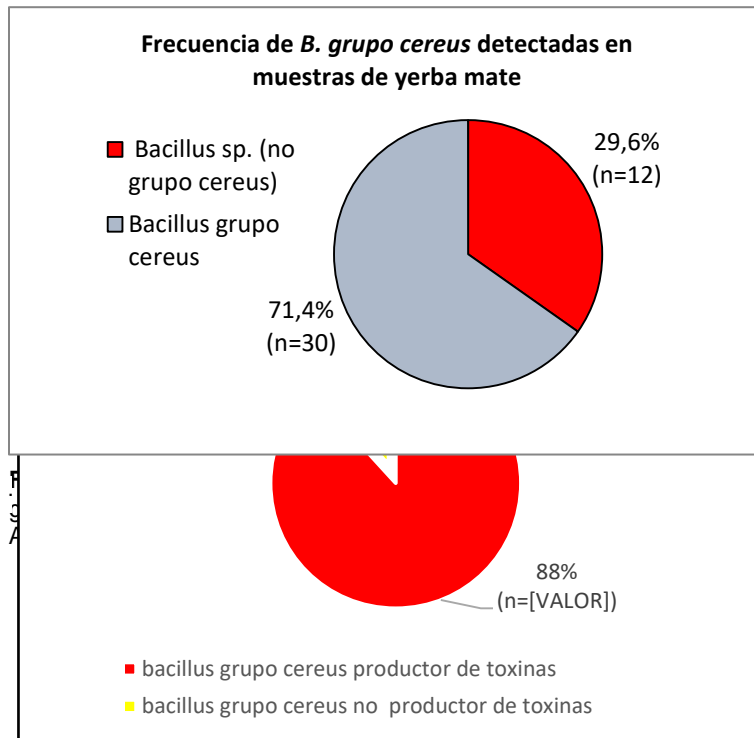


**Figura 2:** frecuencia de esporas de *B. cereus* detectadas en muestras de yerba mate



**Figura 3:** frecuencia de muestras de yerba mate detectadas con esporas de *B. cereus* y *E. coli*

Los resultados obtenidos de las cepas remitidas muestran que del total de las 42 cepas remitidas el 71,4% (n=30) de las muestras se confirmaron como *Bacillus* del grupo *cereus*, mientras que el 29,6% (n=12) correspondía a *Bacillus* de grupo no *cereus* que se observa en la Figura 4. Sobre un total de 17 cepas confirmadas como *Bacillus* del Grupo *cereus* se obtuvo un total de 15 Cepas productoras de las toxinas por métodos moleculares (reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) lo que representa un 88% de las mismas.

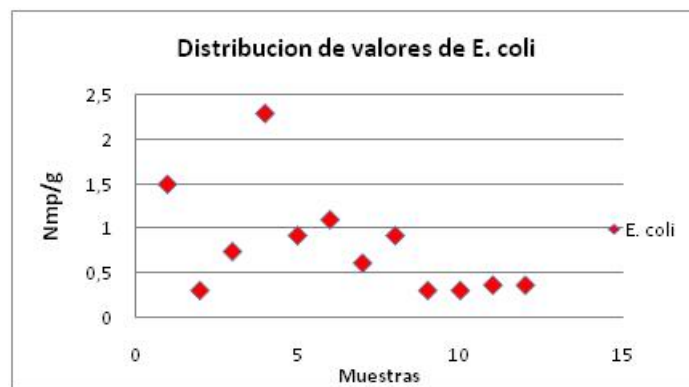


Para la A de los *coli* por el utilizado se

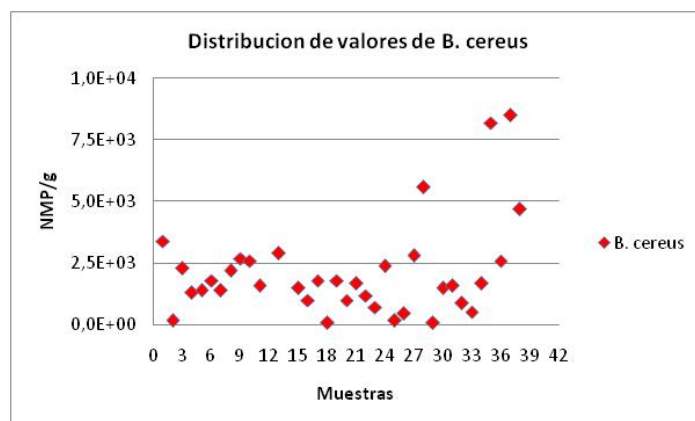
distribución valores de *E. coli* obtenidos método observó que

**Figura 5:** frecuencia de *Bacillus grupo cereus*, y de *Bacillus sp.* No

los valores están comprendidos entre 0,3 NMP/g mínimo valor detectable (según tabla N° 1, NMP/g) y 110 NMP/g como máximo valor detectado (**Figura 6**). Mientras que para *B. cereus* se encontró una distribución de valores más amplia que oscilan entre valores mayores a 10 UFC/g y 5,4 E+04 UFC/g (**Figura 7**), según fórmula utilizada para la metodología **ISO 7932:2004** para el recuento de Esporas de *Bacillus cereus*.



**Figura 1:** Distribución de valores de *E. coli*, obtenidos en muestras de yerba mate.



**Figura 2:** Distribución de valores de esporas de *B. cereus* en muestras de yerba mate

En estudios realizados por Horiński y colaboradores (27), observaron que, durante las primeras etapas del procesamiento de la yerba mate, la carga microbiana es muy baja probablemente debido a las altas temperaturas a la que es sometida durante el zapeado y al bajo contenido de humedad que presentan después del secado. Además, obtuvieron una baja contaminación microbiológica detectada en la yerba mate canchada. Por comparación con los resultados observados en yerba mate elaborada concluyeron que la carga inicial de microorganismos aumenta durante el estacionamiento, por lo que aconsejan realizar controles en dicha etapa para evitar el crecimiento de la población microbiana.

En el caso de *Bacillus cereus* en trabajos realizados en la ciudad de Vargeão, Santa Catarina, Brasil, obtuvieron que solo en el 5% de los recuentos totales de las muestras de hojas verdes de yerba mate, *Bacillus cereus* estaba presente siendo el recuento medio en estos lotes de  $2.4 \times 10^1$  UFC / g, insuficiente para iniciar un proceso infeccioso, esto debido a la baja probabilidad de la multiplicación en la yerba mate dada las características que adquiere la misma luego del proceso de elaboración y suponiendo que el producto se consume inmediatamente después de la adición de agua. Por lo tanto, concluyen que el procesamiento industrial de la yerba mate produce un producto estable en comparación con las

hojas verdes, que están expuestas a una mayor variación en la humedad, la temperatura, así como el contacto con los insectos que pueda tener

(38)

Así también fue confirmada la ausencia de *Salmonella spp.*, y los valores de recuentos de coliformes, bacterias mesófilas y hongos por debajo de los límites aceptados establecidos por las normas reglamentarias brasileñas y por la OMS. en las muestras analizadas,

Los microorganismos relacionados con las condiciones sanitarias estaban presentes en números bajos, lo que indica que estos lotes se encontraban dentro de los parámetros microbiológicos establecidos por la ley brasileña, lo que sugiere que durante el procesamiento se aplicaron las Buenas Prácticas de Manufactura.

(38)

Dos Santos estudio los parámetros microbiológicos de yerba mate canchada y obtuvo valores menores a 3 NMP/g, para coliformes a 37 °C y 45 °C y ausencia de *Salmonella spp* en 25 g. Mientras que, y que en el caso de la yerba mate elaborada los valores de los recuentos microbiológicos se mantuvieron por debajo de los límites máximos establecidos por la legislación brasileña y la OMS, para coliformes a 45 °C, los resultados fueron menor a 3 NMP/g) y ausencia de *Salmonella spp.*, en 25 g para las muestras sometidas a estudio.

Así mismo evaluó la estabilidad de yerba en envases de polietileno plástico (PET), almacenadas durante 180 días y obtuvo similares resultados, para coliformes totales y fecales y ausencia de *Salmonella spp.* (39).

Moura y colaboradores, aplicando la norma brasilera para los criterios microbiológicos, obtuvieron a partir del análisis de 13 muestras de diferentes marcas

para bacterias coliformes totales y termotolerantes resultados dentro de los límites establecidos (93,3%), mientras que para el caso de *Salmonella spp* en el 6,7% se detectó su presencia. El autor manifiesta que la probabilidad de detectar *Salmonella spp.* Podría estar relacionado con una deficiencia en la manipulación del producto, y el déficit de los controles desde la materia prima hasta la obtención

del producto terminado, factores relacionados con la implementación y cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura. (34)

### **Cumplimiento de Buenas Prácticas de Manufactura en establecimientos elaboradores de yerba mate en la provincia.**

A partir de cada uno de los ítems analizados en el acta de auditoria para simplificar su análisis los mismos se agruparon en cuatro categorías, condiciones edilicias, procedimientos de limpieza y desinfección (POES), higiene del personal y manejo integrado de plagas (MIP) donde a cada categoría se le asignó un porcentaje de cumplimiento mayor al 70%.

Del total de los establecimientos visitados 15 obtuvieron un porcentaje menor al 70% de cumplimiento correspondiendo al 38.4% del total de establecimientos. A partir del análisis de cada uno de las categorías evaluadas en la totalidad de los establecimientos auditados, se observó el cumplimiento en las condiciones edilicias en el 61% de los casos, para manejo integrado de plagas (MIP) 56%, para los procedimientos de limpieza y desinfección (POES) 56% y para la higiene del personal 87%.

Se evidencia entonces que, a partir de los resultados obtenidos, las condiciones limpieza y desinfección y Manejo integrado de plagas serían los factores que contribuyen a la presencia de estos microorganismos en muestras de yerba mate.

Al comparar los valores de porcentajes de cumplimiento obtenidos de cada uno de los establecimientos con los resultados de las muestras correspondientes se observó que en 7 de los 15 establecimientos que no cumplen se detectó esporas de *B. cereus* (**Tabla 10**), y en 6 establecimientos para el caso de *E. coli* (**Tabla 11**).

Recuento de esporas de <i>Bacillus cereus</i>	CUMPLE BPM	NO CUMPLE BPM	Total
Menor a 100	21	8	26
Mayor a 100	3	7	13
	24	15	39

**Tabla 10:** Recuento de esporas de *Bacillus cereus* en establecimientos que cumplen y no cumplen con las B.P.M.

Recuento de <i>E. coli</i>	CUMPLE BPM	NO CUMPLE BPM	Total
Menor a 0,3	21	10	31
Mayor a 0,3	2	6	8
	24	15	39

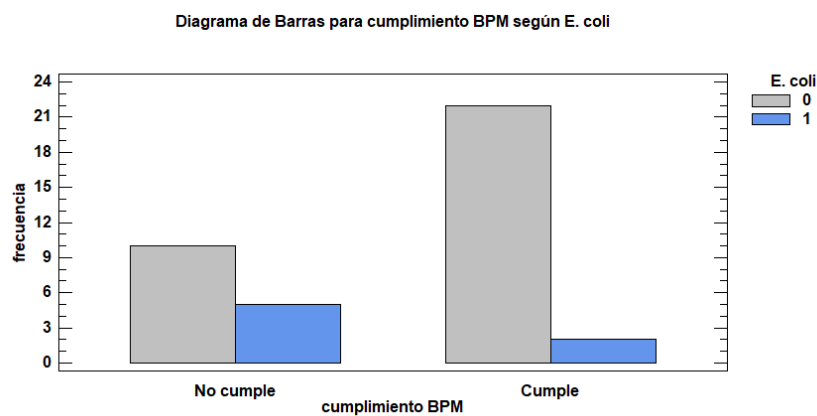
**Tabla 11:** Recuento de *Escherichia coli* en Establecimientos que cumplen y no cumplen con las B.P.M.

Bordenave (9), en estudios realizados en yerba Mate canchada y yerba Mate elaborada, observaron que los valores de recuento de coliformes totales, coliformes fecales y hongos y levaduras encontrados en el proceso de canchado, se incrementan en gran medida en la yerba Mate elaborada y que posiblemente se deba a deficiencias higiénico-sanitarias en el establecimiento durante los procesos de molienda y envasado.

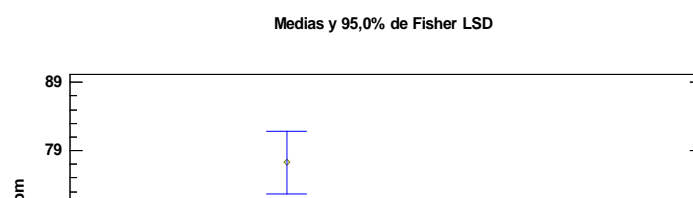
Los valores hallados de los parámetros microbiológicos en los establecimientos que cumplen con las buenas prácticas estarían por debajo de los límites establecidos por las legislaciones de países limítrofes como Paraguay y Brasil por lo que si se proponen incluir el análisis microbiológico de *E. coli* y de *Salmonella spp.*, propuestos por la comisión de expertos de la CONAL, en la legislación vigente, un alto porcentaje de los establecimientos cumpliría con los requerimientos establecidos, mientras que en el caso de *Bacillus cereus* se observa que el límite máximo fijado en el presente estudio de menor a 100 UFC/g condicionaría a las empresas que cumplen con las buenas prácticas de manufactura, de la misma manera que los límite máximos fijados por la comisión de expertos de la CONAL, con valores de  $10^2$  hasta  $10^3$  UFC/g., como podemos observar en la distribución de valores para *B. cereus* de la Figura 7.

## Asociación entre la implementación las Buenas Prácticas de manufactura en los establecimientos elaboradores de yerba Mate con cada uno de los microorganismos estudiados.

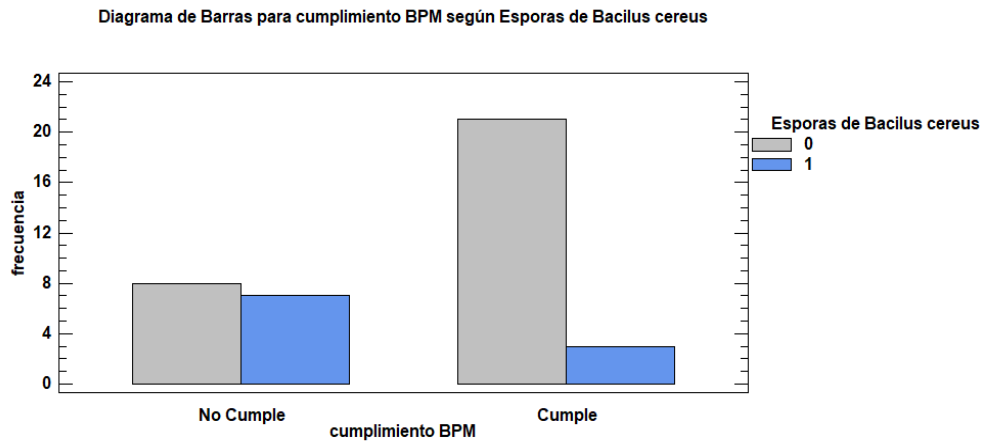
Se analizó la asociación que existe entre los microorganismos aislados esporas de *Bacillus cereus* y *E. coli*, y los criterios de B.P.M. evaluados en el acta, para los cuales los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico de Fisher para un intervalo de confianza del 95%, fueron para *Bacillus cereus*, P valor = 0,0235 ( $P < 0,05$ ), para *E. coli* P valor= 0,0251 ( $P < 0,05$ ), esto demuestra que para ambos microorganismos existe una correlación entre los valores sugeridos como referencia y el porcentaje de cumplimiento de las Buenas Prácticas de manufactura en los establecimientos inspeccionados. (Figuras 9 y 11 distribuciones de medias).



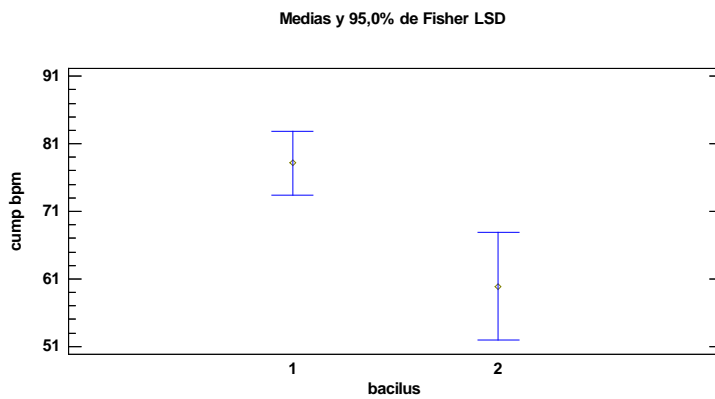
**Figura 3:** Cumplimiento de las B.P.M. y presencia de *E. coli* en muestras de yerba mate



**Figura 4:** Test de Fischer, distribución de medias para el cumplimiento de las B.P.M. y la presencia de *E.coli* en muestras de yerba mate



**Figura 5:** cumplimiento de las BPM y presencia de *B. cereus* en muestras de yerba mate.



**Figura 6:** test de Fisher, distribución de medias para el cumplimiento de las BPM y la presencia de esporas de *B. cereus* en muestras de yerba mate.



## Conclusión

Los resultados obtenidos permiten concluir que con la metodología utilizada para la determinación *Salmonella spp.*, no se detectó la presencia de esta bacteria. En el caso de *E. coli* y esporas de *Bacillus cereus* reflejarían que, sí existen las condiciones para su desarrollo, que podrían deberse a deficiencias en diferentes condiciones ya sea del proceso de elaboración, almacenamiento y/o manipulación de la yerba mate elaborada.

De acuerdo con lo observado en la distribución de los resultados, valores superiores a los límites establecidos para *Bacillus cereus* y para *E. coli* reflejarían

el incumplimiento de las buenas prácticas por parte de establecimientos elaboradores de yerba mate, por lo tanto, se podrían utilizar estos parámetros microbiológicos como indicadores de inocuidad e higiene.

Los resultados indican la importancia de analizar los parámetros microbiológicos de la yerba mate, con la posibilidad de evaluar los diferentes eventos o sucesos relacionados con el proceso de elaboración y del almacenamiento de las mismas.

Se observó la relación entre el uso del acta con los estándares y ponderaciones de los criterios microbiológicos establecidos en el estudio, por lo tanto, sería una adecuada herramienta de estimación del riesgo de la presencia de microorganismos relacionados a enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) en la Yerba mate.

## **Bibliografía**

1. Jerke G, Horianski MA, Bargardi S, Martínez ML. Análisis microbiológico en yerba mate compuesta Microbiological analysis in composite yerba mate. [cited 2017 Nov 25]; Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/recyt/n15/n15a01.pdf>
2. Kurtz V., Mayol. Evaluación de sistemas de cosecha de yerba mate. 2011 [cited 2017 Nov 25];149–52. Available from: [https://www.researchgate.net/profile/Miroslava\\_Rakocevic/publication/262904561\\_PHOTOSYNTHETIC\\_LIGHT-RESPONSE\\_CURVES\\_IN\\_YERBA-MATE\\_LEAVES\\_OF\\_DIFFERENT\\_AGES/links/553a44ce0cf2c415bb07763d/PHOT](https://www.researchgate.net/profile/Miroslava_Rakocevic/publication/262904561_PHOTOSYNTHETIC_LIGHT-RESPONSE_CURVES_IN_YERBA-MATE_LEAVES_OF_DIFFERENT_AGES/links/553a44ce0cf2c415bb07763d/PHOT)

OSYNTHETIC-LIGHT-RESPONSE-CURVES-IN-YERBA-MATE-LEAVES-OF-DIFFEREN

3. Mayol RM. La Experiencia ARgentina en sistemas de Poda de Yerba Mate. 1er Congr Sudam la yerba matell Reun Tec. 1997;337–50.
4. Escalada G, Brumovsky LA, Hartwig VG. Influencia de la zona de cultivo y procesamiento de la yerba mate sobre su contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante. Rev Cienc Tecnol / Año Rev Cienc Tecnol Año N° [Internet]. 2011 [cited 2017 Nov 25];13(15):66–74. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/recyt/n15/n15a10.pdf>
5. Castrillo ML, Tayagui AB, Jerke G. Calidad microbiológica de yerba mate canchada . Revista de Ciencia y tecnología [Internet]. 2012 [cited 2017 Nov 25];(17):30–3. Available from: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-75872012000100005](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872012000100005)
6. Wood W, González CE. Estudio de la ganancia de humedad de la yerba mate durante el estacionamiento Study of moisture uptake in yerbamate during the seasoning step. Cienc Tecnol / Año N° Rev Cienc Tecnol Año [Internet]. 2012 [cited 2017 Nov 25];14(17):25–9. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/recyt/n17/n17a04.pdf>
7. Prat Kricun SD. Yerba Mate.Guía para la Aplicación de Buenas Practicas Agrícolas Buenas Prácticas de Manufactura [Internet]. Cerro Azul: Araucaria Producciones SRL; 2008 [cited 2018 Dec 4]. p. 102. Available from: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-yerba\\_mate\\_guia\\_practicas\\_agricolas\\_manufact.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-yerba_mate_guia_practicas_agricolas_manufact.pdf)
8. Medim M. Yerba mate en Alimentos. Introducción, Técnica y Seguridad. 2007. 161 p.
9. Duce JA, Bordenave SA, Ybarra R. Investigación sobre la presencia de Bacillus cereus en Yerba Mate elaborada Analysis for the presence of Bacillus cereus in manufactured Yerba Mate. Cienc Tecnol / Año N° Rev Cienc Tecnol Año [Internet]. 2012 [cited 2017 Nov 25];14(17):5–8. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/recyt/n17/n17a01.pdf>
10. Bordenave, S.A1; Duce, J. A.; Ybarra LR. Calidad higiénico-sanitaria de yerba mate (Ilex paraguariensis) elaborada en saquitos. In 2011 [cited 2017 Nov 25]. p. 179–83. Available from: [https://www.researchgate.net/profile/Miroslava\\_Rakocevic/publication/262904561\\_P](https://www.researchgate.net/profile/Miroslava_Rakocevic/publication/262904561_P)

HOTOSYNTHETIC\_LIGHT-RESPONSE\_CURVES\_IN\_YERBA-  
MATE\_LEAVES\_OF\_DIFFERENT\_AGES/links/553a44ce0cf2c415bb07763d/PHOT  
OSYNTHETIC-LIGHT-RESPONSE-CURVES-IN-YERBA-MATE-LEAVES-OF-  
DIFFEREN

11. BERTÉ KADS. ESTABILIDADE DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) EM EMBALAGENS PLÁSTICAS [Internet]. [cited 2017 Nov 25]. Available from: <http://livros01.livrosgratis.com.br/ea000895.pdf>
12. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS [Internet]. [cited 2017 Nov 25]. Available from: <http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/ETA.pdf>
13. Marucci, R, S; Jerke, G; Naidich, A; Knass P. Micoflora presente en yerba mate envasada comercializada en la ciudad de posadas provincia de Misiones, Argentina. In: 2º Congresso Sul Americano da ErvaMate III Reuniao Técnica da Erva mate Encantado Brasil Publicado en Libro de resúmenes. 2000. p. 166.
14. Jerke, G; Horianski, M.A; Bargardi, S.; Salvatierra, K.A.; Juarez, M.G.; Cubill, M.A; Maidana, S.S.; Grandon, N.G.;Señuk I. Micoflora de yerba mate comercializada en su forma tradicional. X Congreso Argentino de Micología I Jornadas Argentinas de hongos en alimentos y micotoxinas; Buenos Aires Argentina. 2005;
15. Volumen MP. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS METODOLOGÍA ANALÍTICA OFICIAL [Internet]. 2011 [cited 2017 Nov 25]. Available from: [http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_vol\\_I.pdf](http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_I.pdf)
16. Alcalde María del Carmen, Cabrerea María Josefina. Análisis Microbiologico de los Alimentos . Metodología Analítica Oficial Volumen 2 [Internet]. 2013 [cited 2017 Nov 25]. Available from: [http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_vol\\_II.pdf](http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_II.pdf)
17. Oviedo H. PD (M. V. Intoxicación alimentaria y *Bacillus cereus* [Internet]. 1996 [cited 2017 Nov 27]. Available from: <https://dokumen.tips/documents/intoxicacion-alimentaria-y-bacillus-cereus.html>
18. Irasema M, Portuondo P. *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias *Bacillus cereus* and food poisoning. Rev Cuba Salud Pública [Internet]. 2012 [cited 2017 Nov 27];38(381):98–108. Available from: <http://scielo.sld.cu>
19. Al Día I, Rossi L, Watson D, Escandarani S, Miranda A, Troncoso A. [www.sochinf.cl](http://www.sochinf.cl)

- La radiación a la mesa Radiation on the dining table. [cited 2017 Nov 25]; Available from: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v26n4/art03.pdf>
20. A.N.M.A.T. Codigo Alimentario Argentino [Internet]. [cited 2017 Nov 25]. Available from: [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp)
  21. Raszi, Simone Morais Ore Nancy Diana Bejarano Cuellar, Juan A.Almeida CR. HACCP:Herramienta Escencial para la Inocuidad de Alimentos. Salud OP de la, Alimentos-INPPAZ IPa de P de A, Centro Latinoamericano y del Caribe Caribe de Informacion en Ciencias de la Salud., editors.
  22. ANMAT. DIRECTRICES PARA LA REALIZACION DE AUDITORIAS DE BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA A ESTABLECIMIENTOS DE ALIMENTOS ELABORADOS/INDUSTRIALIZADOS [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5]. Available from: [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp)
  23. ANMAT. DIRECTRICES PARA LA REALIZACIÓN DE AUDITORÍAS A ESTABLECIMIENTOS ELABORADORES DE ALIMENTOS LIBRES DE GLUTEN [Internet]. [cited 2018 Dec 5]. Available from: [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Publicaciones/Directrices\\_Auditoria\\_ALG.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Publicaciones/Directrices_Auditoria_ALG.pdf)
  24. RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC N°. [cited 2017 Nov 25]; Available from: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/anexo/anexo\\_res0277\\_22\\_09\\_2005.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/anexo/anexo_res0277_22_09_2005.pdf)
  25. Instituto Nacional de Tecnología N y M (INTN). NP 35 001 93. Yerba Mate Elaborada. Requisitos [Internet]. INTN; 2007. Available from: <http://normas.intn.gov.py/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=581>
  26. Parodi NB, Brignardello AE, Känzig RG, Florida CM, Linares RA. MercoSur: Analisis comparativo de la legislación de Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay Sobre yerba Mate comercializada. Rev Cienc Tecnol Año [Internet]. 2009 [cited 2017 Nov 25];11(11):14–9. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/recyt/n11/n11a03.pdf>
  27. Castrillo ML, Tayagui AB, Jerke G. Calidad microbiológica de yerba mate canchada. Rev Cienc y Tecnol [Internet]. 2012 [cited 2018 Oct 30];(17):0–0. Available from: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-75872012000100005&lang=pt](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872012000100005&lang=pt)
  28. IRAM 20517. Yerba mate canchada y yerba mate elaborada.Analisis Microbiológicos. 2007. 5-19 p.

29. Giberti. Las especies argentinas del género *Ilex* L. (Aquifoliaceae). 1979. 217-240. p.
30. MOSSEL DA. Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos. 2nd ed. 2003.
31. JAY JM. MICROBIOLOGÍA MODERNA DE LOS ALIMENTOS. ACRIBIA S.A. Z, editor. 2002.
32. Cañete LA, Beatriz A, Amada P. Estudio de la flora microbiana de la yerba mate durante las etapas de su elaboración. 2017;
33. Jerke G, Horianski MA, Salvatierra KA. Evaluación de géneros micotoxigénicos en yerba mate elaborada. Rev Cienc y Tecnol [Internet]. 2010 [cited 2017 Nov 25];(12):41–5. Available from: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-75872009000200007](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872009000200007)
34. Camargo De Moura T, Maria );, Machado A, De Fátima Guesser D. Avaliação da qualidade microbiológica da erva-mate chimarrão produzida e comercializada na cidade de Canoinhas-SC (1) [Internet]. [cited 2018 Nov 29]. Available from: <http://eventoscientificos.ifsc.edu.br/index.php/sepei/sepei2013/paper/viewFile/98/257>
35. Washington C. Winn, Stephen D. Allen, William M. Janda, Elmer W. Koneman, Gary W. Procop, Paul C. Schrenckenberger GLW. Koneman. Diagnóstico microbiológico. 2008.
36. 2010 | Argentina.gob.ar [Internet]. [cited 2018 Oct 30]. Available from: <https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/boletines2010>
37. Engo N, Fuxman A, González C, Negri L, Polenta G, Vaudagna S. Desarrollo de las exigencias sobre calidad e inocuidad de alimentos en el mundo (2025) [Internet]. 2015 [cited 2018 Dec 9]. Available from: <http://www.mincyt.gob.ar/adjuntos/archivos/000/041/0000041881.pdf>
38. Albiero Gabriela, Valente da Silva Patrícia da CM. Sanitary quality and diversity of culturable bacteria and yeasts in processed and in natura yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. Rev Bras Biociências [Internet]. 2015 Jun 23 [cited 2018 Dec 7];13(2). Available from: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3210/1277>
39. Sossela De Freitas RJ. ESTABILIDADE DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St.

Hill.) EM EMBALAGENS PLÁSTICAS [Internet]. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ; 2004 [cited 2018 Oct 30]. Available from: [http://www.ufrgs.br/alimentus1/objetos/ervamate/Arquivos/ervamate\\_kleberdissertacao.pdf](http://www.ufrgs.br/alimentus1/objetos/ervamate/Arquivos/ervamate_kleberdissertacao.pdf)

## TRABAJOS FUTUROS, PROPUESTA O RECOMENDACIONES A FUTURO

- Realizar la detección y la enumeración de presunto *Bacillus cereus* viable, en bajo número, por la técnica de número más probable (NMP) y método de detección en yerba mate y muestras ambientales de las áreas de producción por la técnica de número más probable (NMP) en muestras de alimentos ISO 21871:2006)
- Establecer el punto de mayor riesgo de contaminación con *Bacillus cereus* en la cadena de producción evaluando el recuento de este microorganismo a partir de la materia prima (hoja verde) y en cada uno de los pasos de su elaboración: Zapecado- Secado-Estacionamiento-. Molienda-Envasado.
- Realizar la detección y enumeración de *Bacillus cereus* en hierbas desecadas de producción artesanal que forman parte de la materia prima de las nuevas formas de consumo de yerba mate compuestas elaboradas en la provincia de Misiones.
- Determinar a partir de las cepas aisladas de *Bacillus cereus* la presencia de los genes que codifican para las enterotoxinas, como son la Hemolisina BL (HBL), la enterotoxina no hemolítica (NHE) por técnicas de Biología molecular (PCR).
- Comparación de las cepas aisladas en la yerba mate con cepas aisladas en humanos con el fin de establecer si existe una relación entre el consumo de yerba mate y la intoxicación con *Bacillus cereus*.



- Propuesta de incorporación de los criterios microbiológicos estudiados a la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) para su incorporación al código alimentario argentino (C.A.A.).
- Estudiar la probable presencia de alérgenos en la yerba mate durante la cadena de producción y en el producto terminado.
- Identificar la presencia de cepas patógenas de *Escherichia coli* aisladas en Yerba mate capaces de provocar diferentes enfermedades.

Acta N.º B 000004

**ACTA DE AUDITORÍA**

Fecha: ...../...../.....

Expediente N.º: .....

Establecimiento: .....  
 Domicilio (calle): ..... Localidad: ..... Tel.: .....  
 Propiedad de: ..... Correo electrónico: .....  
 Rubro: .....

Siendo las: ..... horas, constituido en el citado establecimiento, y siendo atendido por: .....  
 ..... D.N.I. N.º: .....  
 quien dice ser ..... de la Empresa, declara que la misma trabaja con los  
 siguientes alimentos: .....

1. DOCUMENTACIÓN					
	SI	NO	Nº	Fecha Alta	Observaciones
Habilitación Municipal					
R.N.C.					

**2. SUMINISTRO DE AGUA**

Procedencia: Red Pública  Perforación  Pozo  Otro  ..... Tanque / sistema SI  NO

	SI	NO	Frecuencia	Observaciones
Tratamiento adicionales				
Limpieza y desinfección de Tanque / sistema				
Registros de análisis microbiológicos				
Registros de análisis físico-químicos				

**3. SECTOR RECEPCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MATERIAS PRIMAS, INSUMOS Y ENVASES**

	A	NA	Puntaje	Observaciones
Paredes			0.5	
Piso			0.5	
Cespedes			0.5	
Techos			0.5	
Absorcion			0.5	
Proteccion contra ingreso de plagas			2	
Iluminacion			0.5	
Ventilacion			0.5	
Orden e higiene general			2	
Manual / Registros de Limpieza y desinfeccion			1	
Condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad)			2	
Registros de recepcion / graficos de rotacion			1	
Registros de temperaturas			1	
Subtotal:				

Mediciones in situ:

	A	NA	Temperatura medida <input checked="" type="checkbox"/> en cámaras/equipos							Observaciones
			1	2	3	4	5	6	7	
Nº de cámaras/equipos:										
Temperatura de Refrigeración										
Temperatura de Congelación										

Acta N.º B 000004

8. MANEJO DE RESIDUOS	A	NA	Puntaje	Observaciones
Recipientes			1	
Ubicación			1	
Disposición final			0.5	
Manual / Registro Limpieza y desinfección			1	
Subtotal:				

7. SECTOR SANITARIOS	A	NA	Puntaje	Observaciones
Paredes			0.5	
Piso			0.5	
Cespedes			0.5	
Techo			0.5	
Lavatorio de manos (agua, jabón líquido, toallas de un solo uso, cestas)			2	
Orden e higiene general			2	
Elementos de higiene en sanitario (papel higiénico, cestas)			2	
Manual / Registro Limpieza y desinfección			1	
Subtotal:				

8. SECTOR VESTUARIOS	SI	NO	Puntaje	Observaciones
Diagnóstico de residuos separados de los sanitarios?			1	
Rece de uso exclusivo dentro del establecimiento?			2	
Subtotal:				

9. PERSONAL MANIPULADOR DE ALIMENTOS	A	NA	Puntaje	Observaciones
Cantidad N.º <input type="text"/>				
Vestimenta (pertinente a las operaciones que realiza)			2	
Estado de salud e higiene personal			2	
Lavado de manos (verificar in situ)			0.5	
Curso de manipulador de alimentos			2	N.º
Libreta sanitaria vigente			1	N.º
Subtotal:				

10. MANEJO DE PLAGAS	A	NA	Puntaje	Observaciones
Signos de presencia de plagas			2	
Manual / Registro de Manejo Integrado de Plagas			1	
Registro de Fumigación/ desinfección.			0.5	
Subtotal:				

11. CONTROL DE CALIDAD	SI	NO	Puntaje	Observaciones
¿Existen controles de calidad de materia prima?			0.5	
¿Existen controles de calidad sobre el producto terminado?			1	
¿Existen registros de los controles de calidad?			0.5	
Subtotal:				

Puntaje total aplicable: \_\_\_\_\_ Puntaje total del Establecimiento: \_\_\_\_\_ Cumplimiento del Establecimiento: \_\_\_\_\_ %

CATEGORIZACION DEL ESTABLECIMIENTO, según Auditoría

Alto Riesgo (<40%)  Mediano Riesgo (40-70%)  Bajo Riesgo (>70%)

**CONCLUSIONES**

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Para constancia y de conformidad con el procedimiento seguido, las personas intervinientes en el mismo firman el pie de la presente acta, que consta de cuatro fojas, previa lectura de la misma, en original y una copia de igual tenor y a un solo efecto, quedando una en poder de la Empresa.

**Responsable de la Empresa**

**Auditor del Ministerio de Salud Pública**

.....  
 Firma

.....  
 Firma

.....  
 Aclaración

.....  
 Aclaración

Ante cualquier consulta, reclamo o trámite dirigirse a:  
 Dirección de Bienestar Ambiental - Ministerio de Salud Pública de Misiones

Av. Lavalle N° 5377, Posadas, Misiones ☎ (0376) 4451448 / 4456205 ✉ [masodivmisiones@gmail.com](mailto:masodivmisiones@gmail.com)

**Lev. Nacional N° 18.284**    **Decreto Nacional N° 2.126 /71**    **Lev. Provincial XVII N° 58**    **Lev. Provincial XVII N° 71**

Anexo 1:Acta de auditoria

Nº de aislamiento	Identificación	PCR HBL	PCR NHE
1	<i>Bacillus grupo cereus</i>	-	-
2	<i>Bacillus grupo cereus</i>	+	+
3	<i>Bacillus grupo cereus</i>	-	-
4	<i>Bacillus grupo cereus</i>	+	+
5	<i>Bacillus grupo cereus</i>	+	+
6	<i>Bacillus grupo cereus</i>	+	+
7	<i>Bacillus grupo cereus</i>	+	+
8	<i>Bacillus grupo cereus</i>	-	-
9	<i>Bacillus grupo cereus</i>	+	-
10	<i>Bacillus grupo cereus</i>	-	+
11	<i>Bacillus grupo cereus</i>	+	+
12	<i>Bacillus grupo cereus</i>	+	+
13	<i>Bacillus grupo cereus</i>	-	-
14	<i>Bacillus grupo cereus</i>	+	+
15	<i>Bacillus grupo cereus</i>	+	+
16	<i>Bacillus grupo cereus</i>	+	+
17	<i>Bacillus grupo cereus</i>	-	-
18	<i>Bacillus grupo cereus</i>		
19	<i>Bacillus grupo cereus</i>		
20	<i>Bacillus grupo cereus</i>		
21	<i>Bacillus grupo cereus</i>		
22	<i>Bacillus grupo cereus</i>		
23	<i>Bacillus grupo cereus</i>		
24	<i>Bacillus grupo cereus</i>		
25	<i>Bacillus grupo cereus</i>		
26	<i>Bacillus grupo cereus</i>		
27	<i>Bacillus grupo cereus</i>		
28	<i>Bacillus grupo cereus</i>		
29	<i>Bacillus grupo cereus</i>		
30	<i>Bacillus grupo cereus</i>		
31	<i>Bacillus sp. (no grupo cereus)</i>		
32	<i>Bacillus sp. (no grupo cereus)</i>		
33	<i>Bacillus sp. (no grupo cereus)</i>		
34	<i>Bacillus sp. (no grupo cereus)</i>		
35	<i>Bacillus sp. (no grupo cereus)</i>		
36	<i>Bacillus sp. (no grupo cereus)</i>		
37	<i>Bacillus sp. (no grupo cereus)</i>		
38	<i>Bacillus sp. (no grupo cereus)</i>		
38	<i>Bacillus sp. (no grupo cereus)</i>		
40	<i>Bacillus sp. (no grupo cereus)</i>		
41	<i>Bacillus sp. (no grupo cereus)</i>		
42	<i>Bacillus sp. (no grupo cereus)</i>		

**Anexo 2:** *Bacillus cereus* identificación

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

En la ciudad de ....., a los ..... días del mes de..... de Dos Mil....., por el presente documento perteneciente al proyecto **“Evaluación de parámetros microbiológicos de inocuidad e higiene en Yerba Mate elaborada en la provincia de Misiones”**, Laboratorio de Aguas y Alimentos. Dirección de Saneamiento Ambiental. Ministerio de Salud Pública de Misiones., el que suscribe..... DNI:..... (Participante) hace constar que presta su consentimiento en pleno conocimiento de sus actos, a partir de este momento, en el proyecto mencionado. Expresando también conformidad y autorización en su carácter de Director/a o responsable para permitir la actuación del equipo investigador a las instalaciones para poder llevar a cabo los estudios requeridos.

Por otra parte, se deja constancia que la participación es voluntaria y que se acuerda expresamente que:

a) Toda información sobre mi persona y/o equipo investigador, condiciones de trabajo que se obtenga con motivo de la investigación, así como el hecho en sí de la participación en el estudio serán estrictamente confidenciales,

b) En mi carácter de responsable de las actividades podré retirarme del proyecto en el momento que lo considere pertinente bajo mi exclusiva responsabilidad,

c) Toda modificación en las condiciones actuales del presente estudio, se me notificarán en un nuevo consentimiento informado.

La participación del suscripto implica la visita del equipo investigador a las instalaciones, para la realización de estudios. Absolutamente todos los gastos que la visita y estos estudios impliquen serán cubiertos por el equipo investigador.

El equipo investigador se compromete ante el participante a proporcionarle un informe con los resultados de los estudios y toda aquella información que contribuya al mejoramiento, y al requerimiento del participante de brindar un Asesoramiento y Capacitación.

**Ante cualquier duda, comentario o queja relacionada con la investigación, contactarse con:**

**Correo electrónico:**

**Teléfono:**

Por lo antes expuesto, y enterado/a debidamente del contenido del presente trabajo y comprendiendo toda la información precedente, a la cual se adjunta una copia del proyecto resumido en cuestión, se ratifica la participación en el proyecto y se firman dos copias de este documento, quedando una en poder del participante.

-----

Firma y Aclaración

Investigador: Firma y Aclaración