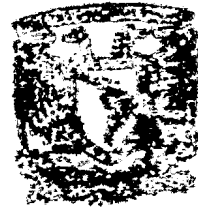




# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

## Clostridium botulinum Y SU IMPORTANCIA EN CARNES PROCESADAS.



### Trabajo Monográfico

EXAMENES PROFESIONALES  
DE QUIMICA

Que para obtener el Título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

JORGE MORALES MEZA

México, D. F.

1983



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE.

### CAPITULO I.- INTRODUCCION.

### CAPITULO II.- GENERALIDADES.

- 2.1 Esporulación.
- 2.2 Germinación.
- 2.3 Tipos de Esporas.
- 2.4 Género *Clostridium*.
- 2.5 *Clostridium botulinum*.
- 2.6 El Botulismo.
- 2.7 Formas de botulismo.
- 2.8 Toxina botulínica.
- 2.9 Actividad de la toxina botulínica.
- 2.10 Unidad tóxica.
- 2.11 Tipos de toxina.
- 2.12 Hemaglutininas botulinales.
- 2.13 Carnes y Productos Cárnicos.
- 2.14 Inhibición del *Cl. botulinum* en productos cárnicos.
- 2.15 Importancia Sanitaria.

### CAPITULO III.- CONCLUSIONES.

### CAPITULO IV.- BIBLIOGRAFIA.

## CAPITULO I.

### INTRODUCCION.

Cl. botulinum es un microorganismo que en condiciones adecuadas para su crecimiento forma toxinas que atacan al sistema nervioso central del hombre.

En productos cárnicos que no han sido debidamente elaborados, éste microorganismo puede crecer y formar toxinas causando serios problemas de salud llegando muchas veces a ser mortal, por lo que el estudio de sus características es importante para tomar todas las medidas necesarias para evitar su crecimiento. De ahí la importancia del estudio del Cl. botulinum y la gran dedicación de científicos para determinar día con día la acción de diferentes compuestos químicos capaces de inhibir el crecimiento botulínico. Dentro de estos destacan M.C. Robock (42), M.D. Pierson (43), C.S. Hickey (44), R.A. Semard (48), L.H. Christiansen (51), R.B. Tompkins (55) y muchas otras que han estudiado con mucho detalle la acción antibotulínica de muchos compuestos químicos como el nitrito de sodio, dióxido de azufre, sorbato de sodio, fenol y derivados fenólicos, ascorbato e isoascorbato de sodio, antioxidantes, etc.

Muchos de los compuestos estudiados rindieron buenos resultados pero quedando en algunos de ellos estudios pendientes para saber hasta que concentraciones son inocuas para el hombre.

Aumentando el conocimiento de Cl. botulinum, se han desarrollado varios trabajos donde se determinan las condiciones adecuadas para su desarrollo y producción de toxina, así tenemos al realizado por Greco y L.H. Arway (18) que se refiere al efecto de la temperatura sobre la germinación de esporas y crecimiento vegetativo de Cl. botulinum. S.H. Lee, P.G. Cassens y H. Sugiyama (29), estudiaron los factores que afectan la inhibición del Cl. botulinum en carnes curadas.

Existen siete variedades diferentes de Cl. botulinum que producen toxinas denominadas como: A, B, C, D, E, F y G. En los Estados Unidos los más comunes son los tipos A y B, los casos de botulismo debido al tipo E se registran con menos frecuencia. Los tipos C y D se han encontrado en caso de botulismo de animales.

Los datos sobre brotes, neonilados en los Estados Unidos registran, entre los años de 1899 y 1977, un total de 766 brotes que involucraron 1961 casos; de éste total 289 brotes con 680 casos ocurrieron después de 1949. La fatalidad de éstas intoxicaciones fué de un 50% para el período de 1960 a 1977. El tipo de toxina res-

ponsable de más del 50% de los brotes no se conoce, pero el 26% de éstas se debieron al Cl. botulinum tipo A, 8% al tipo B, 4% al tipo E, un brote fue debido al tipo F y 2 a la mezcla de las toxinas A y B.

Los brotes que incluyen mas casos son dos ocurridos recientemente: una en 1977 que causó intoxicación en 58 personas y otra en 1978 con 34 casos. (17)

El botulismo es una enfermedad mundial ya que se han reportado casos no solo en América sino también en Europa y Africa. En algunos países no se han reportado como sucede en México, pero se debe a que muchas veces no se conoce muy bien la enfermedad y no se diagnostica como tal, o porque la alimentación básica del pueblo no está sujeta al deterioro botulínico.

La importancia de éste trabajo radica en que es una recopilación de datos, los mas recientes sobre la inhibición del Cl. botulinum en carnes curadas, que en un momento dado pueden ser consultados y aplicar los conocimientos aquí desarrollados.

## CAPITULO II

### GENERALIDADES

#### 2.1 ESPORULACION.

Algunas bacterias pueden transformarse en pequeños ovoides o esferas, que son formas celulares muy resistentes denominadas esporas o endosporas, porque se producen intracelularmente, todas las especies de los géneros Bacillus y Clostridium se caracterizan, en parte, por su propiedad de producir esporas.

Las bacterias capaces de esporular pueden crecer y reproducirse en forma de células vegetativas durante muchas generaciones. Sin embargo, en cierto periodo del desarrollo del cultivo y en un medio requerido, se produce, dentro del citoplasma, la síntesis del nuevo protoplasma destinado a transformarse en espora. Se ha estudiado con gran detalle la anatomía de la espora en diversas fases de su formación, tomando micrografías electrónicas de secciones ultrafinas en algunas de dichos periodos, donde se ha podido apreciar que el protoplasma de la espora está rodeada de varias membranas o revestimientos.

Entre los caracteres específicos de la espora bacteriana, hay que considerar su constitución química. Todas las esporas contienen gran cantidad de ácido dipicolínico, como compuesto que no se encuentra en las células vegetativas. La presencia de éste ácido es restringida a las esporas, donde representa del 5 al 10% del peso total de la espora seca. También existe notable cantidad de calcio y se piensa que el calcio y el ácido picolínico forman un complejo que se localiza en las membranas exteriores de la espora. La síntesis del ácido picolínico y la absorción del calcio se realizan durante los periodos avanzados del desarrollo de la espora.

La espora madura, generalmente esférica u ovoide, solo representa una fracción del tamaño de la célula generatriz y presenta propiedades completamente diferentes a ésta, especialmente en lo que se refiere a la resistencia a los agentes físicos y químicos adversos.

Las bacterias de los géneros Bacillus y Clostridium producen una sola espora por célula, por consiguiente el proceso de esporulación no puede considerarse como un proceso de multiplicación. (15, 36)

El diámetro de la espora puede ser mayor o menor que el de la célula vegetativa, éste carácter citológico es útil para determinar e identificar las bacterias esporuladas.

Las esporas de diferentes especies bacterianas e incluso de diferentes cepas presentan una amplia variación en cuanto a su resistencia al calor y a otras condiciones adversas, en general las esporas bacterianas son mucho más resistentes al calor, antisépticos y otros bactericidas que las correspondientes formas vegetativas.

La esporulación aparece en células maduras al final de la fase logarítmica cuando comienzan a acumularse algunos productos y a desaparecer algunos nutrientes. Es inducida por determinadas sustancias químicas que aumentan primero el contenido de DNA después causan la formación de esporas y se ve favorecida por un intervalo reducido de pH, la presencia de oxígeno en las bacterias aerobias y su ausencia en las anaerobias, una temperatura más reducida que la que se requiere para el crecimiento, la presencia de ciertos iones metálicos especialmente Magnesio, la ausencia de inhibidores, un buen suministro de glucosa y la disponibilidad de nitrógeno.

Durante el proceso, la proteína celular se convierte en proteína de la espora y se forman proteínas especiales, también se forman complejos como ácido dipicolínico (DPA), glucosamina y ácido muráico.

## 2.2 GERMINACION.

La germinación en general se ve favorecida por las mismas condiciones que favorecen el crecimiento de las células vegetativas, pero puede tener lugar en condiciones que no permiten éste crecimiento como por ejemplo a bajas temperaturas. Es desencadenada por ciertas mezclas de aminoácidos como ejemplo L-alanina-adenosina-L-cisteína o valina, por los iones magnesio y manganeso, glucosa, ácido dipicolínico en presencia de iones calcio y choques térmicos o activación por el calor de enzimas latentes.

La latencia de las esporas ha sido definida como una germinación retardada que se produce cuando las condiciones son favorables para ella, sin embargo, lo más probable es que las esporas dejen de germinar a causa de condiciones desfavorables como la presencia de inhibidores en el medio o la falta de algún nutriente.

Algunas esporas pueden germinar pero no crecer; el calor, las radiaciones y otros agentes pueden dañarla de tal modo que precisen de un medio más comple-

jo o especial para su desarrollo. Se han observado germinaciones diferidas desde unos días hasta muchos meses, para Cl. botulinum como ejemplo de 15 días a 72 meses. (15, 18, 36, 53).

### 2,3 TIPOS DE ESPORAS.

Tres tipos de esporas fueron observadas por el microscopio de contraste de fase durante la germinación.

Fase brillante: esporas no germinadas.

Fase variable: esporas parcialmente germinadas.

Fase oscura: esporas totalmente germinadas.

Las esporas de la fase variable fueron distinguidas de las esporas de la fase brillante y de la fase oscura por una pérdida parcial de refractabilidad en el centro de la espora y por una apariencia distinta a la fase oscura en la periferia de la espora. Fueron fase variable o son parcialmente fase oscura y en este sentido fueron asumidos como parcialmente germinado. En contraste las esporas totalmente germinadas aparecieron uniformemente con una fase oscura al centro y en la periferia.

La conversión inicial de las esporas de la fase brillante a la fase variable ocurrió de acuerdo a dos tipos de patrones diferentes.

El primer patrón figura 1, se efectuó con esporas incubadas a una temperatura de 4 a 14°C, la figura muestra la germinación a 9°C el óptimo aparente para la germinación de esporas, un número de esporas perdieron su aparente fase brillante durante las primeras 5 horas. (18).

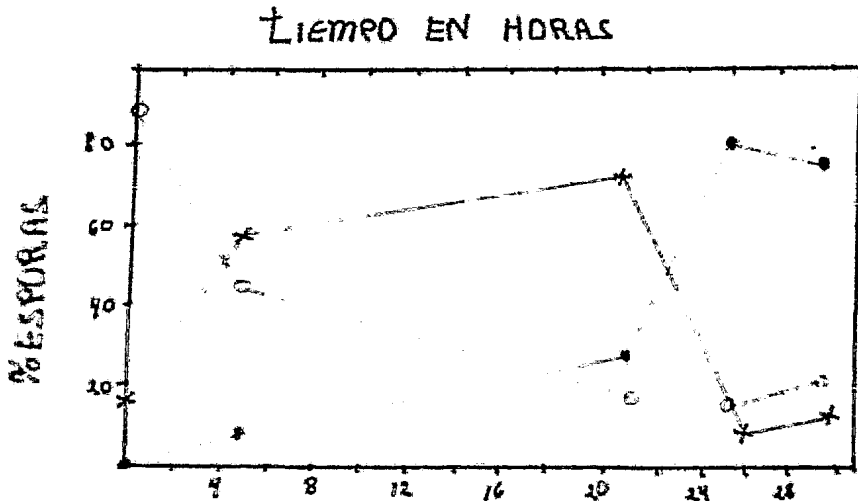




FIGURA 1. Germinación de esporas de Cl. botulinum tipo E. Serotipo VII a 9 °C en caldo TPGT.

O.- esporas fase brillante.

X.- esporas fase variable.

●.- esporas fase oscura.

El segundo patrón figura 2, fué caracterizado por la pérdida lineal de la cinética inicial de la fase brillante, se ilustra aquí la germinación a 2°C.

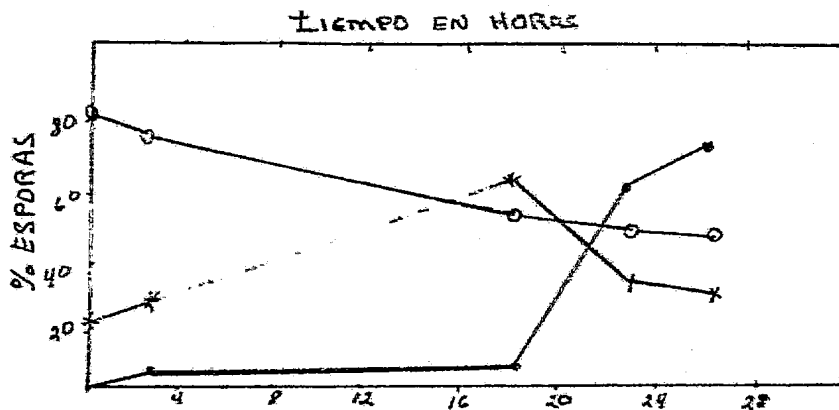


Figura 2. Germinación de esporas de Cl. botulinum tipo E serotipo VII a 2°C en caldo TPGT.

O.- fase brillante.

X.- fase variable.

●.- fase oscura.

La figura 3A describe la primera pérdida observable de la presencia de la fase brillante de las esporas. El primer cambio señala la iniciación de la germinación. En todas las temperaturas de incubación, la iniciación de la germinación comienza inmediatamente después de la adición de las esporas al medio de cultivo. A 4, 9 y 14°C hay un declive rápido inicial en el número de esporas en la fase brillante o no esporulado, que pareció disminuir después de 5 a 6 horas de incubación. A estas 3 temperaturas el número de esporas restantes en el estado de fase brillante se encuentra entre 14 y 29% después de 23 horas de incubación, comparado con un 81 al 91% que era al comenzar la germinación.

Por otro lado a 2°C así como a 37°C el número de esporas en la fase brillante descendió de manera gradual en línea recta durante un periodo de incubación de 21 a 26 horas. El número restante en la fase brillante después de 19 horas fué de 50 a 55% comparado con un 80 a 84% al comenzar la germinación.

A 50°C la pérdida de la fase brillante tiene también una velocidad lineal, sólo que a ésta temperatura el proceso fué extremadamente rápido y es completada en 2 horas, con un restante de esporas en la fase brillante de un 40%.

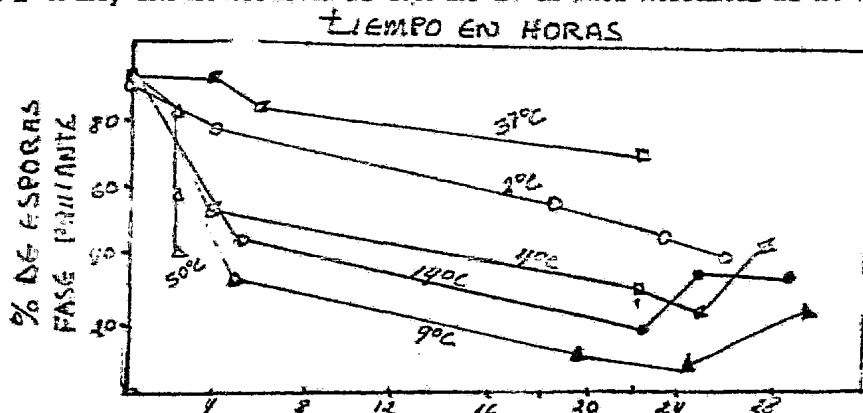


Figura 3A. Pérdida de la apariencia de la fase brillante de las esporas a diferentes temperaturas.

La figura 3B muestra el paso intermedio en la germinación de esporas. A varias temperaturas de incubación exceto a 50°C, se observa un número máximo de esporas parcialmente germinadas en 18 a 20 horas de incubación. Durante éste período de incubación el número de esporas parcialmente germinadas desciende rápidamente porque se convierten en esporas totalmente germinadas.

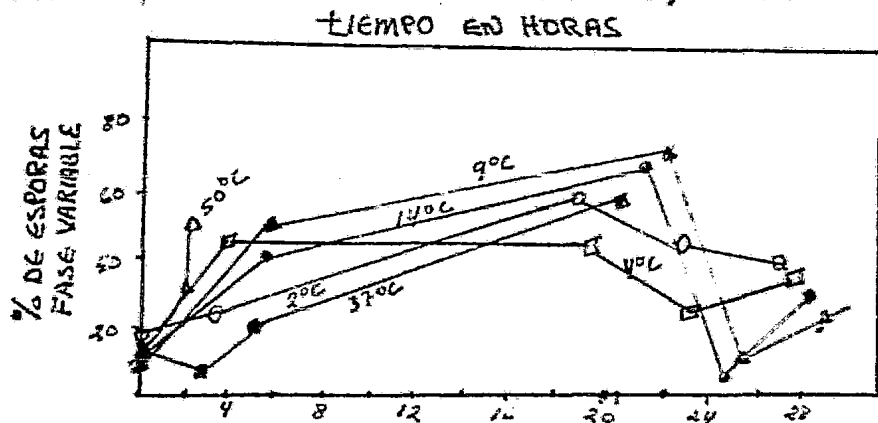


Figura 3B. Paso intermedio en la germinación de esporas a diferentes temperaturas.

La figura 3C nos muestra el paso final de la germinación o sea la fase obscura, esporas germinadas totalmente. En todas las temperaturas de incubación exceto a 50°C, las esporas totalmente germinadas no exceden el 38% durante una incubación inicial de 18 a 21 horas, después el número de esporas totalmente germinadas aumenta 4 veces, pareciendo dar 90°C la temperatura óptima para el paso final de la germinación.

Es importante conocer los límites de temperatura para la germinación ya que para que haya un crecimiento se requiere antes una germinación.

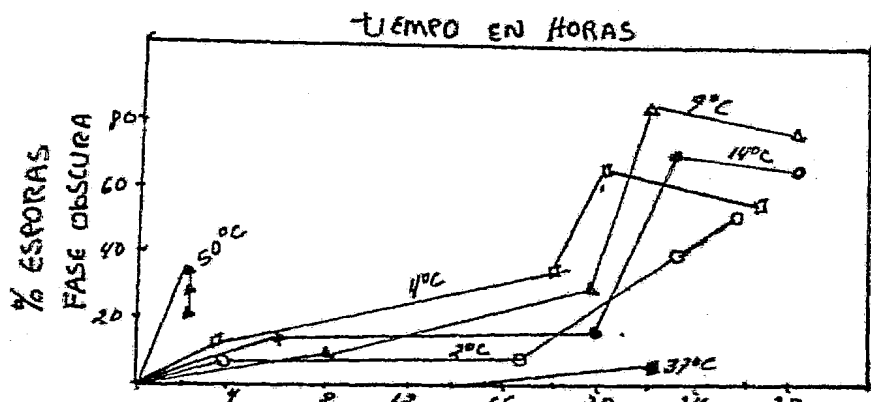


Figura 3 C. Paso final en la germinación de esporas de Cl. botulinum tipo E serotipo VII a diferentes temperaturas.

#### 2.4 GENERO Clostridium.

Son bacilos Gram (+), la longitud de las células individuales varía de 3 a 8 micras, son bacilos rectos o encorvados que se presentan aislados, en parejas o en cadenas. Las formas vegetativas ofrecen gran pleomorfismo y por lo consiguiente la diferenciación morfológica no es muy exacta.

La mayor parte de las especies no crecen en presencia de oxígeno, aunque algunas especies presentan un crecimiento débil en condiciones aerobias. Para su crecimiento no es necesario eliminar el oxígeno del medio de cultivo, porque puede establecerse condiciones anaerobias adecuadas despegando en el medio un potencial bajo de REDOX. Esto se consigue incorporando sustancias reductoras como sulfitos, ácidos grasos no saturados, ácido tioglicólico y otros productos. Por esta razón Clostridium y otros microorganismos anaerobios crecen bien en los medios de carne cocida que contienen ácidos grasos no saturados y en general conuestos que poseen el grupo sulhídrico (-SH).

El CO<sub>2</sub> es necesario para el crecimiento de los microorganismos anaerobios y las concentraciones hasta del 10% exaltan su desarrollo. (15, 36).

La mayoría de las especies de este género crece mejor a una temperatura de 37°C, pero la escala de temperatura que toleran abarca un gran rango. La concentración óptima de iones hidrógeno para el crecimiento de las células es de un pH aproximado de 7 a 7.4.

Todas las especies con excepción del Cl. perfringens se mueven por flagelos peritricos. Cl. perfringens forma cápsula. Algunas especies son patógenas y muchas otras se encuentran como saprófitas en el suelo y en el intestino del hombre y de los animales.

La mayoría de las especies hidrolizan las proteínas, fermentan carbohidratos y muchos producen exotoxinas. Sobre las placas de agar nutritivo, éstas células crecen pobremente formando colonias que se extienden en película. Las placas de agar-sangre son más convenientes para su cultivo, porque en ellas desarrollan algunas especies colonias características y producen zonas de hemólisis específicas. También en agar-glucosa forman colonias características.

Los tipos proteolíticos licúan el suero coagulado o los medios de huevo coagulado, mientras que las especies sacarolíticas crecen en éstos medios sin licuar las proteínas coaguladas. La fermentación sobre los azúcares es útil para la diferenciación de las especies.

Muchas especies son sacarolíticas y fermentativas y producen principalmente ácido butírico y algunas son proteolíticas, se ha comparado que la relación entre los gases  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$  formadas en los medios exentos de hidratos de carbono es útil para diferenciarlos.

Proteolítica: proporción alta de  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2$ .

Sacarolítica: proporción baja. (15, 36).

Pueden ser mesófilos o termófilos, proteolíticas o no. Cl. thermosaccharoliticum es un ejemplo de termófilo obligado sacarolítico, determina la alteración gaseosa de las conservas vegetales.

La putrefacción de los alimentos es a menudo ocasionada por especies mesófilas proteolíticas tales como Cl. lentovirescens y Cl. nitrofaciens.

El rompiamiento violento de la cuajada de la leche ocasionada por Cl. sporogenes o especies semejantes da lugar a una fermentación tumultuosa. Cl. tyrobutyricum o butyricum, que fermentan los lactatos, determinan la producción tardía de gas en quesos curado.

Todas las especies producen esporas cuando se encuentran en condiciones adversas, la localización de la espora en la célula (central, subterminal o terminal) es un carácter bastante constante de cada especie. Como las esporas son por lo general de mayor diámetro que la célula vegetativa originaria, los bacilos es

populadas adoptan formas curiosas, de palo de tambor, raqueta de tenis.

La fuente principal de Clostridium la constituye el suelo, pero puede encontrarse en esilados en malas condiciones piensos y estiércol.

### 2.5 Clostridium botulinum.

Es un bacilo Gram (+) que puede presentarse aislado y algunas veces en parejas o en cadenas cortas y miden aproximadamente de 0.6 a 0.8 micras por 4 a 6 micras con los lados paralelos y los extremos redondos.

La temperatura óptima de crecimiento es de 25°C pero también crece favorablemente entre 20 y 35°C. Se mueve por medio de 4 a 8 flagelos peritricos y no forman cápsula.

Crece bien en los medio de cultivo corrientes en condiciones estrictamente anaerobias. En los medios con carne cocida desarrollan olor fétido con formación de burbujas y la aparición de un precipitado, también desprenden H<sub>2</sub>S.

Las conservas caseras de hortalizas así como los encurtidos y las carnes en latadas constituyen un buen medio de crecimiento de C.l. botulinum y la producción de toxina.

Algunos autores distinguen 2 tipos de C.l. botulinum:

C.l. parabotulinum, que digiere la albúmina de huevo (ovolítico).

C.l. botulinum, que no la digiere.

Ambos producen toxinas que comprenden 7 serotipos antigénicos diferentes: A, B, C, D, E, F, y G que sólo se neutralizan por sus exotoxinas de tipo específico. Los serotipos de los bacilos botulínicos se definen generalmente según el tipo de toxina que producen.

Todos son catalasa positivos, fermentan activamente los carbohidratos con producción de ácidos y gases. Todos los serotipos fermentan la glucosa y la maltosa con formación de ácido y gas y licúan la gelatina. Algunos producen ácido y gas con la lactosa, salicina y glicerina.

Como se mencionó anteriormente el rango de temperatura para la germinación y crecimiento abarca un trecho grande entre especies y aún entre serotipos de C.l. botulinum. Tal como C.l. botulinum tipo E que es asociado generalmente con medios fríos porque ha sido separado de varios productos marinos en regiones heladas del mundo, incluyendo Alaska, Norte de Japón, Canadá, etc. Sin embargo éste organismo ha sido encontrado también en regiones tropicales y templadas.

El organismo reportado por Nicholas y Livia (18) tuvo un óptimo de crecimiento de 35°C y un crecimiento máximo a 45°C, sobre éstas base se le designó como un organismo mesófilo. Por otro lado Cl. botulinum tipo A y B crece mejor a 40°C. Esta pequeña diferencia en crecimiento óptimo entre Cl. botulinum tipo E y los tipos A y B probablemente no tienen un significado decisivo con respecto al hábitat natural del Cl. botulinum tipo E de desarrollarse a temperaturas de las áreas heladas del mundo. Lo que es más significativo es la habilidad de crecer a temperaturas menor de 10°C que son generalmente inhibitivos para los tipos A y B.

Esta ampliamente documentada la habilidad del Cl. botulinum tipo E de crecer a temperaturas relativamente bajas. Ohge y Scott reportaron que 10 serotipos de tipo E fueron capaces de crecer a temperaturas entre 5 y 10°C, en contraste al Cl. botulinum tipo A y B que no se desarrollan a estas temperaturas. Subsecuentemente Dolman et. al. reportaron crecimiento y producción de toxina por Cl. botulinum tipo E serotipo VII (Vancouver Herring) a 6°C. Más tarde Schmidt et. al. reportaron que la temperatura mínima para el crecimiento de 4 especies del tipo E fue tan bajo como 3.3°C, aunque se tarda de 30 a 60 días para que se produjeran cantidades detectables de gas y toxina. La importante implicación de esto es que entonces el Cl. botulinum tipo E es capaz de desarrollarse a temperaturas típicamente utilizadas para la refrigeración de los alimentos, 3.3°C. Estos alimentos incluyen a productos de origen marino y que se sabe que frecuentemente llevan esporas de Cl. botulinum tipo E. (18).

Las esporas son ovóides y subterminales, sólo ligeramente anchas que alteran la forma de la célula, estas esporas son muy resistentes a la acción del calor y en los preparados alimenticios que no están debidamente elaborados, pueden conservar su vitalidad y germinar más tarde. (50).

## 2.6 EL BOTULISMO.

Es una intoxicación alimenticia producida por la ingestión de alimento que contienen la exotoxina del Cl. botulinum, producida durante su crecimiento en los alimentos. La especie humana es tan sensible al botulismo que si hay toxina en cantidad apenas perceptible en un alimento, todos los que lo ingieren se ponen enfermos y el comer una pequeña cantidad de alimento como unos pocos quismitos o una judía verde, puede causar la enfermedad y hasta la muerte.

Los síntomas típicos del botulismo aparecen por lo general entre las 12 y 36 horas, aunque pueden requerirse períodos más largos o más cortos. Los primeros síntomas suelen consistir en trastornos digestivos agudos, seguidos por náusea y vómitos e incluso diarrea, al mismo tiempo que fatiga, dolores de cabeza y desvanecimiento, más tarde aparece estreñimiento. En los primeros momentos puede ya presentarse doble visión y con frecuencia resulta difícil hablar o trazar sencilla. Los pacientes se quejan de tener la boca seca y la garganta contraída, y la lengua se hincha. La temperatura del enfermo es normal o inferior a la normal. Los músculos involuntarios sufren parálisis, extendiéndose ésta hasta el aparato respiratorio y al corazón. La muerte suele producirse por fallo respiratorio. Los síntomas son parecidos en las intoxicaciones por los tipos A, B y E, aunque las náuseas, vómitos y retención de orina suelen ser más graves con la toxina del tipo E. En los casos fatales, la muerte sobreviene en general de 3 a 6 días después de la ingestión del alimento contaminado.

## 2.7 FORMAS DE BOTULISMO.

La toxina que causa el botulismo puede ser adquirida por una de las 3 formas siguientes:

**Alimentos contaminados.** Es el botulismo clásico que se conoce y es debido principalmente por la toxina que está formada y que se ingiere con los alimentos.

**Botulismo infante.** que puede ser la forma más común de botulismo, la toxina es producida en vivo durante el crecimiento del organismo dentro del intestino humano.

**Botulismo de herida.** También es causada por la toxina formada en vivo, pero en éste caso por la contaminación de una herida con el microorganismo. (23, 37).

### 2.7.1 ALIMENTOS CONTAMINADOS.

Sin duda, algunos brotes debido a alimentos contaminados, particularmente aquellos que ocurrieron mucho tiempo antes no han sido registrados en la compilación de brotes o epidemias en los Estados Unidos, pero listas record nos indican que en el período de 1899 a 1977 se registraron 766 brotes envolviendo un total de 1954 casos. De éstos brotes 289 ocurrieron después de 1949 con 680 casos. La mortalidad en todas los brotes fue del 5% que disminuyó a un 1% para el período de 1960-1977.

El tipo de toxina responsable de más del 50% de los brotes no es conocido, pero el 26% de los brotes fueron debidos al tipo A, 8% al tipo B y 4% fueron debidos al tipo E. Una fue debido al tipo F y 2 a una mezcla de las toxinas tipo A y B.

La incidencia del botulismo en otros países está demostrado por los reportes de éste, en la India, Argentina y Kenya considerándose una enfermedad mundial. La aparente rareza del botulismo en ésta áreas puede ser porque la enfermedad no es conocida, porque no se han reportado o porque los alimentos usados para la población no son sujetos a deterioro botulínico.

### 2.7.2 BOTULISMO DE HERIDA.

Es el más raro de los casos de botulismo con solamente 18 casos que se recuerda desde 1977. Esta enfermedad resulta cuando Cl. botulinum por sí mismo o con otros microorganismo infecta una herida y produce toxina, que alcanza otras partes del cuerpo vía sanguínea. Una lesión local distingue éste botulismo del de los alimentos contaminados, pero los efectos neurológicos son comparables. Solamente han sido reportados casos del tipo A y B.

### 2.7.3 BOTULISMO INFANTE.

La prueba clínica definitiva sobre botulismo infante fue obtenida en 1976 cuando Cl. botulinum y/o su toxina fue demostrada en las heces de infantes que sufrían constipación y debilidad neuromuscular más de 100 casos han sido reportados, sólo 2 casos de muerte y muchos hubieron ocurrido de no ser por el auxilio de emergencia respiratoria. La enfermedad ocurre a nivel mundial ya que se ha reportado en Inglaterra, Australia y Canadá. Han sido reportado casos del tipo A y B.

El botulismo infante ganó significancia con la posibilidad de un versión fulminante, quizás uno de los casos de un síndrome de muerte súbita en infantes. Entre los especímenes de 211 casos de muerte súbita, el contenido de los intestinos de 9 infantes contenían Cl. botulinum y 2 de éstos tuvieron también la toxina homóloga. Excepto por un caso que engloba a 35 niños de 35 semanas de edad, el botulismo infantil ha ocurrido solamente en niños de 3 a 26 semanas de edad, (edad promedio 10 semanas).

Los casos del tipo A son un poco más frecuentes que los casos del tipo B. Ambos son epidemiológicamente diferentes. Se han visto casos en niños alimentados



con fórmula alimenticia, o sólo con leche o en infantes alimentados con algún sustituto de leche, implicando entonces que no se puede atribuir al alimento la causa de la enfermedad.

La presencia de Cl. botulinum y su toxina en las heces de infantes con enfermedad o convalescientes, indican que la enfermedad es una toxi-infección en la que el microorganismo coloniza al organismo y produce la toxina en el tracto intestinal. El microorganismo es adquirido por digestión de éste siendo la forma esporulada probablemente la forma infecciosa.

El concepto de que Cl. botulinum puede multiplicarse intraintestinalmente no es nuevo, en 1910 investigadores rusos sugirieron que los alimentos contaminados contribuyen para que la toxina se formará en vivo, pero la idea no fué aceptada en general porque se supuso que el dato fué obtenido por un proceso inadecuado. Este escepticismo desapareció con el más reciente descubrimiento del organismo y su toxina en el intestino de un convalesciente 32 días después del principio de la enfermedad.

Hasta ahora no hay pruebas que adultos desarrollen botulismo por la ingestión de alimentos tales como vegetales mal conservados que pueden ocasionalmente acarrear Cl. botulinum pero no la toxina.

Los resultados obtenidos con modelos de rata y ratón sostienen la proposición de que el botulismo infante en humanos tiene bases microbiológicas ecológicas. La microflora intestinal de individuos adultos probablemente incluye una o más especies que actuando independientemente o en conjunto previenen el crecimiento de Cl. botulinum. Los infantes son susceptibles porque los microorganismos antibotulínicos que obstaculizan el desarrollo no han sido desarrollados o son fácilmente desplazados, infantes menores de una semana de edad no pueden ser infectados, esta resistencia es debida a factores que no envuelven a la bacteria.

De los alimentos conocidos con que han sido alimentados los infantes que desarrollaron botulismo, la miel es la única donde ha sido encontrado Cl. botulinum. Un estudio de muestras de muchas partes de los Estados Unidos revela que éste organismo puede ser encontrado probablemente en la miel producida en varios estados (33, 51, 59).

## 2.ª TOXINA BOTULÍNICA.

Hasta antes de 1945 poco se conocía de la naturaleza química de la toxina de Cl. botulinum, en ese entonces se sospechaba que -

eran proteínas. Hoy existen métodos suficientemente avanzados para la purificación de toxinas y se ha demostrado que son simples proteínas globulares, compuestas exclusivamente por aminoácidos. Las moléculas de toxinas en solución en un campo eléctrico, presentan el fenómeno de electroforesis, el cual consiste en la separación de aminoácidos que se lleva a cabo al poner una gota de la mezcla que se desea identificar en un papel filtro adecuado, que se humedece con una solución reguladora de pH determinado, los extremos de la hoja se sumergen en los recipientes que contienen los electrodos y se aplica un campo eléctrico de voltaje elevado. Debido a sus diferentes valores de pH, los aminoácidos emigran en diferentes direcciones que dependen del pH del sistema y de la fuerza electromotriz aplicada.

Es complicado el efecto de las toxinas botulínicas cuando son venenos orales el hecho es que las toxinas son proteínas típicas las cuales pasan con el bolo alimenticio. Desde los reportes antiguos de la literatura se sabe que las toxinas botulínicas son resistentes a la detoxificación por enzimas proteolíticas, en algunos trabajos recientes, con técnicas adecuadas a los números de animales utilizados en el experimento, los tipos de toxina "H" varían en manera, como muestra la capacidad de detoxificación por tripsina, enzima del intestino delgado.

Los resultados con pepsina han sido conflictivos, con la toxina tipo "E", la tripsina ha actuado como agente activador. El mecanismo de este fenómeno de activación aún no está claro; algunos científicos japoneses han declarado que la acción de la toxina tipo "E" está asociada de alguna manera con el ADN y que después de su activación con la tripsina, la fracción tóxica se separa de su componente nucleico. Este reporte subraya que existen algunos descubrimientos experimentales que corroboran esta declaración. En este experimento las preparaciones tóxicas fueron purificadas antes y después de su activación trípica, y se comprobó que estaban libres de ADN. El contacto en vivo de esta toxina con la tripsina lleva a un incremento inicial en el número de dosis parenterales letales, seguidas de un decremento.

La toxina botulínica puede pasar igual que un veneno oral porque se absorbe después de entrar al intestino delgado. El atractivo de esta hipótesis ha disminuido ya que la absorción ocurre en un grado significativo en el estómago, donde la toxina puede exponerse sólo a la pepsina.

No hay estudios críticos que definan las posibilidades de que el faringeo y el esófago actúen en mejor forma que la absorción sistémica que se ha reportado, dado que una demostración puede ayudar a explicar los reportes del botulismo

que han ocurrido en humanos antes de la mera prueba de sabor con alimentos contaminados.

Se conoce que la toxina puede absorberse en bajo nivel por efectos respiratorios, caso sólo por una delgada capa de las células epiteliales y através de abrasiones y quemaduras en la piel y las membranas mucosas, tal vez como la saliva y la posibilidad de alguna caries dental que permite la absorción de toxina después del contacto con algunas enzimas proteolíticas cuando ocurre el acto alimenticio.

En base a las evidencias publicadas, el intestino del ado puede considerarse como el mejor sitio de absorción sistemática en los casos naturales de envenenamiento por ingestión de toxinas. El estómago y el colón son sitios de menor absorción, de donde se concluye que la ingestión de toxina parece tener muchas oportunidades por contacto con las enzimas proteolíticas.

En vivo la velocidad de detoxificación decrece con el tiempo y cuando la reducción de la toxicidad tiende a cero lleva a una aproximación asintótica. Estas correlaciones se han repetido en vivo; en relación a las proteínas, tales como la caseína, las enzimas proteolíticas actúan más lentamente cuando el sustrato es una toxina tipo "A". Estas observaciones implican que la toxina no es necesariamente resistente a la proteólisis enzimática en un sentido absoluto, como para actuar como un veneno oral. Esto es necesario sólo cuando la velocidad de digestión de la toxina, después de la completa distribución, puede llegar a una dosis letal y pasar las barreras del conducto alimenticio. Es también posible que se conozca la diferencia en potencia de dosis oral de varios tipos de toxina en una especie dada de animal, o la dosis oral de un tipo de toxina en diferentes especies y se puede reflejar las diferencias en resistencias de varios tipos de toxina a los jugos digestivos de diferentes especies de animales. Un ejemplo es la no susceptibilidad del mono *Rhinus* (macaco de la India) a las toxinas "C" y "D" administradas oralmente.

Hasta el momento la producción de toxina de *C. botulinum* está asociada con la presencia de ciertos bacteriófagos específicos. En 1968, obtenido de la Universidad de Sarrebo Jorón, demostró la incidencia de ciertos fagos en la formación de la toxina de *C. botulinum* tipos 1, B, C, D, y F utilizando como medio 0.1% de Lioalicolato de so'lo, 2% de tricalcase, 2% de extracto de levadura y 1.0% de glucosa.

## 2.9 ACTIVIDAD DE LA TOXINA BOTULÍNICA.

La actividad de la toxina botulínica ha sido estudiada con bastante detalle, se ha visto que la acetilcolina produce contracción en el músculo intoxicado por toxina botulínica, y esto no lo hace cuando la intoxicación es con curare. Este hecho se ha interpretado como indicio de que no se produce acetilcolina en las placas terminales del animal envenenado, que la acción de la toxina es de localización proximal en relación a donde ésta se produce. De acuerdo con lo anterior se piensa que no se libera acetilcolina durante la parálisis neuromuscular producida por la toxina. El sitio de acción de la toxina es la fibrilla nerviosa, ya que libera acetilcolina después de estimular directamente el diafragma aislado del cobayo; la parálisis neuromuscular que ocurre en el animal envenenado resulta de interferencia con la conducción en ramas terminales de los nervios motores en los puntos de ramificación terminal o cerca de ellos pero proximales con relación al lugar donde se libera acetilcolina. Sin embargo, se desconoce completamente la naturaleza de la actividad de la toxina que produce la interferencia en la conducción. Actúa junto al lugar de la liberación de la acetilcolina en la extremidad del axón, o sea por impedir la síntesis o por impedir la liberación. La acetilcolina es el mediador natural o estimulante de las terminaciones postganglionares parasimpáticas y es también el transmisor en los ganglios en la unión neuromuscular.

Los efectos generales producidos para la estimulación parasimpática con la liberación natural de la acetilcolina, incluye la contracción de las vísceras, salivación, bradicardia, broncoconstricción, aumento de la peristalsis y dilatación de los vasos esféricos. (49, 52).

## 2.10 UNIDAD TOXICA.

La unidad más simple de toxina es la dosis mínima letal (DML), que viene a ser la cantidad de toxina que mata a un cobayo de 250 gramos de peso en un período de 96 horas después de una inyección subcutánea.

Las unidades de antitoxinas varían en los diferentes países, y esto ocasiona confusión, así se está tratando de evitar mediante los intentos por establecer unidades internacionales que paulatinamente será adoptadas por todos los países.

## 2.11 TIPOS DE TOXINA

### 2.11.1 TOXINA TIPO "A".

Es la sustancia tóxica más potente conocida. Esta toxina se ha preparado en forma cristalina mediante precipitación alcohólica en frío y por precipitación con sulfato de sodio ácido. Las preparaciones parecen ser de proteínas puras con las propiedades de una globulina de peso molecular de 9 a  $11 \times 10^5$ . La  $LD_{50}$  para ratón contiene  $4.5 \times 10^{-9}$  mg de  $H_2$ . Se ha supuesto que la toxicidad puede ser propiedad de un grupo prostético unido a la molécula de la proteína, pero esto no parece ser cierto; Los datos conocidos indican que la toxicidad es una propiedad de la estructura de la molécula de la toxina, posiblemente de la disposición de los aminoácidos constituyentes de la proteína, 200 gramos de esta toxina serían suficientes para matar a toda la población del planeta.

Lazanna y colaboradores en 1946 determinaron el peso molecular de esta toxina 970,000 además comprobaron que era un complejo de unidades orgánicas, lo cual ha sido confirmado por Stefani y colaboradores, quienes encontraron una unidad con histidina de peso molecular 15,400 otra con cistina de 27,400 y una tercera con cisteína de 36,100.

Marshall y quin encontraron que la toxina tipo A reduce 7 inhibiciones definidas reproducibles de la acetilcolinesterasa. La inhibición de la enzima se evita eficazmente por la antitoxina homóloga.

Esta toxina es 15 veces más tóxica que la aconitina, el medicamento más tóxico conocido. La  $LD_{50}$  por gramo es de  $2.4 \times 10^{-8}$ . La toxina es una proteína del tipo de las globulinas que no se destruye por las enzimas proteolíticas ordinarias, lo cual explica porque su ingestión es tóxica, pero se destruye por calentamiento a  $5^{\circ}C$  durante 30 minutos.

### 2.11.2 TOXINA TIPO B.

Esta toxina es menos volátil que la toxina tipo A. Ha sido preparada como proteína pura homóloga al igual que la A, se prepara en forma semejante purificada, mediante precipitación preliminar a pH de 3.5 con ácido nítrico y subsecuentemente reprecipitación etanol en frío.

Las cepas tipo "B" pueden ser entocelíticas o no por lo cual algunos investigadores han sugerido que sólo se designen como Ct. botulinum las variedades no entocelíticas y las que sí lo son se llamen Ct. paratyphicum.

Esta toxina tiene un peso molecular de 60,000 y consiste de una molécula grande que contiene una hemoaglutinina y una exotoxina. Fue aislada por Lamanna y Glasman en 1947 en forma amorfa. Es tan tóxica como la *H* comparada en peso, las requisitos técnicos de ésta toxina son variables.

La  $DL_{50}$  es de  $3.0 \times 10^{-6}$  mg de nitrógeno. El espectro de absorción en el ultravioleta enseña que ambas toxinas "A" y "B" tienen similares proporciones de aminoácidos aromáticos, estando libre el ácido nucleico.

### 2.11.3 TOXINAS C Y D.

Begston encontró el tipo *C*, originalmente en larvas de moscas, que obtuvo de cadáveres en putrefacción de los cuales se estaban alimentando. Cuando se alimentaron vollos con éstas larvas, se les produjo una enfermedad característica que fue considerada por mucho tiempo como una entidad clínica, cuello flácido. Las aves sufren somnolencia y finalmente son incapaces de sostener sus cabezas a consecuencia de la parálisis flácida de los músculos del cuello, generalmente sobreviene la muerte.

Dinter y Kull (1954) describieron un brote de botulismo en faisanes, producido por toxinas del tipo "C", ingeridas con larvas de moscas que se alimentaban con cadáveres de conejos silvestres. El título de la toxina era relativamente bajo en las larvas antes de ser ingeridas, pero aumentaba mucho en el buche de las aves. Esto indica que las larvas contenían no sólo la toxina, sino también microorganismos y que el buche hizo las veces de incubadora.

Kalmbach y Gunderson (1934) demostraron que una enfermedad de caracteres devastadoras en los patos silvestres y otras aves acuáticas, en una área alrededor del gran lago salado de Utah era debido a botulismo causado por un organismo del tipo *E*. En el agua estancada, poco profunda de los charcos que se secan durante el verano, la vegetación descompuesta provee un medio favorable para el desarrollo y la producción de la toxina de éste microorganismo.

El microorganismo del tipo *D* se ha encontrado sólo en la enfermedad del ganado vacuno de Sudáfrica, conocida como LAMZIEKE o mal de cojera. La etiología de ésta enfermedad fue aclarada por Theiler y colaboradores (1926). La enfermedad se presenta sólo en ciertas áreas, en los vacunos que están en pastoreo. En estas áreas, los animales tienen un hábito de masticar huesos, algunos de estos huesos muestran un grado avanzado de descomposición y en ellos la toxina del botulismo a menudo está presente.

No se sabe con certeza que condiciones favorables para la producción de la toxina pueden presentarse en los alimentos de los animales herbívoros, en la forma en que ordinariamente la consumen. Es posible que la toxina se forme en el heno y los granos entamados expuestos a la humedad por un tiempo determinado.

#### 2.11.4 TOXINA E.

Las especies de Cl. botulinum tipo E producen toxinas de baja capacidad mortal en ratones en relación con la alta letalidad que producen en el hombre. La explicación de ésta peculiaridad parece radicar en la activación de la toxina mediante una enzima, como por ejemplo, tripsina y en un medio adecuado. El mismo proceso de activación trófico ocurre en realidad al ser ingerida y el ataque por las enzimas lo hace más potente.

Germing y colaboradores (1960) demostraron que en el tubo de ensayo de tripsina activa a la toxina y encontraron que 18 de los residuos de aminoácidos originales se separaban y el péptido activo residual tiene un peso molecular que varía de 10,000 a 12,000.

Sakaguchi y Sakaguchi (1960) demostraron que la toxina está siempre asociada a un ácido ribonucleico antes y no después de la activación con tripsina. Sugieren que el posible mecanismo de la activación puede ser algún grupo químico contenido en el ácido ribonucleico que activa la enzima.

#### 2.11.5 TOXINA G.

Cl. botulinum tipo G fue aislado por Gimenes y Ciccarelli en un maíz en la provincia de Mendoza en Argentina. El aislamiento produjo una toxina capaz de activarse por la tripsina, lábil al calor y que no fue neutralizada por antitoxinas de las otras toxinas botulínicas conocidas.

La antitoxina producida neutralizaba solo al homólogo de ésta toxina. Las señales que aparecieron en ratones y el tiempo de muerte después de administrar dosis altas y bajas de toxina tipo G eran similares a aquellas observadas después de administrar toxinas botulínicas del tipo A al F.

Los estudios llevados a cabo en cereas especiales obtenidos de ésta toxina en éste caso cerea 89 del tipo G demostraron que se producía muy poca toxina, que era uniforme en un medio especial y que fue debilmente proteolítica y sacarolítica.

Las características bioquímicas y toxigénicas del cultivo son: móvil, hemolítico, asacarolítico, debilmente proteolítico, lipasa y lecitinasa negativo, produce en caldo peptonado con extracto de levadura y azúcar (glucosa) los siguientes

ácidos: acético, isobutírico, butírico e isovalérico.

Los nervos y los conderos son resistentes a una dosis gástrica de mas de 75,000 DL<sub>50</sub> para ratón por Kg. de peso de cuerpo. Los changos málica de la India, pollos y conejillos de Indias son susceptibles a dosis aplicadas en forma enteral y parenteral de la toxina.

La relativamente elevada susceptibilidad de changos y pollos a la administración oral o intragástrica de toxina tipo G indica que es un peligro potencial cuando se le encuentra presente.

El botulismo de tipo G no ha sido encontrado en forma natural, el microorganismo produce 40 DL<sub>50</sub> por ml en un medio en el cual un cultivo de toxina botulínica tipo A produce de 10,000 a 1,000,000 DL<sub>50</sub> por ml. Por éstos resultados se demuestra su baja toxicidad para el hombre.

## 2.12 HEMAGLUTININAS BOTULINALES.

Cl. botulinum tipo A produce una proteína que aglutina los eritrocitos de varias especies animales. Estas hemaglutininas está complicada con neurotoxinas y en cultivos fluidos los dos se recuperan juntos en forma de cristales neurotóxicos. Otra hemaglutinina de menor actividad aglutinante, forma un complejo con la neurotoxina tipo B en cultivos proteolíticos de Cl. botulinum tipo B. Las hemaglutininas tipo A y B (HnA, HnB) están serológicamente relacionadas, pero no son idénticas, las neurotoxinas son serológicamente distintas.

Las hemaglutininas generalmente actúan atando las ligaduras de azúcar sobre la superficie de los eritrocitos. Los enlaces a los cuales la hemaglutinina se une pueden determinarse por el azúcar al cual inhibe la hemaglutinina activada. Una serie de compuestos se estudian para ver su capacidad de inhibición en la acción de las hemaglutininas.

El aislamiento de las hemaglutininas para su estudio se llevó a cabo por medio de cromatografía en columna de sephadex. Se encontró que en pruebas de inagundifusión de HnA y HnB éstas reaccionan con los homólogos del cultisero para formar un precipitado inmune. Colocando las muestras de Hn en recipientes adyacentes o ven las líneas de identidad parcial que muestran que tienen un antígeno común y uno diferente cada uno, no se ha tenido éxito en la separación de las dos entidades.

La concentración mínima de HnA que dió hemaglutinación fué de 0.06 g/ml para muestras almacenadas 6 meses a 4°C. Con preparados frescos de HnA se necesitaron 325 g/ml para la hemaglutinación.



Los requerimientos estructurales de un azúcar para inhibir la actividad hemaglutinante de Hn<sub>1</sub> parece ser: D-galactosa, el carbonilo del carbono 1, la forma B del hidroxilo del carbono 1 parece ser que tiene más poder inhibitorio que la forma D. Una unión glucosídica o tioglucosídica hace la estructura más inhibitoria, se requiere un hidroxilo en el carbono 5, la sustitución del carbono 6 reduce la actividad inhibitoria, un grupo carboxilo la evita, un grupo metilo la disminuye.

Baldwin y colaboradores notaron que la rafinosa, D-galactosamina y D-fucosa no son inhibitorias para la Hn<sub>1</sub>. De los azúcares probados (5,6,12 y 18) carbonos solo la D-galactosa y algunos de sus derivados fueron hemaglutinantes para éstas formas. La orto-nitrofenil-β-D-galactosidasa y la isopropil-β-D-tiogalactosidasa fueron los inhibidores más potentes. (32)

## 2.13 CARNES Y PRODUCTOS CÁRNICOS.

Por carne se entiende generalmente los tejidos esqueléticos o la carne de ganado vacuno, porcino, bovino y otros animales. También se incluyen las glándulas y los órganos de los animales tales como la lengua, el hígado, los riñones, los sesos, etc. En un sentido más amplio la categoría abarca también la carne de aves y pescado.

En los Estados Unidos las principales fuentes de carne son el ganado vacuno, el ganado porcino y el bovino, formando parte de la enorme industria alimentaria, siendo la tercera después de la industria del acero y de la automotriz. Cada año los norteamericanos consumen más de 17000 millones de kilogramos de diversos productos de carne, entre los predilectos es la carne de res y cerco.

Pero los productos cárnicos incluyen muchos subproductos, entre ellos, tripas empleadas como envolturas para salchichas, grasa que se convierte en cebo y manteca, pieles y lana, restos animales huesos y sangre empleados en alimentos para pollos y otros animales y productos como gelatina, sustancias químicas, enzimas y hormonas utilizadas en la industria farmacéutica, alimentaria y otras.

### 2.13.1 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN:

La carne de animales productores es tá compuesta de fibras musculares (miofibrillas), tejido conectivo y tejido adiposo. El hueso es una parte esencial en la estructura de la carne.

#### 2.13.1.1 TEJIDO MUSCULAR.

Son paquetes de fibras ó células musculares unidos junto al tejido conectivo que forman la porción magra de la carne. El grosor de las fibras musculares, el tamaño del paquete de fibras y la cantidad de tejido conectivo todos enlazados determinan lo que en sí es la carne.

Cuando las fibras y los paquetes son pequeños, la carne es fina y aterciopelada y es de mejor calidad.

Una fibra muscular es una célula alargada multinucleada, especializada, variando en tamaño de acuerdo a su función y a la cantidad de uso. La célula muscular tiene una membrana como cubierta exterior y está rellena de pequeñas estructu

nas en forma de varillas llamadas "fibrillas". Estas fibrillas están entrelazadas en un protoplasma denso en un material muscular semifluido.

El tejido muscular es donde se encuentran las proteínas, la cantidad de ésta en un corte particular de carne se relaciona directamente con la cantidad de tejido magro en él, de ahí que la cantidad de proteína en un corte de carne disminuye conforme el contenido de grasa y huesos aumentan.

Las proteínas principales en la carne son: las protoplásmicas ACTINA y MIOSINA y las proteínas extracelulares COLAGENA y ELASTINA que son abundantes en el tejido conectivo. Juntos la actina y la miosina forman el componente contractil del músculo. actina puede existir en cualquiera de las dos formas ACTINA-G o ACTINA-F ACTOMIOSINA es un complejo de las proteínas ACTINA-F y MIOSINA y se encuentra en los músculos voluntarios del animal.

### 2.13.1.2 TEJIDO CONECTIVO.

Aún cuando el tejido muscular da a la carne su apariencia característica, sabor y textura, es el tejido conectivo de la carne el que determina la ternura. El tejido conectivo en la carne forma las redes de las fibras musculares, ligandolos en paquetes, envolviendolos como una membrana y formando los tendones y ligamentos que conectan los músculos con los huesos.

### 2.13.1.3 TEJIDO ADIPOSITO.

La grasa está distribuida por toda la carne en pequeñas partículas o en grandes masas. El modelo formado por la distribución uniforme de la grasa en pequeñas cantidades por todo el músculo se llama MARBLADO y es considerado como un factor importante que contribuye a la ternura de la carne y sabor del tejido muscular. Una capa exterior de grasa conocida con el nombre de "cubierta grasosa" sirve para retener la humedad del músculo o tejido magro y proteger la carne de la acción de los microorganismos.

Aunque es reconocido generalmente que la presencia de la grasa aumenta el sabor y la ternura de la carne, la crianza de los animales se ha dirigido a la reducción de la grasa, esto ha sido motivado por la demanda del consumidor hacia la carne magra y a cortes nutritivos.

Sustancias similares a las grasas llamadas ESTEROLES son esenciales para el metabolismo celular. Son encontrados en los fluidos de la grasa celular. El tejido adiposo es considerado como una forma especializada del tejido conectivo, aparece tarde durante el desarrollo del animal. Las células grasas comienzan a almacenarse en forma de gotas solamente después de que los nutrientes aprovechables exceden la cantidad necesaria para la producción de órganos. Obviamente un animal productor de carne, lo debe lograr a cierta edad y a un nivel de nutrición antes de desarrollar células grasas.

#### 2.13.1.4 HUESOS.

La condición del hueso es como un indicador de la edad del animal. En animales jóvenes el espinazo o hueso de la espalda es blando y tiene un tinte rojizo, en animales totalmente maduros los huesos son duros y blancos. Una alta proporción de hueso aumenta el costo de la carne por lo que es más deseable reses con una mayor proporción de carne que de hueso. La forma de el hueso es una buena guía para identificar los diferentes cortes de carne.

#### 2.13.1.5 PIGMENTOS Y CAMBIOS DE COLOR EN LA CARNE.

El principal pigmento de los músculos es una proteína llamada mioglobina, que tiene un color rojo tirando a morado. Cuando se le expone al oxígeno, se convierte en oximioglobina cuyo color es rojo vivo. Así en el momento en que la carne fresca se corta, - su color es morado, pero su superficie adquiere rápidamente un color rojo vivo, - cuando se le expone al aire. Las piezas grandes pueden tener un color rojo vivo en la superficie y un color tirando más a morado en su interior debido a la cantidad menor de oxígeno. El color rojo vivo de la oximioglobina al exponerse al aire no es completamente estable, y si la exposición se prolonga y la oxidación es excesiva, se puede convertir en metaxioglobina cuyo color es café.

Cuando se cuece la carne fresca, estos pigmentos proteínicos se desnaturalizan y también producen un color café. Un bistec poco cocido tiene menos oximioglobina desnaturalizada y su color es más rosa. La carne bien cocida está más desnaturalizada y tiene un color café más definido, pero las carnes curadas con nitritos son rojas, y siguen siendo rojas durante y después del cocimiento. Los nitritos combinados con mioglobina produce Oxido nítrico-mioglobina, cuyo color -



### 2.13.2 VALOR NUTRITIVO.

Siendo un alimento universalmente popular, la carne tiene un sobresaliente valor nutritivo, contribuyendo con cantidades sustanciales de proteínas de alta calidad, vitaminas y minerales esenciales para la dieta.

Las proteínas de la carne son bien utilizadas por el cuerpo, éstas aseguran una proporción de aminoácidos esenciales necesarios para el crecimiento y mantenimiento del organismo. La carne contiene suficiente hierro, fósforo y cobre por lo que es considerado como una fuente importante de estos minerales. Un factor nutricional importante es que una porción grande de hierro encontrada en la carne se localiza en el hígado, y este órgano constituye una pequeña porción del animal. Las vitaminas tales como la "H", tiamina y riboflavina están presentes en el hígado, el riñón, el corazón y las mollejas (páncreas y tiro). La carne magra de vaca es una principal fuente de tiamina. Todas las demás carnes magras contienen algo de tiamina, riboflavina y niacina.

La carne es también relativamente alta en valor energético, el contenido calórico de un corte de carne depende de la cantidad de grasa que contenga.

### 2.13.3 POSTMORDEM EN LA CARNE.

Después del sacrificio del animal, la carne se enfría y se guarda a temperaturas ligeramente cercanas a la de congelación durante 2 o 3 días. Durante éste tiempo las enzimas dentro del tejido muscular y los microorganismos realizan cambios físicos y químicos que alteran la estructura y la composición química de la carne. Ocho horas después de muerto el animal comienza el "rigor mortis" y pasa a un estado en el que el azúcar (glucógeno) en el músculo pasa a ácido láctico por la acción continua de las enzimas. El ácido láctico actúa sobre el tejido conectivo volviendo al tejido muscular más suave. La tendencia de enfriar la carne durante 48 horas después del sacrificio tiene un efecto suavizante sobre la carne. Muchas carnes son enfriadas en un período promedio de 8 días llamado esto "maduración".

Algunas carnes bien terminadas son maduradas para desarrollar buen sabor. - Generalmente éstas carnes son enfriadas y guardadas por 2 a 6 semanas a temperaturas cercanas al de congelación y con humedad baja.

Porque la maduración es un proceso tardado y costoso ya que implica un largo almacenaje, pérdida de peso, continúa evaporación de agua y al final recorte -

de la carne para eliminar el crecimiento de moho, solamente cortes seleccionados de carne y cortes con una determinada calidad tope que tienen una buena cubierta de grasa, son madurados.

La carne de cordero ocasionalmente se madura, pero la carne de vaca nunca debe madurarse por su alto contenido de grasa. De acuerdo a Lowe la maduración de la carne en 20 a 40 días parece impartir un sabor óptimo a la carne.

#### 2.13.4 TEXTURA DE LA CARNE.

Se reconoce generalmente que la cantidad de tejido conectivo se relaciona directamente con la suavidad de la carne. Los cortes de carne con más tejido conectivo son más duros que los que tienen menos de éste tejido.

Hay dos tipos de tejido conectivo: colágeno y elastina. El tejido conectivo blanco está compuesto por colágeno, es una proteína que se hidroliza a gelatina a temperaturas ordinarias de cocimiento. La elastina es amarilla y no se convierte en gelatina durante el proceso de cocción y que la gelatina es fácilmente disuelta en el medio líquido del tejido de la carne, este cambio de estructura de éste tejido nos da una carne más suave y tierna.

El cambio en la estructura de la elastina contribuye probablemente muy poco a la suavidad de la carne, debido a las altas temperaturas requeridas para esta conversión a gelatina y debido también a que se encuentra muy poca elastina en el tejido muscular.

Otros factores que afectan la textura de la carne son: el contenido de grasa la edad del animal y la calidad del corte.

Se acepta una buena distribución de la grasa en el tejido muscular aumenta la suavidad de la carne. Generalmente la carne procedente de animales jóvenes es más suave que la de animales viejos, aunque algunas excepciones a éstas reglas, se puede ver sin embargo, que la falta de desarrollo muscular en los animales jóvenes es un factor significativo. La textura del músculo disminuye conforme al diámetro de la fibra muscular aumenta y el diámetro de las fibras aumenta con la edad del animal. Los animales viejos con mucho desarrollo muscular, tienen aumentado el tejido conectivo.

La localización del corte nos indica también la suavidad de la carne, los músculos menos utilizados tal como los encontrados en el lomo y las costillas son más suaves que aquellos en donde hay más desarrollo como el cuello, entre el cue

llo y la escaldada.

La temperatura a la que la carne es cocida puede alterar la suavidad, cocida o no la suavidad depende de la relación entre la hidrólisis de la colágena y la coagulación de las proteínas musculares. Si la hidrólisis de la colágena predomina, la carne es más suave, pero si la coagulación de proteínas musculares es la que predomina, la carne se vuelve dura. De acuerdo al trabajo de Danson y otros la ternura de la carne no aumenta consistentemente con un aumento en la hidrólisis de la colágena. Esto sugiere que la hidrólisis de la colágena no es un único factor responsable en la suavidad de la carne.

Un método para suavizar la carne es la maduración cuando ocurre el "rigor mortis" en un animal, el músculo es duro y las proteínas musculares actina y miosina reaccionan para formar acto-miosina. Como un resultado de esto algunas fibras musculares se contraen alterándose y dilatándose. Con fuerza la maduración continúa después del "rigor mortis" el músculo se ablanda y las fibras musculares parecen desmarañarse con daños notables, esto es debido a que el daño a las fibras son causadas por la acción enzimática sobre las proteínas.

La carne también puede ser suavizada por el uso de enzimas proteolíticas - tal como la papaína que se encuentra en la hoja de la papaya. Un problema no resuelto es la distribución uniforme del suavizador por todo el corte de la carne. Cuando el suavizador es humedecido o inyectado a la carne, no hay forma de asegurar una distribución uniforme. En cortes grandes solamente la superficie de la carne es afectada por la aplicación del agente suavizante. Estudios realizados indican que hay una pérdida de sabor y jugosidad cuando se utilizan suavizadores. Sin embargo, muchas preparaciones suavizantes comerciales contienen papaína, bromelina y pepsina, las enzimas son mezcladas con sal y usados como una mezcla seca o como un baño líquido.

Las enzimas suavizan la carne por el rompimiento descendente del exterior - de las fibras musculares y de la colágena y elastina que se encuentran en el tejido muscular.

Recientemente, la atención ha sido dirigida a la introducción antemortem de enzimas para realizar una suavidad uniforme. La solución suavizante (papaína) es introducido en la vena yugular del animal para que se distribuya por todos los tejidos del cuerpo. Este nuevo proceso ha tenido buen éxito al aumentar la ternura de la carne. (25, 27, 33).



### 2.13.5 CARNES CURADAS.

El curado de la carne fué originalmente usado con el propósito de la conservación sin refrigeración. El primer paso fué la adición de la sal a la carne, pero a lo largo de los siglos ha sido variado y combinado con otros procesos. Más hoy en día un producto cárnico curado, puede no sólo ser salado, sino también ahumado y/o seco, adicionalmente se aplican, tratamientos con nitrato de sodio y/o nitrato de sodio para fijar color.

La carne curada puede ser picada o molida o puede consistir de ciertos cortes tales como el jamón y tocino, hecho del animal, en general el curado es confirmado para carne de res y de cerco.

La necesidad de conservar la carne con sal es mucho menor en estos tiempos debido a la refrigeración, la carne es curada principalmente debido a que los diversos productos curados por sí solos ocupan un lugar en la dieta diaria.

Ha habido una tendencia a reducir la concentración de la sal para lograr un curado suave, en consecuencia se ha desarrollado un control cuidadoso de la inspección sanitaria y de refrigeración en las casas de elaboración de estos productos, una educación para quienes manejan estos productos para garantizar al consumidor productos de buena calidad.

El departamento de inspección de carnes (M.I.U.) permite la utilización de 5 agentes curantes en el proceso de curación de la carne: sal, azúcar, nitrato de sodio, nitrito de sodio y vinagre. Básicamente hay 2 tipos de procesos para el curado. El primero implica la adición de los agentes curantes en estado sólido y el segundo en forma de una salmuera. Estos procesos básicos son sujetos a grandes variaciones dependiendo del tipo de producto que va a ser curado. Un producto molido tal como la salchicha se requiere únicamente una buena mezcla con los agentes curantes para obtener una buena distribución. Un jamón de cerco que de ser curado por la aplicación de los agentes de curación en forma sólida sobre la superficie y continuar con un proceso lento de difusión, se obtiene una buena distribución o el jamón puede ser sumergido en una solución acuosa de los agentes curantes y así el proceso de difusión se acelera y se mejora la distribución. El método moderno del curado del jamón implica una inyección de la solución curante a través del sistema vascular del jamón y de esta modo se obtiene una rápida y buena distribución.

De los agentes curantes permitidos oficialmente cuatro son los más importantes y de más uso, ellos son: sal, azúcar, nitrato y nitrito de sodio, la sal se usa como conservador y salmuerado, el azúcar mejora el sabor, el nitrito y ni -

trito de sodio son agentes fijadores del color, el nitrato también es bacterios-tático.

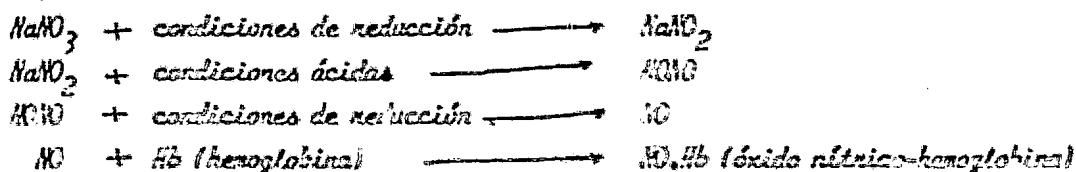
Los pigmentos de la carne, como se mencionó anteriormente son la hemoglobina y la mioglobina, el primero está presente en cantidades decrecientes de la canti-dad de sangre residual en el tejido, el segundo es una parte integral del tejido. Los dos pigmentos se relacionan estrechamente aunque difieren en sus reacciones. Su espectro de absorción son prácticamente idénticos y en consecuencia su color-son idénticos.

En la carne fresca la hemoglobina puede existir en 2 formas, hemoglobina co-mo tal o como oxihemoglobina que es un compuesto de hemoglobina y oxígeno molecu-lar. El primero existe solamente en ausencia de oxígeno y el segundo requiere la presencia de oxígeno. La conversión de uno al otro es reversible e implica una "oxigenación" más que una "oxidación". En ambos casos el fierro de la porción he-mo se encuentra en estado ferroso. Normalmente sólo el pigmento de la superficie de la carne existe en forma de oxihemoglobina.

Cuando la hemoglobina o la oxihemoglobina es calentada, ocurre coagulación-de la proteína, simultáneamente hay un cambio de color, la oxihemoglobina es roja, la hemoglobina es púrpura, el compuesto resultante del calentamiento es la -hematina de color café. La carne cocida se torna café.

Cuando las carnes curadas son calentadas, de algún modo retienen su color, -ésto es debido a la fijación del color con el nitrito y el nitrato de sodio. El-nitrato de sodio y el nitrato de potasio fueron los primeros agentes fijadores -de color utilizados. Fue descubierto, sin embargo, que el nitrato es tan sólo u-na fuente de nitrito y en el año de 1927 fué permitido el uso de nitrito direc-tamente. La industria siguió utilizando los nitratos y en casos en que se necesi-ta un color apropiado al nitrito. En general son obtenidos mejores resultados -por la combinación de los dos agentes curantes.

El nitrito de sodio es una fuente de óxido nítrico, que es el real fijador-del color, las reacciones del color del proceso de curación puede ser dada como-sigue:



El pigmento de carnes curadas no cocidas es óxido nítrico hemoglobina, éste compuesto es un análogo de oxihemoglobina e implica tan sólo una sustitución de

una molécula de  $\text{H}^+$  por una de oxígeno. El espectro de absorción de los dos compuestos son muy similares y como consecuencia del mismo color. Con el calentamiento el óxido nítrico-hemoglobina es convertido a óxido nítrico hemocromógeno, que también es rosa en contraste al color café de la hematina derivada de la hemoglobina y oxihemoglobina.

En las reacciones dadas en la fijación del color se puede notar que dos condiciones son necesarias para un desarrollo colorido de óxido nítrico-hemoglobina condiciones de reducción y condiciones ácidas. La conversión de nitrato de sodio a nitrito es un proceso de reducción, acostumbrado normalmente por una acción bacteriana, ésta reducción bacteriana es relativamente baja y depende de la forma de tener presente el género adecuado de bacteria. La segunda condición necesaria es la acidez que se encuentra en condiciones naturales en la carne. El nitrito de sodio que existe en soluciones alcalinas o neutras no es una buena fuente de óxido nítrico, pero del  $\text{pH}$  ligeramente ácido entre  $\text{pH}$  5.5 a 6.4 se descompone fácilmente para producir óxido nítrico. Este es el rango normal de  $\text{pH}$  de la carne y consecuentemente es el rango en que las reacciones de curación se lleva a cabo. A  $\text{pH}$  menores de 5.5 la descomposición es más rápida y las condiciones de curado suelen desarrollar tal acidez que el olor del óxido nítrico puede ser notado.

El óxido nítrico en presencia de oxígeno reacciona con compuestos ferroso-hemoglobina, si son compuestos tales como la oxihemoglobina o el óxido nítrico-hemoglobina, el producto final es metahemoglobina, consecuentemente hay más razón para mantener las condiciones de reducción durante el curado. Aún cuando el nitrito de sodio es el principal material curante y no se requiere la conversión del nitrato a nitrito, las condiciones de reducción son absolutamente necesarias para el desarrollo de un buen color curado. (25, 27, 35).

### 2.13.5.1 EMBUTIDOS.

Generalmente son combinaciones de carne de cerdo, res, becerro o borrego, molidas, curadas, saladas y condimentadas, dentro de éste grupo están los productos conocidos como de "salchichonería".

Diferentes tipos de embutidos fueron desarrollados en Europa de acuerdo con las condiciones climatológicas del lugar, para lograr una conservación aceptable en esas condiciones, dado que la refrigeración, el enlatado y los procesos de conservación que actualmente conocemos, eran desconocidos. Así los pueblos del sur de Italia y Francia donde el clima es más cálido, desarrollaron embutidos secos y al contrario las gentes del norte donde el clima es frío y por lo tanto las condiciones para conservar carne fresca, son más favorables, desarrollaron embutidos frescos o semifrescos.

Lógicamente la emigración de gentes de varios países hacia América, trajeron recetas y métodos para la preparación de éstos embutidos.

Los 5 principales grupos de "Carne Frías" son los siguientes: 1) Frescos, 2) Frescos y ahumados, 3) Ahumados y cocidos, 4) Cocidos y 5) Especialidades.

#### FRESCOS:

En éste grupo se encuentra la salchicha de cerdo y hamburguesa, son productos hechos con carnes crudas molidas que deben refrigerarse y cocinarse antes de consumirse.

#### FRESCOS Y AHUMADOS:

Salchicha de cerdo ahumada, igualmente hecho con carnes frescas molidas que han sido ahumadas sin cocer. También deben refrigerarse y cocinarse antes de servirse, en éste grupo de carnes frías entra también el tocino que se prepara con piezas enteras de cerdo saladas, curadas y ahumadas y se consume generalmente rebanado, debe refrigerarse y cocinarse para su consumo.

#### AHUMADOS Y COCIDOS:

Salchicha ASI, salchicha ESE, salchicha cocktail, salchicha viena, salchicha Frankfurt, Bologna, mortadella, salami cocido. Son éstos los embutidos más famosos del mundo y populares que contienen más o menos los mismos ingredientes sólo variando los porcentajes de carne de cerdo, de res, las especias, el método de preparación y la presentación. Deben refrigerarse para su conservación y pueden consumirse en una variedad de platillo, o simplemente en su forma natural como en los Hot-Dozs, Sandwiches, tartas, etc.

En éste grupo pueden incluirse el Entrecot ahumado que consiste en piezas en

terras de cerdo saladas, curadas, ahumadas y ligeramente cocidas, que se nebanan para presentarse como "Chulotas ahumadas de cerdo", que pueden cocinarse de diferentes maneras o simplemente a la plancha.

#### COCIDOS:

Paté de hígado, pastales de lengua, morcillo, nimiento y pollo, jamón y escalilla cocidos, queso de cuerno. Productos preparados para comerse directamente sin cocinarse para preparar una variedad de platillos, se sirven generalmente nebanados haciendo el paté que es para untar y revierten en refrigeración.

#### SECOS:

Pueden ser suaves o duros y están el chorizo y sus variedades; Cantinazo, Carrasco y comercial, nechos ahumados, morcilla, longaniza, jamón serrano, que pueden guardarse por algún tiempo en lugar fresco. Según el grado de deshidratación a que han sido sometidos. Los embutidos secos (chorizos) se consumen generalmente cocinados.

#### ESPECIALIDADES:

Una innumerable variedad de otros productos como el QUÉD-BEEF, chorizos curados, lomo embuchado, carnes saladas, etc.

El proceso de elaboración de embutidos se puede resumir como sigue: primero se mezclan las carnes, luego se hace una emulsión de todos los componentes, se enbute y sigue el cocimiento ahumado para terminar enfriando en refrigeración.

#### 2.13.5.2 Jamón.

El jamón lo constituye las piernas traseras del cuerno y se clasifica de acuerdo a un lenguaje ajustado como: 1) Jamón tosco, 2) Jamón regular, 3) Jamón con poca piel y 4) Jamón sin piel.

El jamón tosco es hecho sin recortes, solamente las patas son removidas. El jamón regular es elaborado quitando el hueso del nabo, del costado y las patas. El jamón con poca piel se le quita el hueso del nabo, del costado, las patas y la piel de la piel. El jamón sin piel es costado igualmente que el de poca piel excepto que toda la piel es removida. El jamón representa del 27 al 28% del cuerpo del animal o cerca del 17 al 19% cuando son mermadas con poca piel.

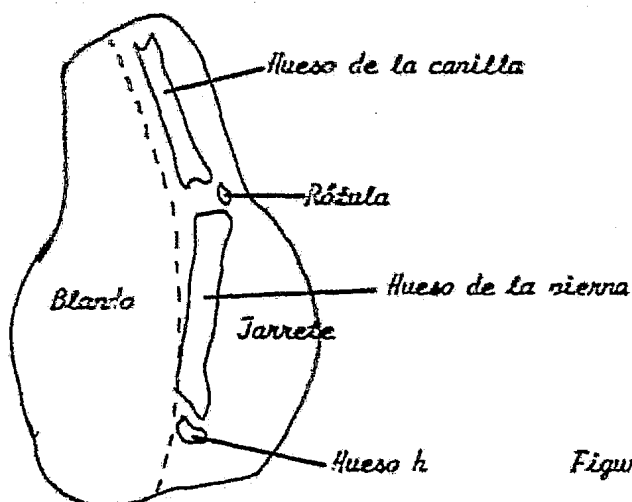


Figura 4. Partes del jamón.

Los jamones pueden venderse con la pata resoviada o cortada hasta la corva. Sin embargo, pueden comprarse como jamones de canilla corta con la pata cortada cerca del cuerpo y como jamones de canilla larga en donde la pata es cortada de bajo de la corva.

Los jamones son separados del lomo del puercos por lo general cortando entre la segunda y la tercera vertebra del sacro, paralelo al ángulo de unión de la corva. Dependiendo del mercado del lomo el jamón puede ser separado más cerca del lomo o más lejos del hueso hache. La estructura anatómica del jamón se presta por sí mismo a la división en 2 o 3 secciones. Un método de división separa al jamón sin hueso (figura 4), en 2 secciones: 1) Blanda, 2) jarrete; mucho de la carne superior y de la sanca permanece en la sección blanda, ésta comprende del 75 al 80% del peso del jamón. El jarrete constituye del 20 al 25%.

El jamón no se vende de acuerdo a una calidad establecida sino de acuerdo al peso de éste y se clasifican en diferentes pesos menores de 14, 14 a 17, 17 a 20, 20 a 25, 25 a 30 y mayor de 30 libras. El jamón de peso ligero menores de 20 libras generalmente son de mejor calidad que los jamones pesados. Los que pesan más de 20 libras provienen de marranos maduros y frecuentemente marranas. - Los jamones pesados generalmente tienen un color más oscuro, textura tosca y es menos suave que los jamones ligeros.

### 2.13.5.3 BRAZUELO DEL PUECO.

El brazuelo del pueco puede ser proce-  
sado completo, pero en muchos casos son divididos en 2 cortes: 1) Boston butts;-  
2) Picnics, ambos se venden en el mercado de acuerdo a su peso, el brazuelo re-  
presenta cerca del 27% del cuerno del marrano.

El boston butts son las mitades superiores del brazuelo del marrano y el pe-  
so en que se encuentra generalmente en el mercado varía de 4 a 8 libras. Boston-  
butts que han sido desuesados y recortados son llamados boneless butts y se ven-  
de de acuerdo a 3 grados de peso 1.5 a 3.3, a 4.5, 4.5 a 6 libras.

El término picnic es aplicado comunmente a la mitad del brazuelo en su parte  
baja. El picnic son cortes del brazuelo con poca piel que han tenido las costi-  
llas, huesos del cuello y pecho removido y la mano cortada desde el codillo. Pic-  
nic tiene toda la piel removida y en el mercado se vende de acuerdo a los sigui-  
entes pesos de 4 a 6, 6 a 8 y 8 libras en adelante. Como sucede en el jamón gene-  
ralmente son más grandes con la edad del marrano siendo menos suave con la edad-  
del animal. Las marranas tienen generalmente el brazuelo más grande.

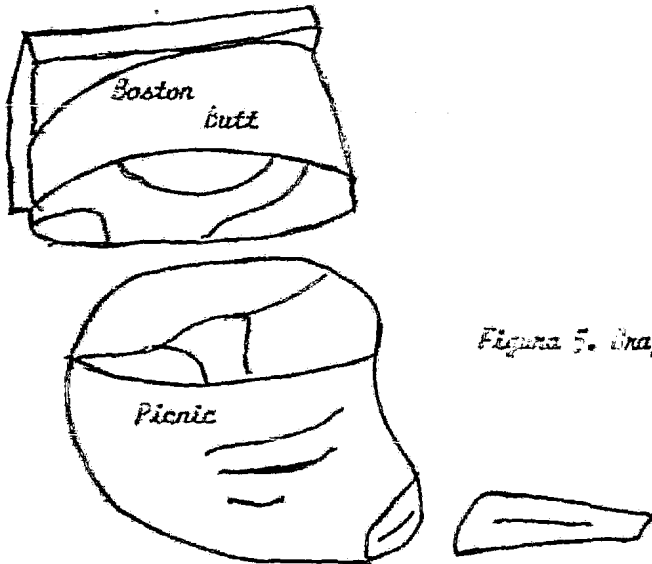


Figura 5. Brazuelo del pueco.

#### 2.13.5.4 LOMO DE PUERCO.

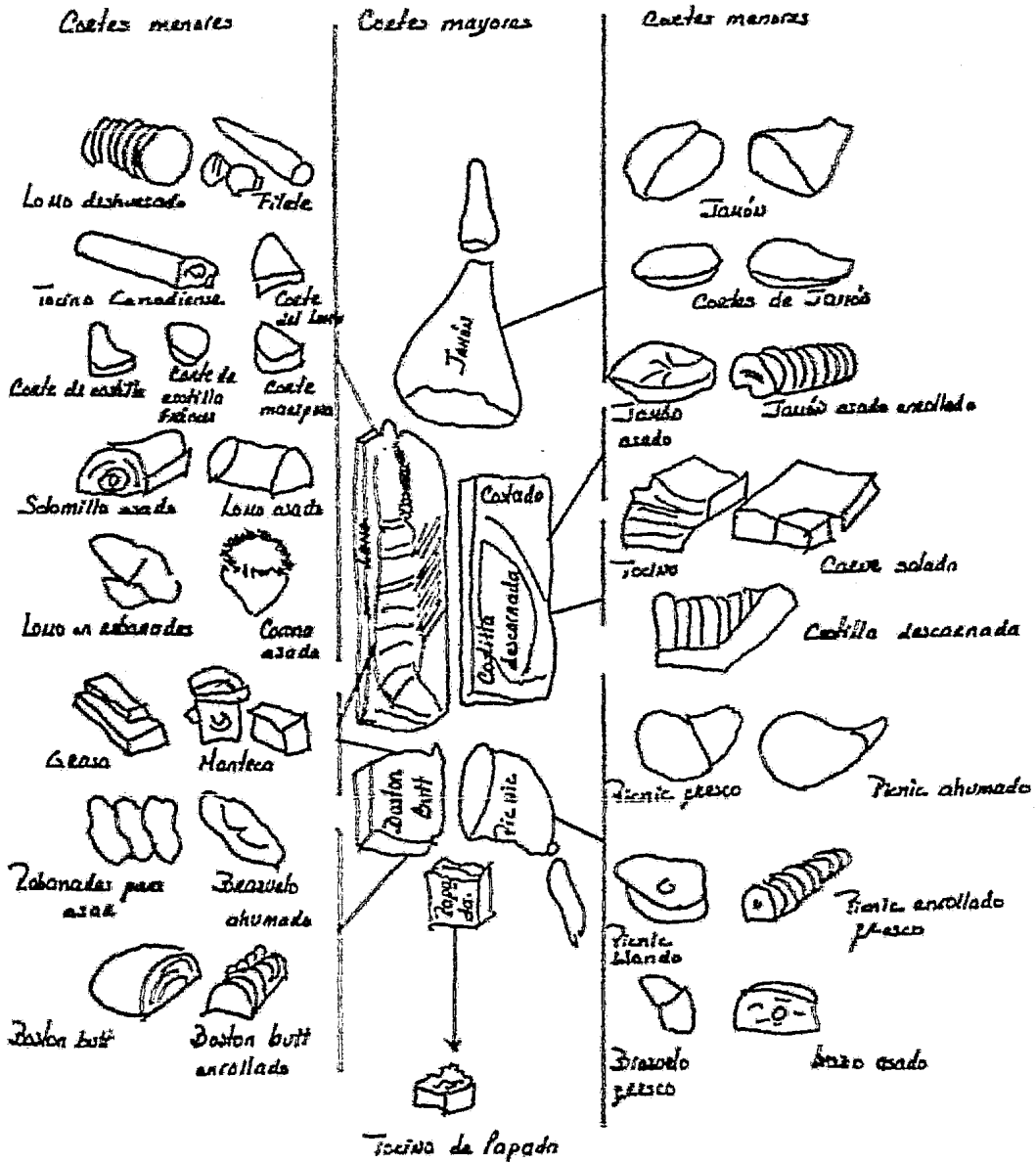
El lomo de cerco es usado para producir dos productos cárnicos ahumados: 1) Lomo de cerco ahumado o que se vende en el mercado en nata o acido; 2) tocino canadiense.

Aproximadamente el 20% del cuerpo del animal lo constituye el lomo sin recortes, cuando es recortado el lomo representa del 14 al 17% del animal. Se vende en el mercado de cerco al peso total del lomo que se clasifica como sigue: menor de 14, 14 a 17, 17 a 20 y arriba de 20 libras. El lomo regular tiene un exceso de grasa removida de el filete y no más de 1/2 pulgada de la grasa que cubre la parte exterior del lomo. El lomo abarca desde la valeta hasta la rierna del animal.

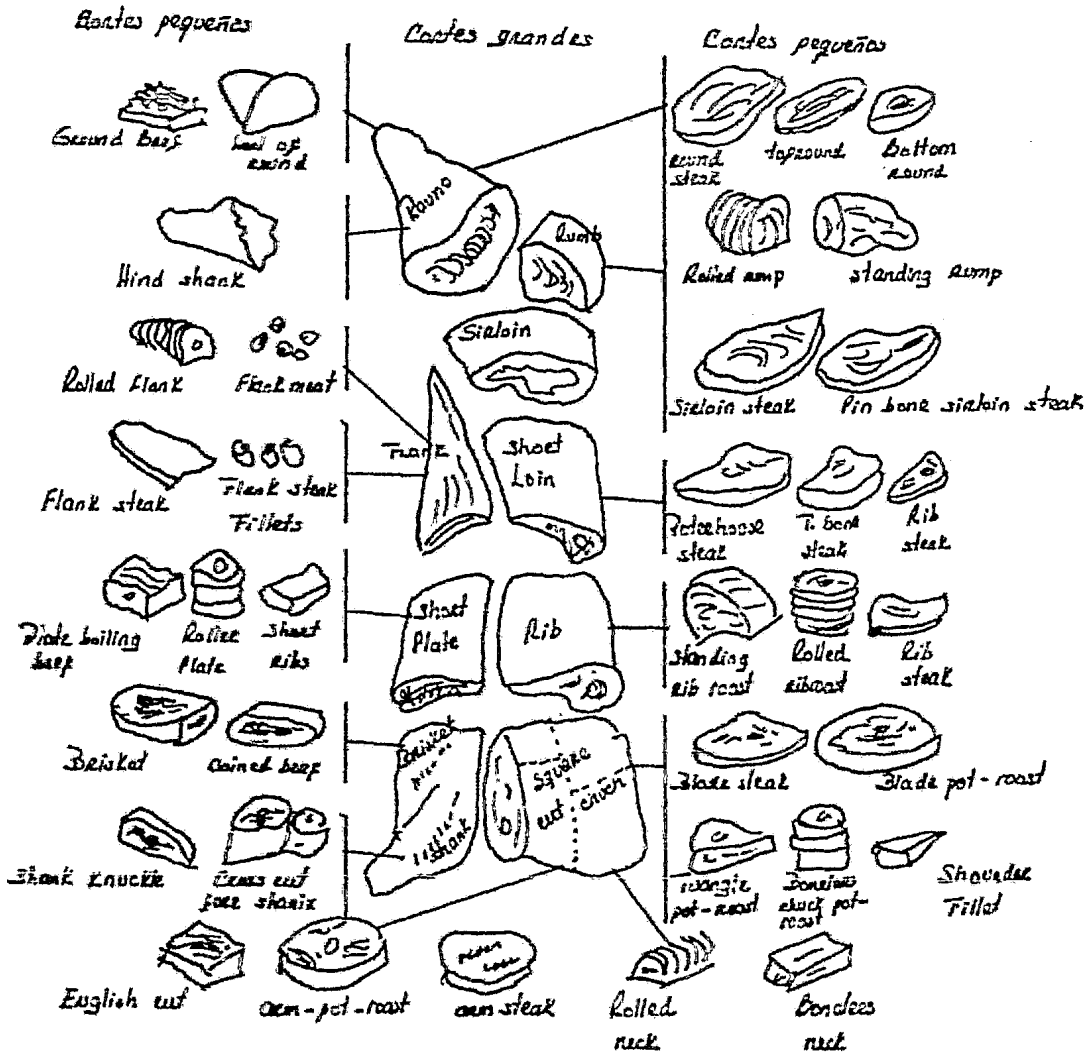
El tocino canadiense esta hecho de lomo de cerco deshuesado. El músculo más grande del lomo del cerco comúnmente denominado como lonja o solomillo, es removido del lomo entero y se vende como lomo tipo canadiense que pesa generalmente de 5 a 9 libras.

Para darnos una idea más clara de la cantidad de productos cárnicos derivado del cerco se presenta un esquema de los diferentes cortes realizados en todo el cuerpo del animal.





ESQUEMA 2. Diagrama de los cortes realizados en el puerco.



Esquema 3. Diagrama de los cortes realizados en una res.

### 2.13.5.5 SALCHICHAS.

La salchicha consiste generalmente de carne molida, que puede estar adicionada de especias, agua, leche descremada en polvo y otros ingredientes, que se encuentran contenidas en una envoltura. Las principales carnes empleadas en la elaboración son carne de res y de puerco, puede estar hecha de carne fresca o curada, puede estar ahumada o no y puede ser o no cocida en la planta elaboradora.

La envoltura generalmente es de origen animal, pero en años recientes algunas salchichas son embutidas en cubiertas sintéticas hechas de celulosa. Existen muchas variedades de salchichas, pero en el comercio generalmente se clasifican en 3 grupos: i) salchichas frescas, no cocidas, hechas de carnes frescas no ahumadas.

ii) salchichas cocidas y ahumadas.

iii) salchichas de verano o secas.

La salchicha fresca es de muy fácil descomposición, la parte grasa de los recortes de puerco, pueden fácilmente tornarse rancias a altas temperaturas, tanto en el proceso de producción como en los canales del mercado.

A temperatura de 40°F el desarrollo de la rancidez y el crecimiento bacteriano no en carne de puerco, fresco es mucho más rápido que a 32°F. Por lo que los recortes deben ser lo más frescos posible. De ser posible deben ser utilizados inmediatamente después de ser cortados y enfriados prontamente a 30 - 32°F.

La causa del desarrollo de la rancidez en la carne de puerco es la reacción química del oxígeno del aire con los ácidos grasos no saturados presentes en la grasa del puerco. A bajas temperaturas disminuye el desarrollo de esta rancidez.

Después de que la salchicha ha sido elaborada, puede ser enfriada y almacenada en frío y transportada a las tiendas de distribución también en frío.

### 2.13.5.6 CARNES ENLATADAS.

Los productos cárnicos enlatados pueden ser agrupados en dos clases:

i) aquellos que están compuestos de cortes enteros tales como el jamón.

ii) aquellos que están compuestos de carne molida.

Por muy grande que sea la porción de carne normalmente enlatada cae dentro de la clase moderna. Las carnes son enlatadas primeramente para su conservación

sin refrigeración y consecuentemente el producto es esterilizado debido a las altas temperaturas a que se somete.

Unos pocos sin embargo son enlatados con un programa de procesamiento que no es suficiente para la prevención de la acción microbiana, por lo que tales productos deben conservarse en refrigeración. Un jamón entero es un ejemplo de esta clase moderna y la principal razón por lo que tales productos no se someten a temperaturas suficientemente altas para prevenir su almacenamiento sin refrigeración y es que con estas temperaturas el producto puede no mantener su forma y sus características organolépticas. Los productos cárnicos enlatados incluyen, jamón, cecina, cecina picada, carne de lechón, jamón cortado, brazo de puerco, salchicha tipo viena y carnes guisadas.

Otros productos cárnicos destinados a la exportación pero que no son enlatados y que conservan la característica de no necesitar refrigeración son los cubiertos por una película de asfalto. Consisten de productos generalmente jamón y tocino curados con cantidades extra de sal y un ahumado excesivo. Son envueltas en varias capas de papel y sumergidos en asfalto, cuando ésta sustancia se endurece, la carne queda protegida contra la humedad, polvo y bichos. El asfalto puede ser removido fácilmente, liberando al producto cárnico que se trate. (25,27,35)

## 2.14 INHIBICION DE Cl. botulinum EN PRODUCTOS CARNICOS.

Existen muchas estudios sobre compuestos químicos que tienen acción antibotulínica, en las que destaca el realizado por Robach y Pierson, (42, 43, 44); que estudiaron la acción de 75 compuestos químicos incluyendo antioxidantes y conservadores derivados del fenol para la inhibición del Cl. botulinum y la producción de toxina en un medio de crecimiento (TYG) preparado anaerobicamente ajustado a un pH de 7.0 distribuido en tubos y esterilizados por 15 minutos a 121°C, las sustancias probadas se agregan sépticamente en diferentes concentraciones: 0, 50, 100, 200, 400, 800 y 1000 microgramos por ml.

Medio TYG.

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Thiotona .....             | 1.0%    |
| Extracto de levadura ..... | 1.0%    |
| Glucosa .....              | 0.1%    |
| Cloruro de cisteína .....  | 0.5%    |
| Resorquina .....           | 0.0001% |

Se inoculan los tubos con una mezcla de igual número de 19 cepas de Cl. botulinum (33A, 62A, 77A, 10755A, 9B, 40B, 41B, 53B y 67B) con aproximadamente  $2.5 \times 10^4$  esporas por mililitro. Se incuban a 37°C usando una referencia para cada concentración, el crecimiento de los microorganismos fué determinado por la absorbancia de los tubos a 600nm.

La inhibición de Cl. botulinum por los compuestos probados se representan en las tablas (10) y (11). De los 75 compuestos probados 24 a una concentración de 1000 µg/g de medio de crecimiento no inhibieron el crecimiento y la producción de la toxina por arriba de un día; 7 compuestos no mostraron tener acción antibotulínica a una concentración de 800 µg/g, pero sí inhibieron al Cl. botulinum por un día a 1000 µg/g.

De los compuestos probados, los más efectivos inhibidores fueron estéres de cadena larga de los ácidos gálicos y p-OH-benzóico, antioxidantes y derivados de butil-fenol, la actividad antibotulínica fué aumentando conforme aumenta la longitud de la cadena, para el ácido p-OH-benzóico (C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>), y para ácido gálico (C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>).

La máxima actividad antibotulínica fué observada con estéres de cadena larga tal como, los estéres butílicos del ácido o-OH-benzóico (C<sub>4</sub>) y dodecil galato (C<sub>12</sub>) a concentraciones de 300 µg/ml de medio.

Esteres de cadena media (isobutil galato, isoomil galato, octil galato y ester etílico y propílico del ácido p-OH-benzoico) fueron efectivos unicamente a altas concentraciones.

Los esteres de cadena corta (metil y etil galato y éster metílico del ácido p-OH-benzoico) no fueron efectivos en la inhibición del crecimiento y producción de toxina aún a niveles altos de concentración (800 a 1000  $\mu\text{g/ml}$ ).

Octil galato y dodecil galato adicionado al medio TVG a mas de 400 y 200  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, inhibieron el crecimiento por todo un período de incubación de 7 días. Sin embargo, no son completamente solubles en el medio.

También los antioxidantes probados, butil-hidroxi-anizol (BHA), butil-hidroxi tolueno (BHT), ácido nonhidroguayarático y terbutilhidroquinona parecieron tener mucha efectividad a bajas concentraciones.

El ácido nonhidroguayarático a 100  $\mu\text{g/ml}$  retrazó el crecimiento y la producción de toxina por un período total de incubación de 7 días. BHT fué un poco mas efectivo que el BHA. BHT a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  de medio retardó el crecimiento por 2 días, mientras que el BHA a la misma concentración no tuvo ningún efecto.

Los antioxidantes propil-galato y 2,4,5-trihidrobutirofenona retardaron maxcadamente el crecimiento solo a concentraciones altas (800-1000  $\mu\text{g/ml}$ ). Otros antioxidantes tales como alfa-tocoferol, metil galato, hidroquinona, metil-hidroquinona y etoxiquina no tuvieron ningún efecto aún a concentraciones altas, éstos definitivamente no tienen aplicación como posibles inhibidores del Cl. botulinum (40).

Algunos aditivos alimenticios directos e indirectos tales como: ácido benzoico, p-cloro-benzoato de sodio, benzoato de sodio, ácido dihidroxiacético, ácido o-hidroxibenzoico, aminofenoles, metoxifenoles y cresoles mostraron muy poca inhibición aún a concentraciones altas de 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Una diferencia en el nivel de inhibición fué observado para m-, o-, y p-cresoles, a 800  $\mu\text{g/ml}$  o-cresol fué más efectivo que el m- y p-cresoles.

El timol resultó ser un inhibidor efectivo de Cl. botulinum cuando se adicionó 200  $\mu\text{g/ml}$ . De los derivados del butilfenol 7 compuestos (2-terbutilfenol, 3-terbutilfenol, 4-terbutilfenol, 2,4-diterbutilfenol, 2,6-diterbutilfenol, 2-terbutil-4-metilfenol y 2-terbutil-6-metilfenol) retardaron el crecimiento y la producción de toxina por un período total de incubación de 7 días a una concentración de 400  $\mu\text{g/ml}$ .

La posición del grupo butilo en el anillo fenólico cambia de una manera sig-  
nificativa el nivel inhibitorio de los derivados butil-fenólicos. Por ejemplo, 2,  
4-diterbutilfenol fué más efectivo a 100  $\mu$ g/ml que el 2,6-diterbutilfenol a la -  
misma concentración. Muchos de los butilfenoles son tóxicos para el hombre y sus  
efectos nocivos necesitan ser estudiados en forma extensa antes de estar conside-  
rados como aplicables en alimentos.

El estudio de todos estos compuestos químicos fué con el fin de conocer cua-  
les presentaban acción antibotulínica y poder de un modo u otro ser aplicados en  
la industria cárnica para prevenir el botulismo. (40).

TABLA 1.

| Compuesto                               | Inhibición a una concentración de: ( $\mu\text{g/ml}$ ). |     |     |     |     |      |
|---|--|-----|-----|-----|-----|------|
|   | 50   | 100 | 200 | 400 | 800 | 1000 |
| <u>Días inhibidos</u>                   |  |     |     |     |     |      |
| <i>ésteres del ácido p-OH-benzóico.</i> |  |     |     |     |     |      |
| Ac. o-OH-benzóico                       | <1   | <1  | <1  | <1  | <1  | 1    |
| p-OH-benzoato de metilo                 | <1   | <1  | <1  | <1  | <1  | 1    |
| p-OH-benzoato de etilo                  | <1   | <1  | <1  | <1  | 5   | 7    |
| p-OH-benzoato de propilo                | <1   | <1  | 2   | 3   | 5   | 7    |
| p-OH-benzoato de butilo                 | <1   | <1  | 7   | -   | -   | -    |
| <i>ésteres del ácido gálico</i>         |  |     |     |     |     |      |
| Etil galato                             | <1   | <1  | <1  | <1  | <1  | 1    |
| Propil galato                           | <1   | <1  | <1  | <1  | 1   | 6    |
| Butil galato                            | <1   | <1  | 1   | 2   | 6   | 7    |
| isooxipil galato                        | <1   | <1  | <1  | <1  | 1   | 2    |
| isobutil galato                         | <1   | <1  | <1  | 2   | 7   | -    |
| isooxil galato                          | <1   | 1   | 2   | 5   | 7   | -    |
| p-octil galato                          | <1   | <1  | <1  | 7   | -   | -    |
| p-dodecil galato                        | <1   | <1  | 7   | -   | -   | -    |
| <i>Antioxidantes.</i>                   |  |     |     |     |     |      |
| BHA                                     | <1   | 4   | 7   | -   | -   | -    |
| BHT                                     | 2  | 5   | 7   | -   | -   | -    |
| Ac. nortidroguayarético                 | 3  | 7   | -   | -   | -   | -    |
| terbutil hidroquinona                   | <1   | <1  | 1   | 7   | -   | -    |
| 2,4,6-trihidrobutirofenona              | <1   | <1  | <1  | 1   | 7   | -    |

Inhibición de *Cl. botulinum* por ésteres del ác. p-OH-benzóico, ésteres del ácido gálico y antioxidantes, a diferentes concentraciones. Esta tabla ilustra los días que fué inhibido el crecimiento y la producción de toxina del *Cl. botulinum*.



TABLA II.

| Compuesto                 | Inhibición a una concentración de $\mu\text{g/ml}$ . |     |     |     |     |      |
|---------------------------|--|-----|-----|-----|-----|------|
|                           | 50   | 100 | 200 | 400 | 800 | 1000 |
|                           | <u>Días inhibidos</u>                                |     |     |     |     |      |
| Fenol                     | <1   | <1  | <1  | <1  | <1  | 1    |
| 2-fenil fenol             | <1   | 1   | 4   | 7   | -   | -    |
| 4-fenil fenol             | 1  | 7   | -   | -   | -   | -    |
| 2-isopropil fenol         | <1   | 1   | 7   | -   | -   | -    |
| 3-isopropil fenol         | <1   | 1   | 7   | -   | -   | -    |
| 2,4,6-trimetil fenol      | <1   | <1  | <1  | 1   | 4   | 5    |
| 2-cloro-5-metil fenol     | <1   | <1  | 1   | 2   | 5   | 7    |
| 2-cloro-4,5-dimetil fenol | 1  | 2   | 6   | 7   | -   | -    |
| 4-cloro-2-metil fenol     | <1   | 1   | 2   | 3   | -   | -    |
| 4-cloro-3-metil fenol     | <1   | 1   | 3   | 7   | -   | -    |
| 4-cloro-3,5-dimetil fenol | 1  | 2   | 7   | -   | -   | -    |
| 2-terbutil fenol          | 2  | 3   | 5   | 7   | -   | -    |
| 3-terbutil fenol          | <1   | 1   | 7   | -   | -   | -    |
| 4-terbutil fenol          | <1   | 1   | 5   | 7   | -   | -    |
| 2,4-diterbutil fenol      | 4  | 7   | -   | -   | -   | -    |
| 2,6-diterbutil fenol      | 2  | 3   | 6   | 7   | -   | -    |
| 2-terbutil 4-metil fenol  | 4  | 7   | -   | -   | -   | -    |
| 2-terbutil 6-metil fenol  | 2  | 5   | 7   | -   | -   | -    |
| Tinol                     | 1  | 3   | 7   | -   | -   | -    |
| 4-terbutilcatecol         | <1   | 1   | 7   | -   | -   | -    |
| Cresol                    | <1   | <1  | <1  | <1  | <1  | 1    |
| m-cresol                  | <1   | <1  | <1  | <1  | 2   | 7    |
| o-cresol                  | <1   | <1  | <1  | 1   | 5   | 6    |
| p-cresol                  | <1   | <1  | <1  | <1  | 1   | 5    |
| ác. dihidroxiacético      | <1   | <1  | <1  | <1  | <1  | 1    |
| p-cloro benzoato de sodio | <1   | <1  | <1  | <1  | <1  | 1    |

Efecto inhibitor del fenol y derivados fenólicos sobre el crecimiento, producción de toxina de *Cl. botulinum* a diferentes concentraciones. La tabla ilustra los días que fué inhibido el crecimiento y la producción de toxina. (40)

### 2.14.1 INHIBICION POR $SO_2$ .

El dióxido de azufre es un aditivo aprobado para la conservación de una variedad de alimentos. Es utilizado para la inhibición microbiana, para prevenir el oscurecimiento y como un agente reductor.

Recientes investigaciones muestran que el dióxido de azufre tiene propiedades antibotulínicas entre 450  $\mu\text{g/g}$  concentración permitida en el Reino Unido y Australia. En carnes curadas, ésta eficacia es reducida por la presencia de nitrito, es decir que el dióxido de azufre y el nitrito no son compatibles. En el Reino Unido, soluciones de metabisulfito de sodio son utilizados para remover trazas de nitrito del equipo, también una patente reciente describe el uso del dióxido de azufre como una causa mas rápida de desaparición del nitrito residual en carnes curadas tal como el tocino, Por ésto el radio entre el nitrito y el  $SO_2$  debe ser cuidadosamente considerado para aceptar un producto cárnico sin disminución de la protección microbiana.

El dióxido de azufre destruye al nitrito residual, reduciendo de éste modo la potencial formación de nitrosaminas. No ha sido reportado a otros compuestos que tengan ésta única propiedad de combinación exceto la adición o formación de ácido.

El dióxido de azufre puede ser apropiado para usarlo en algunas carnes curadas, en el caso de carnes molidas sustancias tal como el sulfito o metasulfito puede ser adicionado mezclado con los ingredientes secos o en solución inmediatamente después de la adición del nitrito. El dióxido de azufre puede ser usado en carnes o en productos de aves que no son curadas y para los que la inhibición botulínica es una clara necesidad para la misma seguridad.

Si la carne es curada o no, el uso del dióxido de azufre requerirá una investigación para determinar sus limitaciones con observación de sus efectos sobre la envoltura, apariencia y sabor en diferentes productos. Otro aspecto que puede ser considerado es que el dióxido de azufre tiene una tendencia a destruir a la tiamina, dependiendo del grado en que puede ser aprovechado por la carne.

Desde un punto de vista toxicológico el dióxido de azufre es comparable con el nitrito de sodio. El máximo aceptable de consumo mínimo diario para los humanos ha sido estimado que es de 0.7 y 0.2  $\text{mg/kg}$  para dióxido de azufre y nitrito de sodio respectivamente, (55).

### 2.14.2 EFECTO DEL SORBATO DE POTASIO.

Swoot y Pierson (48) estudia-  
ron la acción inhibitoria del sorbato de potasio sobre la germinación de esporas  
de Cl. botulinum 62A. Al adicionar al medio antes de la iniciación de la germina-  
ción de esporas 0.52% de sorbato a pH de 5.7 se inhibió ésta.

Esta inhibición es reversible y el sorbato mostró ser un inhibidor competi-  
tivo de la germinación de esporas de Cl. botulinum 62A inducido por L-alanina y  
L-cisteína.

Recientemente el sorbato de potasio con o sin otros conservadores fué intro-  
ducido en las preparaciones comerciales de pesca como un conservador para alargar  
la vida de anaquel del pescado fresco retardando la toxigenesis botulínica bajo  
condiciones anaerobias de almacenamiento.

La inhibición de la germinación de esporas y el crecimiento por el sorbato,  
se sabe que depende del pH. Por ésto no fué sorpresa encontrar que a niveles de  
1.0, 1.5 y 2.0% peso/val. a pH de 5.7 a 5.8 inhibió la aparición de las células  
vegetativas y la elongación y división celular de las células que emergían. Sin  
embargo a pH de 7.0 a 7.2 éstas concentraciones de sorbato resultaron en células  
anormales con una división celular defectuosa. Las células con división celular  
defectuosa fueron de 3 a 5 veces mas largas que las células normales y tuvieron  
dimensiones de cerca de 1.5 por 40  $\mu$ y se lisan más fácilmente que las células  
normales.

### 2.14.3 EFECTO DEL ACIDO LINOLEICO.

El uso de ácidos grasos insatu-  
rados con ó sin otros conservadores para inhibir o retardar el crecimiento de Cl.  
botulinum y la producción de toxina, parece ser muy prometedor. Sin embargo la  
aplicación está en un estado muy temprano de desarrollo.

A un pH de 7.2, una concentración de 0.01% de ácido linoleico no afectó la  
germinación y el crecimiento de esporas. Sin embargo a 0.05% de ácido linoleico  
con ó sin sorbato, previno tanto la aparición como el crecimiento celular. Esto  
es comparable con la acción de 0.8 a 1.0% de nitrito de sodio contra Cl. botulinum  
PA3679.

La cantidad de ácido linoleico requerido para inhibir la germinación de esp-  
oras de Cl. botulinum tipo E es un medio en microcultivo es mas alto que en los  
caldos complejos que han sido reportados.

La germinación de esporas de Cl. botulinum tipo A en un medio complejo es inhibida por no menos de 0.001% de ácido oleico o linoleico. Esta misma concentración de ácido linoleico en un medio complejo previno el crecimiento de Cl. botulinum tipo E por un mínimo de 5 días a 30°C, (48).

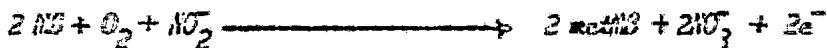
#### 2.14.4 EFECTOS DEL NITRITO.

Cuando el nitrito es puesto en un alimento, una serie compleja de reacciones da comienzo. La naturaleza de cada reacción depende de las características físico-químicas del sistema. Muchas de las reacciones no son conocidas, el nitrito adicionado a la carne es convertido en una mezcla de equilibrio de  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  y no depende del pH ni de la energía del sistema. El nitrito desaparece eventualmente como resultado de las reacciones químicas con los componentes de la carne y con la actividad metabólica de los microorganismos.

Las reacciones con la carne pueden involucrar los pigmentos hemo, las proteínas no hemo y otros compuestos. Alrededor de un 70 a 80% del nitrito añadido a la carne puede recuperarse en los siguientes porcentajes: nitrato 1:10, nitrito 5:20, gas 1:5, productos de reacción con mioglobina 5:15, con proteína 20:30, con sulfhidrilos 5:15 y con lípidos 1:15.

Algunos compuestos de la carne tales como la cistina e histidina y aditivos como el ascorbato e isoascorbato parecen ser los responsables de la mayor pérdida de nitrito. Los reductores regulan la conversión de nitrito a óxido nítrico.

Algo del nitrito se convierte en nitrato por varias reacciones químicas especialmente en presencia de ascorbato y un curado prolongado con oxígeno o algún otro agente adecuado de hidrógeno. Una ecuación para esta conversión es:



Si el nitrito está presente en cantidades excesivas en productos entizados, puede dar como resultado una oxidación excesiva del nitrógeno durante el calentamiento y puede ocurrir un abombamiento.

La velocidad de desaparición del nitrito en la carne cocida depende del pH y de la temperatura, a medida que el pH disminuye y la temperatura aumenta la velocidad de desaparición se hace mas rápida. El efecto del pH y de la temperatura en la vida media del nitrito puede calcularse mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Log}_{10} (\text{vida media en hrs.}) = 0.65 - 0.25 (T^{\circ}\text{C}) + 0.35 (\text{pH})$$

Donde 0.65, 0.25 y 0.35 son constantes.

Si la concentración de nitrito disminuye a más o menos 20 por ciento, la ecuación no procede. Algunos microorganismos pueden causar la desaparición del nitrito usando como aceptor de hidrógeno. En carnes empacadas al vacío en plástico impermeable al oxígeno, pueden actuar levaduras y bacterias. El crecimiento de algunas bacterias que reducen el nitrito persisten en este ecosistema hasta agotamiento del nitrito.

Se ha reportado algunas variaciones ocurridas en paquetes de carne curada, molida, entatada que han sido inoculadas. Algunas pruebas han sido conducidas para determinar las causas de estas variaciones y se han desarrollado algunas ideas como es, el mecanismo por el cual el nitrito inhibe al Cl. botulinum en carnes curadas. Los factores examinados en esta serie de pruebas incluye el proceso térmico y la cantidad de pigmentación muscular así como la relación del nitrito residual contra el nitrito adherido.

R.B. Tompkins y Christiansen (54,55,56,57) utilizaron un inóculo de Cl. botulinum que consistió de una mezcla de 5 tipos de la especie A y 5 de la especie B la suspensión de esponjas mezclada fue calentada a 80°C por 15 minutos y adicionada a la carne durante la formulación, usando un blanco con una concentración de 100 esponjas por gramo de producto, adicionaron  $\text{NaNO}_2$  a concentraciones de 50 a 156  $\mu\text{g/g}$ , sobre la base del peso total de la carne formulada.

El efecto de temperatura de procesamiento fue probado por la colocación de las latas en agua a 77°C hasta que la temperatura interna del producto fue de 63, 65.5, 68.5, 71 y 74°C.

25 latas para cada temperatura fueron removidas y enfriadas rápidamente en agua de hielo y a continuación incubadas a 21°C por 110 días siendo removidas de la incubación conforme se abombaban. Las primeras 5 latas que se abombaron de cada variable fueron probadas para la toxina botulínica. En estas series de pruebas solamente 2 de las 80 muestras probadas no fueron tóxicas.

El procesamiento de carne de resaca curada, molida y entatada con 156  $\mu\text{g/g}$  de  $\text{NaNO}_2$  a una temperatura interna de 63 a 74°C no tuvo influencia en el grado de

inhibición botulínica. La cuenta viable de Cl. botulinum y la concentración residual de  $\text{NaNO}_2$  después del procesamiento no mostró una diferencia relativa a la temperatura del proceso.

Aumentando el pigmento adicionado en forma de hemoglobina decreció la inhibición botulínica. La adición de un 1% de hemoglobina tuvo un efecto neto de reducción del  $\text{NaNO}_2$  después del cocimiento de cerca de 25  $\mu\text{g/g}$ . La respuesta observada con 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{NaNO}_2$  adicionado junto con la hemoglobina fue la misma que la obtenida cuando no se adicionó nitrito al producto.

La estabilidad de carne curada, entataca, almacenada ha sido encontrada que se debe al nivel bajo de contaminación con esporas en la carne y al efecto dañino en las esporas durante el proceso térmico en presencia de  $\text{NaNO}_2$ . Efecto dañino fue el término usado para describir la incapacidad de las esporas sobrevivientes que proliferan en el producto, aun cuando su viabilidad este vigente.

En 1962 se encontró de 7 carnes empacadas examinadas el valor del proceso térmico para el almacenamiento de carnes curadas entatadas en un rango de  $F_0 = 0.1$  a 0.5 con un valor medio de 0.2. Este proceso térmico implica un rango de temperatura de 104 a 116°C. En un estudio con producto inoculado una reducción aproximada de log 4 a log 5 de esporas viables de Cl. botulinum ocurrió durante el proceso térmico. De éste modo el proceso para conservar en anaqueles a carnes curadas entatadas envuelve a ambas, destrucción térmica y efecto dañino.

Ha sido reportado que aumentando la concentración de nitrito de 30 a 340  $\mu\text{g/g}$  mostraron un aumento en la inhibición cuando las esporas de Cl. botulinum fue adicionadas al tocino después del procesamiento. Esta es una evidencia adicional de que el grado de inhibición botulínica no es función del color en carnes curadas, procesadas ligeramente.

Christiansen y colaboradores concluyeron que es la concentración de nitrito adicionado al tiempo de la formulación antes que el nitrito residual en el producto durante el almacenamiento la causa de la inhibición botulínica. Esta conclusión fue tomada sobre la base que el patrón de abombamiento botulínico pareció estar relacionada a la concentración de nitrito residual. Sin embargo, hubo un patrón definitivo que la velocidad de abombamiento y aparición de toxina correspondió con la concentración administrada de nitrito.

Se esta proponiendo la reducción del nitrito residual para productos cárnicos a un nivel más bajo, para reducir la posibilidad de formación de nitrosaminas al tiempo en que los alimentos sean consumidos.

El nitrito reacciona con la mioglobina de la carne y produce el color característico de la carne curada.

pareció lógico entonces que al adicionar un pigmento con coloramiento del grupo hemo al producto probaría una diferencia en contra del nitrato residual.

La hemoglobina fué usado para éste propósito, aumentando la concentración de pigmentación por la hemoglobina, se redujo tanto la cantidad de nitrato residual proveniente de sustrato como el grado de inhibición. Esto sugiere que es inadecuado probar que la concentración de nitrato residual no influye en la velocidad a que inicia el crecimiento el *C. botulinum* y abombamiento de las latas. Lo anterior resalta la posibilidad de que la variación en la pigmentación del músculo tiene gran influencia en la eficacia del nitrato en la carne.

El significado de la pigmentación es confirmado con la prueba de diferentes tipos de carne: corazón de vaca y de bovina, músculo y jamón de cerdo, rodajas de carne, mezcla de varios cortes de carne de ternera, pechuga y muslo de cordero. Se adicionó una concentración de  $\text{NaNO}_2$  de  $156 \mu\text{g/g}$ , no fueron hechos ajustes por las diferencias en el contenido de gordura en la carne. Una muestra anterior con carne de vaca pudo demostrar que el contenido de grasa no tiene influencia en la inhibición botulínica.

La pérdida total de la inhibición en la carne de corazón es inexplicable, - la carne de corazón es más intensamente coloreada que las otras carnes probadas, sin embargo, la razón por la pérdida de la inhibición no es obvia. Una explicación anteriorizada es que algún factor en la carne de corazón estimula el crecimiento botulínico, otra posibilidad es que algún factor presente neutraliza o bloquea la inhibición natural del nitrato residual. El dato completo sugiere que éste factor está en proporción aproximada al grado de pigmentación.

La pigmentación del músculo es debida a la mioglobina y un poco menos a la hemoglobina inmediatamente después de que el animal suelta sangre. Se supone que las muestras obtenidas con la adición de hemoglobina y el uso de carne de corazón representaban dos fenómenos diferentes. El efecto inhibitorio del nitrato residual observado en la muestra con hemoglobina fué sobrepujado por algunos factores orgánicos presentes en la carne de corazón, investigaciones adicionales sugieren que es una alta concentración de hierro fácilmente disponible en la carne de corazón que causa ésta pérdida de inhibición. El enlace del hierro en forma de pigmento hemo no causa el mismo efecto. Se cree que es un mecanismo por el cual el nitrato es un inhibidor del crecimiento botulínico en carnes curadas enteradas. Se propone la hipótesis de que el óxido nítrico que es la raíz del nitrato residual vía óxido nítrico reacciona con el hierro de las células vegetativas, bloqueando así algunos pasos metabólicos esenciales para el crecimiento. (6).

El nitrito utilizado para curar carnes, produce productos con apariencia deseable, características organolépticas específicas y con una estabilidad microbiológica. Ha sido propuesto una reducción en la cantidad de nitrito para la curación de las carnes ya que han sido detectado pequeñas cantidades de nitrosaminas cancerígenas en algunos productos. Una reducción en la concentración del nitrito puede ser una solución simple para el problema cancerígeno, pero de tal acción se cree que resulta productos que tienen una estabilidad microbiana no aceptable representando un peligro para el consumidor.

#### 2.14.5 MEJORAMIENTO DE LA ACCIÓN DEL NITRITO POR EL ASCORBATO E ISO-ASCORBATO DE SODIO.

En el caso de que el nivel de nitrito permisible fuera disminuido, será necesario suplementar o mejorar el efecto antibotulínico del nitrito, por lo que se han establecido estudios para la evaluación de aditivos que podrían reemplazar o mejorar el efecto del nitrito. Uno de los compuestos que mejoró el efecto del nitrito fué el ascorbato de sodio y un esteroisómero isoascorbato de sodio, aumentando la velocidad del curado, desarrollando un color más estable y retardando la rancidez oxidativa.

Borenstein (54) enumera las funciones del isoascorbato como sigue:

- a).- Actúa como un receptor de oxígeno.
- b).- Cambia el potencial REDOX del sistema, reduciéndolo.
- c).- Reduce los productos de oxidación indeseables.

El uso de ascorbato e isoascorbato a mediados de 1950 fué un factor moderno permitiendo rápidos procesamiento de carnes curadas. De éste modo ascorbato e isoascorbato fueron introducidos a la industria cárnica. Investigaciones realizadas mostraron que el ácido ascórbico es de valor para el control microbiológico de carnes curadas enlatadas, que se han sometido a un proceso térmico reducido.

Sin embargo, el isoascorbato es ahora utilizado en la industria cárnica de los Estados Unidos, su valor en el mejoramiento del efecto microbiano del nitrito ha sido reconocido. Se cree ahora que el isoascorbato puede ayudar a reducir la formación de nitrosaminas particularmente en el tocino. De todas formas no es clara el nivel óptimo de isoascorbato para reducir ésta formación, compatible con el nivel deseado para la inhibición botulínica.

L. A. Christiansen y colaboradores estudiaron el efecto del isoascorbato en



carnes curadas, para esto utilizaron un inóculo de *Cl. botulinum* que consistió de una mezcla de 5 tipos (73, 74, 521, 771 y 12885A) y 5 tipos B (ATCC 7949, 41B, 535, 2133 y Lananna 6). La mezcla de esporas en suspensión fue calentada y aspi-  
rada a 80°C por 15 minutos y se adicionó a la carne durante la formulación.

Carne de puerco molida fue formulada con sal, agua, azúcar, inoculada y en-  
casetada. El isoascorbato de sodio fue incluido a una concentración de 0.02% sobre  
la base del peso de la carne en la formulación. El nitrito de sodio fue adiciona-  
do a concentraciones de 75 y 150 µg/g.

El análisis de las variables del producto en las pruebas dieron los siguien-  
tes resultados:

- Sol ..... 2.3 a 2.4%
- Humedad ..... 57.5 a 59.6%
- Salmuera ..... 3.2 a 4.0%

25 latas de producto inoculado para varias pruebas fueron colocadas a 27°C  
por 110 días y se retiraron conforme se ablandaron.

Los resultados en la figura (6) muestra que el isoascorbato sólo a una con-  
centración de 0.02% no afecta al crecimiento botulínico. En ésta prueba un corto  
retardo de éste crecimiento fue observado cuando se utilizó 75 µg de nitrito de  
sodio por gramo.

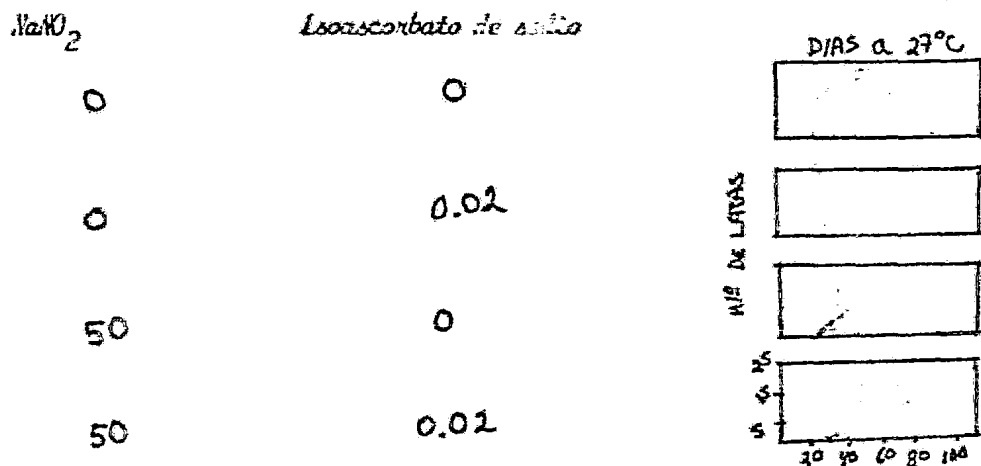


Figura (6). Efecto del isoascorbato de sodio a una concentración de 0.02%  
sobre el crecimiento botulínico.

Los resultados de una segunda prueba se muestra en la figura (7). El isoas-  
corbato sólo no retardó el crecimiento botulínico, el nitrito de sodio sólo a una  
concentración de 75 µg/g. causó un corto retardo. Sin embargo el isoascorbato y  
nitrito de sodio a 150 µg/g., causó un significativo retardo en el tiempo de acribi-

miento de las latas.

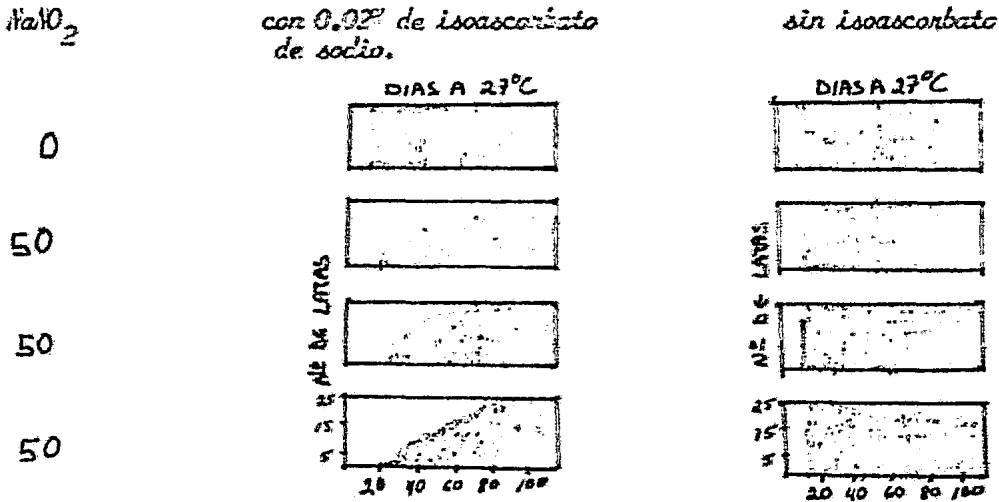


Figura (7). Ilustración del efecto que tiene la combinación de isoascorbato a una concentración de 0.02% y nitrito de sodio a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{g}$  sobre el crecimiento botulínico.

En una tercera prueba si una (8) 50  $\mu\text{g}/\text{g}$  de nitrito de sodio no retardó el crecimiento botulínico. El isoascorbato a una concentración de 0.02% más 50  $\mu\text{g}/\text{g}$  de nitrito de sodio causó una apreciable inhibición. El nitrito de sodio adicionado a una concentración de 156  $\mu\text{g}/\text{g}$  dió resultados equivalentes a la combinación de isoascorbato más 50  $\mu\text{g}/\text{g}$  de nitrito de sodio. La combinación con isoascorbato y 156  $\mu\text{g}/\text{g}$  de nitrito de sodio causaron un retraso pronunciado en la velocidad de aboramiento en las latas.

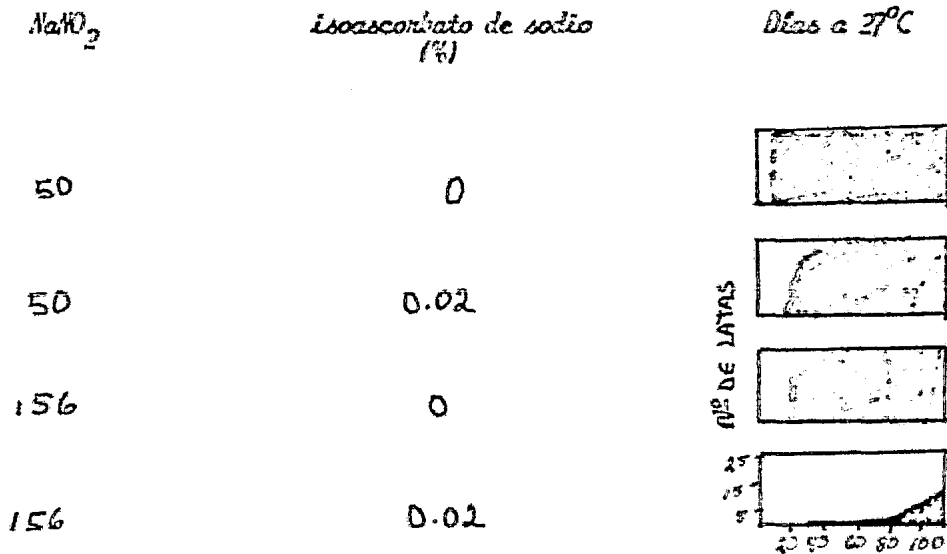


Figura (8). Efecto del isoascorbato a una concentración de 0.07% y nitrito de sodio a una concentración de 150 µg/g sobre la velocidad de abombamiento de las latas.

Una cuarta prueba fue conducida para evaluar el orden de adición del isoascorbato. 3 latas de cada 25 fueron preparadas en donde isoascorbato (0.07%) y nitrito de sodio (50 µg/g) y las esporas fueron adicionados a la carne, mezclados y enlatados. Este viene siendo el procedimiento normal para la preparación del producto prueba. Una segunda muestra de 3 latas fueron preparadas donde el isoascorbato y las esporas se mezclaron con la carne y después se añadió el nitrito (50 µg/g) mezclándose bien y enlatados. Los resultados encontrados fueron los mismos esto quiere decir, que el orden de la adición del isoascorbato y del nitrito como se descubrió no es un factor crítico.

#### 2.14.6 EFECTO DE LOS NIVELES DE CURACIÓN.

A niveles u bajo condiciones usadas comúnmente, los agentes de curación no causan una rápida destrucción de los microorganismos, retardan o previenen el crecimiento de micras aerobias - indeseables en productos no calentados y esporas no termotolerantes formadas en productos no pasteurizados. La protección contra la descomposición de carne en anaerobios por microorganismos anaerobios más activos ha sido estudiada a fondo y es usado para probar la eficacia de un proceso térmico.

La siguiente fórmula está basada sobre la descomposición ocurrida en tubos de carne curada, procesada a 115°C por 3 minutos y almacenada a 23°C por 150 días, cada tubo contenía 10<sup>5</sup> esporas antes de procesarlo.

$$Y = -322 + 73.9 (\text{pH}) - 0.115 (N) - 24.7 (S)$$

donde:

Y es el % de paquetes descomuestos en 150 días a 23°C.

pH en un rango de 5.5 a 6.5

N es la concentración de nitrito de sodio en un rango de 0 a 200 ppm.

S es la concentración de sal en un rango de 1.5 a 2.0

Esta fórmula sugiere que la misma cantidad de actividad inhibitoria contra la descomposición puede ser obtenida en carnes ahumadas por un aumento de 0.1 unidades de pH, un aumento de 65 ppm de nitrito o un aumento de 0.2% de sal.

El mecanismo preciso de la inhibición bacteriana por el nitrito no es conocido. El efecto de la concentración de nitrito las esporas oxalicas y su efecto

las vegetativas pueden desnaturalizarse o morir lentamente. Si ocurre crecimiento, puede ser inhibido o puede aumentar conforme la concentración del nitrito sea disminuida. La velocidad de la muerte es una función del pH y de la concentración de nitrito. A pH de 5.5 a 4.0 puede ocurrir una rápida destrucción de células vegetativas y es posible que carnes de la misma especie también. No se explica el gran número de bacterias viables presentes en salchichas fermentadas conteniendo nitrito a pH de 5.5 a 4.5, es posible que el nitrito desaparezca rápidamente durante la fermentación.

Algún posible mecanismo bioquímico que inhibe el crecimiento son las reacciones con grupos amino o con constituyentes de la célula que contienen sulfhidrilos. Algunos trabajos en muchos Clostridium proponen una reacción entre el óxido nítrico y el hierro a una ferredoxina o un compuesto similar en que se involucra un transporte de electrones. También sugiere que el producto de reacción es reversible pero estable mientras este presente una reserva de nitrito. Carnes con un alto contenido de hierro de forma en que se enlace con el óxido nítrico hace que éste no sea aprovechado al reaccionar con el mecanismo respiratorio del Clostridium.

Desde un punto de vista de conservación y seguridad la concentración de nitrito usado comercialmente puede ser agregado como un bacteriostático o como un precursor del Factor tipo Périgo (PTF). El factor tipo périgo es inhibitorio para Clostridium en carnes enlatadas almacenadas.

El factor périgo (PF) es un material inhibitorio o materiales formados cuando el nitrito (5-20 ppm) es calentado a 90 - 130 °C en algún medio bacteriano. El PF es altamente inhibitorio para Clostridium pero no es inhibitorio para muchos bacilos, Streptococcus fecales o Salmonella.

A diferencia del nitrito la actividad inhibitoria del PF no depende del pH y si es multiplicado por la carne. Esto hace muy improbable que el PF prevenga el crecimiento microbiano en la carne. El factor tipo périgo (PTF) es un nombre dado a productos antibacterianos formados cuando el nitrito es calentado con la carne. Pero el PTF en carnes tiene muy poca actividad microbiana comparado con el PF en un medio bacteriológico. Sin embargo, el PTF juega un papel importante en la prevención del crecimiento de un número pequeño de esporas de Clostridium que sobreviven al proceso térmico de productos que se almacenan. (6,9,25,39,44,54).

## 2.14.7 BACTERIAS QUE IMPIDEN EL CRECIMIENTO BOTULÍNICO.

Harinos mencion

hora de algunas especies de bacterias que tienen una acción inhibitoria contra el crecimiento de C. botulinum, este estudio se efectuó en C. botulinum tipo C.

Se estudiaron 54 muestras de lodo o suelo que habían dado un resultado negativo para C. botulinum aún después de que habían sido inoculados con un pequeño número de esporas tipo C.

De 24 de éstas muestras fueron separadas 108 especies de "bacterias inhibidoras", como colonias que producen sustancias difusibles que inhiben el crecimiento del C. botulinum tipo C serotipo F115513.

La mayoría de las bacterias aisladas (73%) son bacilos sp. de los cuales un 45% fueron bacilos similares a B. cereus.

De las 108 especies de bacterias separadas se formaron 3 grupos:

- a) Bacilos escurridos Gram (+). (Bacillus sp.)
- b) Bacilos no escurridos Gram (+).
- c) Cocos Gram (+).

No fué posible identificar completamente los grupos b y c, por lo que respecta a bacilos Gram (-) no fueron aislados.

Ninguna de las especies aisladas, muchas de las cuales eran bacillus sp. desnaturalizaron a la toxina preformada. Esto es un contraste a las investigaciones de Inoué y Holt quienes supusieron que el ataque del botulismo en el agua ocurre cuando el balance entre la toxina producida y su desnaturalización por organismos aerobios es exaltado en favor de la toxicógenesis por medios ambientales tales como las condiciones anaerobias que se producen en la putrefacción de vegetales.

Vintis y colaboradores muestrearon un área acuática alrededor de un año y detectaron C. botulinum tipo E en los meses de junio a agosto, pero no de octubre a mayo.

De las muestras colectadas entre octubre y mayo fué aislado Bacillus ticheni formis y esto supuso que alguna sustancia producida por éste organismo inhibió el crecimiento de C. botulinum.

De las 7 "especies inhibitorias" estudiadas, todas produjeron antibióticos. Algunas especies produjeron más de 5 antibióticos diferentes con actividad contra C. botulinum tipo C (17)

## 2.15 IMPORTANCIA SANITARIA.

La carida de origen animal es un vehiculo en potencia y un medio óptimo para el crecimiento de microorganismos patógenos para los consumidores. Especialmente en México donde no existen los requerimientos higiénicos necesarios durante el proceso y el almacenamiento. Por otro lado excepto en el caso de carne enlatada, no existe un proceso de calentamiento del alimento antes de su distribución. Por lo tanto es de suma importancia tomar medidas higiénicas durante dicho proceso.

La higiene de la producción de carne debe empezar con la prevención de enfermedades en la crianza y engorda de las manadas. Es importante tener cuidado en la transportación de éstos animales a los mataderos. Debe evitarse la tensión de los animales y los establos deberán limpiarse regularmente y desinfectarse. En los últimos años la transportación de carne ha aumentado y las distancias son mayores por lo que es importante tomar medidas estrictas.

Durante el proceso es muy importante la absoluta separación de las vísceras abdominales del resto del cuerpo del animal. Este problema podrá ser ópticamente resuelto si los cueros y vísceras son transportados directamente del cuerpo del animal a otro piso.

Las medidas profilácticas durante la producción de carne consisten en la mecanización del matadero, tanto como sea posible desde que se quita el cuero del animal, hasta la división de la carcasa y el transporte automático de las mismas, todo esto minimiza el contacto de la carne con manos, ropa y herramientas de los trabajadores.

Las manos y las herramientas transmiten enormes cantidades de microorganismos de los abederos, cueros y heces al cuerpo (carcasa) del animal, que originalmente no contiene nada de contaminantes.

Para evitar lo anterior se deben instalar unidades de limpieza y desinfección lo mas cerca posible de la áreas de trabajo que deben contar con agua caliente y desinfectantes.

Cada corte en la carne incrementa la posibilidad de contaminación y multiplicación de microorganismos. Las investigaciones demuestran que la multiplicación de bacterias depende en forma proporcional al número de cortes. En muchos países el almacenamiento de trozos de carne congelada está prohibido.

Un paso esencial en la prevención de intoxicaciones es la inspección regular de las plantas procesadoras. Un método objetivo es el análisis bacteriológico cualitativo y cuantitativo de productos semiterminados (49).

## CAPÍTULO III.

### CONCLUSIONES.

1.- El botulismo es una enfermedad mundial, ya que su incidencia se ha demostrado por los reportes de éste en los Estados Unidos, la India, Argentina, Kenya, Australia, etc.

2.- De acuerdo a estudios de algunos investigadores existen algunos conservantes químicos que son muy eficientes para inhibir el crecimiento y la producción de toxina de Cl. botulinum entre los que destacan los derivados butilfenólicos y los ésteres de cadena larga de los ácidos gálico y *p*-H-benzpico.

3.- Al añadir isoscorbato durante el proceso de curación de carnes, éste mejoró marcadamente la inhibición del Cl. botulinum debido al nitrito, no importando el orden en que es añadido.

4.- Algunos aditivos alimenticios directos e indirectos tales como: ácido benzoico, benzoato de sodio, ácido dihidroxiacético, ácido *o*-hidroxibenzoico, *o*-cloro benzoato de sodio, mostraron muy poca actividad inhibitoria botulínica, aún a concentraciones altas de 1000 µg/g.

5.- La germinación de esporas de Cl. botulinum tipo A en un medio complejo es inhibida por no menos de 0.001% de ácido oleico o linoleico.

6.- Aumentando el nitrógeno en la curación de una carne, adicionado éste en forma de hemoglobina, disminuye la inhibición botulínica.

7.- La acción del nitrito se explica debido a algún posible mecanismo bioquímico, que inhibe el crecimiento y son las reacciones con grupos amino o con constituyentes de la célula que contienen sulhidrilos.

8.- A pH de 7.2, 0.2% de ácido linoleico no afectó la germinación y el crecimiento vegetativo, sin embargo a 0.05% con o sin corcato, previno tanto la germinación de esporas como el crecimiento vegetativo.

9.- Se recomienda que durante la elaboración de carnes curadas, se continúe haciendo uso del isoscorbato de sodio conjuntamente con el nitrito de sodio, ya que se ha comprobado que se obtienen mejores resultados sobre la inhibición botulínica porque el isoscorbato mejora la acción del nitrito, reduciéndose disminuir la concentración de éste, disminuyendo con ésto la posible formación de nitrosaminas cancerígenas.

10.- Un paso que hay que tomar muy en cuenta es la obtención de la carne, desde el sacrificio del animal, ya que para lograr un producto de óptima calidad debe de partirse de materia prima de buena calidad, por lo que se debe tener cuidado en la técnica de cortado de las piezas del animal, así como de las condiciones sanitarias, muy importantes para obtener una pieza de carne con bajo contenido bacteriano, antes de procesarlo.



## CAPITULO IV

### BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Arias E.J., P. Si. Lezana and A. Si. Simons.  
*Introducción a la toxicología*  
Editorial Diana  
México. 1978.
- 2.- Anon Stephen S. and J. Chin.  
*The Clinical Spectrum of Infant Botulism.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1, No. 4, July-August 1979, pag. 614-624.
- 3.- Borventre Peter F.  
*Absorption of Botulinal Toxin from the Gastrointestinal Tract.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1, No. 4, July-August 1979, pag. 663-667.
- 4.- Brown Lawrence W.  
*Differential Diagnosis of Infant Botulism.*  
*Reviews of Infectious Diseases*  
Vol. 1, No. 4, July-August 1979 pag. 625-629.
- 5.- Chin J., S.S. Anon and T.F. Midura.  
*Food and Environmental Aspects of Infant Botulism in California.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1, No. 4, July-August 1979 Pag. 693-697.
- 6.- Christiansen L.W., R.D. Johnson, A.A. Kauter, J.M. Howard and R.J. Anon.  
*Effect of Nitrite and Nitrate on Toxin Production by Cl. botulinum and on Nitrosamine production in Perishable canned comminuted cured meat.*  
*Applied and Environmental Microbiology*  
1973. 25: 357-362.
- 7.- Cox D.J.  
*Hydrolytic and fermentative properties of Clostridium Species Isolated from Digesting Sludge.*  
*Journal of Applied Bacteriology*  
1972. 45 : 259-266.
- 8.- Davis B.D., R. Delbecq, H.S. Cineberg and J.B. Loug.  
*Tratado de Microbiología.*  
Salvat editores S.A. México 1977.

- 9.- Desrosier H. Norman.  
*Elements of Food Technology*  
Avi publishing Company  
Westport, Connecticut. 1977.
- 10.- Duncan C.L. and Lilli Foster.  
*Effect of sodium nitrite, sodium Chloride and Sodium Acetate on Germination and Outgrowth of Anaerobic Spores.*  
*Applied and Environmental Microbiology*  
1968. 16 : 406-411.
- 11.- Dyett E.J. and D. Shelley.  
*The Effects of Sulphite Preservative in British Fresh Sausages.*  
*Journal Applied Bacteriology.*  
1966. 29 : 439-446.
- 12.- Dymichy M. and C.M. Huhtanen.  
*Inhibition of Cl. botulinum by p-hydroxybenzoic acid n-alkyl-esters.*  
*Antimicrobial Agents Chemother*  
1979. 15 : 798- 801.
- 13.- Eronczek E. Van.  
*A New Anaerobic Bacillus and its Relation to Botulism.*  
*Reviews of infectious diseases.*  
Vol. 1, No. 4. July-August 1979. pag. 701-719.
- 14.- Ezquivel Vazquez Domingo.  
*Toxicología en carnes Frías.*  
México 1978. TESIS.
- 15.- Frazier J.C.  
*Microbiología de los Alimentos*  
Editorial Acubia  
Zaragoza España. 1976.
- 16.- Gill C.D. and W. Penney.  
*Penetration of Bacteria into Meat.*  
*Applied and Environmental Microbiology.*  
June 1977 p. 1284-1286 Vol. 33 No. 6.
- 17.- Graham J.M.  
*Inhibition of Cl. botulinum type C by Bacteria Isolated from Mud.*  
*Journal of Applied Bacteriology.*  
1978. 45 : 205-211.

- 16.- Gross H. and L.-I. Anway.  
*Effects of Temperature on Spore Germination and Vegetative Cell Growth of*  
*Cl. botulinum.*  
*Applied and Environmental Microbiology*  
Feb. 1982 p.371-377, Vol. 41, No. 2.
- 17.- Gunn Robert A.  
*Botulism: From an Emergency to a Prevalent*  
*in Comment.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1 No. 4 July-August 1979. p.522-527.
- 18.- Gunn Robert A.  
*Epidemiologic Characteristics of Infant Botulism in the United States, 1975-*  
*1978.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1 No. 4, July-August 1979. p. 642-646.
- 19.- Haines R.S.  
*The Occurrence of Toxicogenic Anaerobes, Especially Cl. botulinum in Some En-*  
*glish Soil.*  
*Journal of Hygiene.*  
Cambridge 1962 62 : 227-237.
- 20.- Hathway Charles L.  
*Laboratory Procedures for Cases of Suspected Infant Botulism.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1 No. 4, July-August 1979 p. 652-657.
- 21.- Hentges David J.  
*The Intestinal Flora and Infant Botulism.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1, No. 4, July-August 1979 p. 649-51.
- 22.- Howard R. (ed.).  
*Food Safety.*  
Academy of Food Science, 1977.
- 23.- Javel's Dennis G.  
*The Remedial and Preventive Measures of Food and Foodborne Botulism.*  
*International Encyclopedia of*  
New York 1977, Vol. 1.

- 26.- Jareise E., Joseph L. Melnick, Ed. andebberg.  
*Manual de Microbiología Médica.*  
Editorial El Manual Moderno.  
México 1977. 6va. Edición.
- 27.- Komarik S.L., Tressler D.K., and Long L.  
*Food Products Formulary.*  
The Avi Publishing Company INC.  
Westport, Connecticut 1974 Vol. 1.
- 28.- Koneman Elmer W., S.D. Allen, V.R. Jewell, H.H. Sommers.  
*Caton Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.*  
J.B. Lippincott Company.  
Philadelphia 1979.
- 29.- Lee S.H., P.T. Cassens and H. Supiyana.  
*Factors Affecting Inhibition of Cl. botulinum in cured Meats.*  
*Journal of Food Science.*  
Vol. 43 No. 5 p. 1371-1374 1978.
- 30.- Metzger J.F. and G.E. Lewis Jr.  
*Human-Derived Inverse Globulins for the Treatment of Botulism.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1 No. 4 p. 680-692 July-August 1979.
- 31.- Vidua Thaldens F.  
*Laboratory Aspects of Infant Botulism in California.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1 No. 4 p. 652-655 July-August 1979.
- 32.- Moran Romero Carolina.  
*Incidencia de Botulismo en Alimentos.*  
Ed. Zavala Iquique. FESUIS.  
México 1979.
- 33.- Nelson John D.  
*Current Perspectives and Priorities for Research in Infant Botulism.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1 No. 4 p. 678-700 July-August 1979.
- 34.- Ohye D.F. and L.S. Scott.  
*Studies in the Physiology of Cl. botulinum Tipo I.*  
*Journal Biological Science.*  
Vol. 10: 85-94 1957.

- 35.- Pechtan Gladys G.  
*Foundations of Food Preparation.*  
McC. Millan Publishing Co. INC.  
Third Edition New York 1974.
- 36.- Pelczar M.J. and Roger D. Reid.  
*Microbiologia.*  
Libros McGraw-Hill.  
México 1977.
- 37.- Peterson D.R., M.S. Eklund and N. Chinn.  
*The Sudden Infant Death Syndrome and Infant Botulism.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1 No. 4 p.630-636 July-August 1979.
- 38.- Potter N. Norman, Ph. D.  
*La ciencia de los alimentos.*  
Edutex S.A.  
México 1973.
- 39.- Rayman M.K., B. Aris and A. Hurst.  
*Nisin: A Possible Alternative or Adjunct to Nitrite in the Preservation of Meats.*  
*Applied and Environmental Microbiology.*  
Vol. 41 No. 2 p. 75-80 Feb. 1981.
- 40.- Reddy N.R., B.D. Pierson and R.V. Lechowich.  
*Inhibition of Ct. botulinum by Antioxidants, Phenols and compounds related.*  
Vol. 42 No. 4 p. 835-839 April 1982.
- 41.- Rhodes H.C. and P. Jarvis.  
*A York Slurry System for Studying inhibition of Ct. botulinum by Curing Salts*  
*Journal Food Technology.*  
Vol. 11: 13-23 1976.
- 42.- Rhodes H.C. and P. Pierson.  
*Influence of o-aminobenzoic acid esters on the growth and toxin production of Ct. botulinum 1975a.*  
*Journal Food Science.*  
Vol. 43: 787-790 1978.
- 43.- Rhodes H.C. and P. Pierson.  
*Inhibition of Ct. botulinum types 1 and 2 by Phenolic antioxidants.*  
*Journal Food Protection.*

Vol. 42: 858-861 1979.

- 44.- Roback M.C., F.J. Ivey and C.S. Hickey.  
*System for evaluating Clostridial Inhibition in Cured Meat Products.*  
*Applied and Environmental Microbiology.*  
Vol. 36 No.1 p.210-212 July 1978.
- 45.- Sauter E.A., J.D.Kern and B.E. Langlois.  
*Effect of Nitrite and erythorbate on recovery of Cl. perfringens spores in -  
cured pork.*  
*Journal of Food Science.*  
Vol. 43 No. 6 1977.
- 46.- Schiller C.M. and R. Walden.  
*Processes of Transport and Absorption in the Developing Infant Intestine.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1 No. 4 p.674-682 July-August 1979.
- 47.- Serrano Lopez B. Gpe.  
*Incidencia de Cl. perfringens en carnes y su importancia sanitaria.*  
TESIS. México 1978.
- 48.- Seward R.H., Robert H. Deibel and R.C. Lindsay.  
*Effects of Potassium Sorbate and other antibotulinal agents on germination -  
and outgrowth of Cl. botulinum tipo E. spores in microcultures.*  
*Applied and Environmental Microbiology.*  
Vol. 44 No. 5 p.1212-1221 Nov. 1982.
- 49.- Simson Lance L.  
*The Action of Botulinal Toxin.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1 No. 4 July-August 1979 p. 656-662.
- 50.- Smith Louis D.S.  
*Clostridium botulinum: Characteristics and occurrence.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1 No. 4 p.637-644 July-August 1979.
- 51.- Suiyama Hiroshi.  
*Animal Models for the Study of Infant Botulism.*  
*Reviews of Infectious Diseases.*  
Vol. 1 No. 4 p.682-687 July-August 1979.
- 52.- Suiyama Hiroshi.  
*Clostridium botulinum Neurotoxin.*

*Microbiological Reviews.*

p.419-448 Sep. 1980.

53.- Todd-Sanford.

*Diagnóstico clínico por el laboratorio.*

Ed. Salvat, 6a. Edición.

México 1978.

54.- Tomplin R.B., L.N. Christiansen and A.B. Shapereis.

*Enhancing Nitrite Inhibition of Cl. botulinum with isoascorbate in perishable canned meat.*

*Applied and Environmental Microbiology.*

Vol. 35 No. 1 p. 59-62 Jan 1978

55.- Tomplin R.B., L.N. Christiansen and A.B. Shapereis.

*Effect of prior refrigeration on botulinal outgrowth in perishable canned - meat when temperature abused.*

*Applied and Environmental Microbiology.*

p. 863-866 Nov. 1977.

56.- Tomplin R.B., L.N. Christiansen and A.B. Shapereis.

*Antibotulinal efficacy of sulfur dioxide on meat.*

*Applied and Environmental Microbiology.*

Vol. 39 No. 4 Jun 1980.

57.- Tomplin R.B., L.N. Christiansen and A.B. Shapereis.

*Causes of variation in botulinal inhibition in perishable canned cured meat.*

*Applied and Environmental Microbiology.*

p. 886-889 May 1978.

58.- Wilhelm K.E., B.B. Marsh and J.V. Lochner.

*High-Temperature tenderizing of beef sides: Bacterial considerations.*

*Applied and Environmental Microbiology.*

Vol. 44 No. 5 p.1243-1245 Nov. 1982.

59.- Vidar CH. and T.F. Midura.

*Effects of Cl. botulinum toxins on infant and adult mice.*

*Applied and Environmental Microbiology.*

Vol. 43 No. 4 p.955-957 Apr. 1982.