



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA COMBINACIÓN DE LA BACTERIOCINA 29
CON CONSERVADORES COMERCIALES SOBRE LA CALIDAD
SANITARIA DE UNA EMULSIÓN CÁRNICA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

LUIS ARTURO AGUADO BAUTISTA

MÉXICO, D.F.

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: María del Carmen Wachter Rodarte

VOCAL: Profesor: Luis Orlando Abrajan Villaseñor

SECRETARIO: Profesor: Edith Ponce Alquicira

1er. SUPLENTE: Profesor: Martha Giles Gómez

2° SUPLENTE: Profesor: Norma Angélica Camacho de La Rosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA, DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD, DEPTO. BIOTECNOLOGÍA, LABORATORIO S-132. AV. SAN RAFAEL ATLIXCO No. 186. COLONIA VICENTINA, IZTAPALAPA, MÉXICO D.F.

PROYECTO SEP-CONACYT 2008-105870 “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIOCINAS Y SU INCLUSIÓN EN EL DISEÑO DE EMPAQUES BIODEGRADABLES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA”

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Edith Ponce Alquicira

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Yenizey Merit Álvarez Cisneros

SUSTENTANTE:

T en C. Luis Arturo Aguado Bautista



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACEPTACIÓN DE LA PRUEBA ESCRITA POR EL JURADO

(anexo III)

**SR. DIRECTOR DE LA FACULTAD DE QUÍMICA
PRESENTE.**

LA PRUEBA ESCRITA que presenta:

Luis Arturo Aguado Bautista

de la carrera: Química de Alimentos

cuyo Título es: Estudio de la combinación de la bacteriocinas 29 con conservadores
comerciales sobre la calidad sanitaria de una emulsión cárnica

dentro de la opción: Titulación por tesis

ES DE ACEPTARSE

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria D.F. a 28 de Octubre de 2011.

EL JURADO REVISOR

Profesor Maria del Carmen Wachter Rodarte

Maria del Carmen Wachter

Profesor Luis Orlando Abrajan Villaseñor

Profesor Edith Ponce Alquicira

*Si es mancomunada, indicar con quien.

Resumen

La conservación de alimentos mediante tecnologías de barreras busca mantener las cualidades organolépticas en el producto final con la combinación de técnicas de conservación tradicionales de baja intensidad que actúan como barreras para impedir o retrasar las reacciones de deterioro. Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por bacterias y junto con los lactatos son considerados conservadores de origen natural; los nitritos son aditivos inorgánicos cuya función es asegurar la calidad microbiológica de productos cárnicos, a la vez que imparten características de aroma, sabor y color específicos. El objetivo de este trabajo fue aplicar diferentes combinaciones de la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK 29 y de antimicrobianos (lactato de sodio y nitrito de sodio) a una emulsión cárnica empacada al vacío para evaluar su calidad higiénico-sanitaria.

La bacteriocina fue extraída de un cultivo de *E. faecium* MXVK 29 y se determinó su actividad antimicrobiana. Se utilizó un arreglo de ajedrez para evaluar las combinaciones de los diferentes conservadores comerciales utilizados (nitritos, sorbatos y benzoatos) en combinación con la bacteriocina contra diferentes microorganismos reto (*B. thermosphacta*, *E. coli* y *L. innocua*). Se realizaron isobogramas para determinar las combinaciones con efectos sinérgicos y éstas fueron implementadas en un modelo cárnico tipo emulsión, empacado al vacío y sometido a condiciones de abuso de temperatura de 10°C para observar los efectos sobre una carga microbiana de 5–6 log UFC/mL de *B. thermosphacta*. Se evaluó crecimiento de *B. thermosphacta*, mesófilos aerobios y bacterias lácticas, pH y color los días 1, 3, 7, 14 y 30 de almacenamiento.

Solo dos de las cuatro combinaciones probadas impartieron una mayor estabilidad microbiológica al modelo cárnico (6.25 mg/mL de bacteriocina con 0.05 mg/mL de nitrito y 6.25mg/mL de bacteriocina con 0.2 mg/mL de lactato de sodio) durante 7 días de almacenamiento; fue en la primera combinación que se observaron las mejores características en el desarrollo de color. Las demás combinaciones utilizadas no garantizaron la calidad microbiológica del producto.

En conclusión, la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK 29 utilizada con la tecnología de barreras permitió una reducción significativa de la cantidad de nitritos en un modelo cárnico, manteniendo estabilidad microbiológica y fisicoquímica en el alimento, con lo cual se reducen los efectos negativos que tienen los nitritos sobre la salud humana.

Abstract

The Food preservation by hurdle technology aims to preserve the organoleptic qualities in the end product with the combination of traditional preservation techniques of low intensity that act as hurdles to prevent or delay the deterioration reactions. Bacteriocins are antimicrobial peptides produced by bacteria and are considered natural preservatives; the nitrites are inorganic additives whose function is to ensure the microbiological quality of meat products, while imparting characteristics of specific aroma, flavor and color; the lactates are considered natural preservatives. The objective of this study was to apply different combinations of the bacteriocin produced by *E. Faecium* MXVK 29 and antimicrobials (sodium lactate and sodium nitrite) to a vacuum packed meat emulsion to evaluate their hygienic-sanitary quality.

The bacteriocin was extracted from a *E. faecium* MXVK 29 culture and its antimicrobial activity was determined. An array of chess was used to assess different combinations of commercial preservatives used (nitrites, sorbates and benzoates) in combination with the bacteriocin against different challenge organisms (*B. thermosphacta*, *E. coli* and *L. innocua*). Isobolograms were performed to determine combinations with synergistic effects and these were implemented in a model meat emulsion, vacuum packed and subjected to temperature abuse conditions of 10 ° C to observe the effects on microbial load of 5-6 log CFU / mL *B.thermosphacta*. We evaluated growth of *B. thermosphacta*, lactic acid bacteria and aerobic plate counts, pH and colour on days 1, 3, 7, 14 and 30 of storage.

Only two of the four tested combinations imparted a higher microbiological stability to the meat model (6.25 mg/mL of bacteriocin with 0.05 mg/mL of nitrite and 6.25 mg/mL of bacteriocin with 0.2 mg/mL of sodium lactate) for 7 days of storage; it was the first combination observed the best features in the development of colour. Other used combinations did not ensure the microbiological quality of the product.

In conclusion, the bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* MXVK 29 used with hurdle technology allowed a significant reduction in the amount of nitrites in a meat model, keeping physicochemical and microbiological stability in food, thereby reducing the negative effects that have nitrites on human health.

A México, que siempre será grande, a pesar de todos los embates que lo agobian, ya que mientras existan personas que lo enorgullezcan y lo defiendan seguirá siendo un excelente país donde vivir.

Porque mi patria es primero.

A mis padres Bibiana y Arturo, que siempre me han impulsado a hacer las cosas bien y me han ayudado en todo lo que han podido sin condición alguna y de quienes nunca dejare de aprender.

Porque son nuestras decisiones las que muestran lo que podemos llegar a ser. Mucho más que nuestras propias habilidades.

A mis hermanos Javi y Oscar, de quienes he aprendido en todas las discusiones amenas que hemos tenido.

Ya que el amor de un hombre por una mujer se desvanece como la luna, pero el amor de un hermano por un hermano es permanente como las estrellas y perdura como la palabra del profeta.

A mi familia, en general por brindarme ayuda cuando la he necesitado y en especial a Cris que siempre ha sido una gran líder.

Gracias por ser una familia tan hermosa como esta, por ser parte de este mundo y de ser personas que han hecho que luche y que trabaje para cumplir mis metas y que hacen que mi vida sea completamente feliz.

Porque en los momentos de crisis, sólo la imaginación es más importante que el conocimiento.

Un enorme y especial agradecimiento a la UNAM que es sin lugar a dudas, la mejor universidad de América Latina y la que con orgullo es madre de las demás universidades de México.

Un especial agradecimiento a la Dra. Edith por darme una oportunidad de trabajar con ella y confiar en mí brindándome su apoyo y su tiempo tan valioso, así como su conocimiento y consejo.

A la Dra. Carmen los valiosos consejos, así como tener una excelente idea de la importancia de la microbiología en la seguridad de los alimentos debido a sus valiosas clases. Así como también al Mtro. Orlando por su valiosa colaboración en este trabajo, gracias a su enseñanza en control de calidad.

Agradezco a mis compañeros y amigos Belem, Fanny, Sandra, Martha, Axl, Hugo, Julio, Manuel, Andrea y Gaby Ann con quienes viví una de las mejores etapas de la vida: ser universitario y todo lo que ello conlleva. Las grandes aventuras siempre fueron con ustedes, grandes anécdotas e impresionantes locuras.

También a Estela por ser buena Amiga, permisiva, adorable que me hizo amable, seguro y con cierto hecho, inspiro mi vida. Puesto que pasamos momentos difíciles y felices que ya no volverán...

A Gaby, quien me ha brindado su amistad desde la preparatoria y que es una amiga inigualable y con quien he pase muchos momentos inolvidables.

Le agradezco también a mis profesores Lilia y Gustavo por haberme enseñado lo lindo y emocionante que es la Química.

Agradecimientos

A Karina, Mónica, Elisa, Edgar, Alecita, Ana y Luisa por hacer que todo sea tan divertido y pasárnosla súper en las fiestas y aventuras, pero también por hacer que el estudio sea muy ameno. También a Rox, Kiko y Pepe, por hacer reuniones tan amenas y hacer que el tiempo se metabolice poco a poco con un buen control de calidad.

A Lizzie, Monse, Nancy, Priscila y Dal por compartir conmigo su vida y ser mi conciencia analizando con detalle muchos problemas de la dulce vida.

A Alecita y Susy quienes hicieron los últimos semestres en la uni los más inolvidables por ser tan lindas y súper cool.

A Erika, Isa, Demetrio, Luis, Juan, Claudia, Consuelo, Issi, Yeni y Brenda por ser tan divertidos, hacer la investigación tan amena, así como realizar sesiones plenarias de excelente calidad, fiestas y congresos.

Somos esencias en el tiempo unidos por una hermosa luz, siempre pediré que sea así. Ahora eres una estrella más No creas que no lo persivo, aprecio en verdad quien fuiste.

Índice General

Contenido

Resumen	2
Abstract.....	4
Dedicatorias	6
Agradecimientos	7
Índice General	9
Índice de Tablas.....	12
Índice de Gráficos	13
Índice de Imágenes.....	15
Capítulo I. Introducción.....	17
Capítulo II. Justificación	20
Capítulo III. Revisión Bibliográfica	22
3.1 Métodos de conservación.....	22
3.1.1 Conservadores utilizados en la industria cárnica	23
3.1.2 Antimicrobianos empleados en la industria cárnica.....	24
3.2 Tecnologías de conservación	27
3.3 Bacteriocinas	27
3.3.1 Espectro antimicrobiano.....	29
3.3.2 Mecanismo de acción.....	29
3.3.3 Métodos de detección de actividad de bacteriocinas	31
3.3.4 Bacteriocinas del género <i>Enterococcus</i>	31
3.3.5 Uso de enterocinas en alimentos	32
3.3.6 Ventajas y desventajas del uso de enterocinas.....	33
3.4 Embutidos.....	34
3.5 Microorganismos presentes en carne procesada.....	40
3.5.1 Microorganismos seleccionados como posible blanco de la bacteriocina	41
3.6 Tecnología de barreras.....	42

3.7 Las enterocinas y la tecnología de barreras en embutidos	45
Capítulo IV. Objetivos	46
4.1 Objetivo general	46
4.2 Objetivos específicos	46
Capítulo V. Metodología	47
5.1 Crecimiento de cepas.....	48
5.2 Extracción de la bacteriocina.....	48
5.2.1 Extracto crudo.....	48
5.3 Determinación de la actividad inhibitoria.....	49
5.4 Actividad antimicrobiana de los conservadores	50
5.4.1 Actividad antimicrobiana de las combinaciones.....	52
5.4.2 Evaluación de los efectos de las combinaciones	53
5.5 Evaluación de un modelo cárnico	55
5.5.1 Modelo cárnico	55
5.5.2 Análisis microbiológico.....	57
5.5.2.1 Cuenta estándar	57
5.5.2.2 Bacterias ácido lácticas	57
5.5.2.3 <i>Brochothrix thermosphacta</i>	57
5.5.3 Medición de pH.....	57
5.5.4 Medición de color	58
5.5.5 Análisis estadístico	58
Capítulo VI. Resultados y Discusión	59
6.1 Determinación de la actividad inhibitoria.....	59
6.2 Actividad antimicrobiana de los conservadores	60
6.2.1 Actividad antimicrobiana de las combinaciones.....	63
6.2.2 Evaluación de los efectos de las combinaciones	65
6.3 Modelo cárnico emulsionado	70
6.3.1 Análisis microbiológico.....	71
6.3.1.1 Cuenta estándar	72
6.3.1.2 Bacterias ácido lácticas	78

6.3.1.3 Medición de pH	82
6.3.1.4 <i>Brochothrix thermosphacta</i>	84
6.3.2 Medición de color	88
6.4 Análisis estadístico	97
Capítulo VII. Conclusiones	110
Perspectivas	112
Bibliografía	113
Anexos	120
Anexo A. Información bibliográfica	120
Anexo B. Medios de cultivo y formulaciones	123
Anexo C. Cálculos	125
Anexo D. Análisis estadístico	130

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Métodos de conservación de alimentos.	23
Tabla 2. Clasificación de bacteriocinas.	28
Tabla 3. Clasificación de algunas enterocinas.	32
Tabla 4. Enterocinas usadas en alimentos.	33
Tabla 5. Cepas utilizadas y clasificación.	48
Tabla 6. Diseño de experimentos para obtener una emulsión cárnica.	55
Tabla 7. Actividad antimicrobiana de conservadores contra microorganismos de deterioro y patógenos.	60
Tabla 8. Pruebas combinatorias de conservadores químicos con la bacteriocina de acuerdo a un arreglo tipo ajedrez.	64
Tabla 9. Nomenclatura de los tratamientos.	71
Tabla 10. Nomenclatura de las muestras en el PCA.	99
Tabla 11. Resumen de resultados.	107

Índice de Gráficos

	Página
Gráfica 1. Isoblograma: benzoato de sodio / bacteriocina.	66
Gráfica 2. Isoblograma: sorbato de potasio / bacteriocina.	67
Gráfica 3. Isoblograma: lactato de sodio / bacteriocina.	69
Gráfica 4. Isoblograma: sal cura / bacteriocina.	70
Gráfica 5. Variación de la población de aerobios en el modelo cárnico con nitrito.	73
Gráfica 6. Variación de la población de aerobios en el modelo cárnico con lactato.	76
Gráfica 7. Variación de la población de aerobios en el modelo cárnico con bacteriocina.	77
Gráfica 8. Variación de la población de BAL en el modelo cárnico con nitrito.	79
Gráfica 9. Variación de la población de BAL en el modelo cárnico con lactato.	81
Gráfica 10. Variación de la población de BAL en el modelo cárnico con bacteriocina.	82
Gráfica 11. Variación del pH de los diferentes tratamientos del modelo cárnico.	83
Gráfica 12. Variación de la población de <i>Br. thermosphacta</i> en el modelo cárnico con nitritos.	86
Gráfica 13. Variación de la población de <i>Br. thermosphacta</i> en el modelo cárnico con lactato.	87
Gráfica 14. Variación de la población de <i>Br. thermosphacta</i> en el modelo cárnico con bacteriocina.	88
Gráfica 15. Variación de L* del modelo cárnico con nitrito.	89
Gráfica 16. Variación de L* del modelo cárnico con lactato.	90
Gráfica 17. Variación de L* del modelo cárnico con bacteriocina. .	90
Gráfica 18. Variación de a* del modelo cárnico con nitrito.	91
Gráfica 19. Variación de a* del modelo cárnico con lactato.	92
Gráfica 20. Variación de a* del modelo cárnico con bacteriocina. .	92

Gráfica 21. Variación de b^* del modelo cárnico con nitrito.	94
Gráfica 22. Variación de b^* del modelo cárnico con lactato.	94
Gráfica 23. Variación de b^* del modelo cárnico con bacteriocina. .	95
Gráfica 24. Variación de Chroma del modelo cárnico con diferentes antimicrobianos.	96
Gráfica 25. Variación de Hue del modelo cárnico con diferentes antimicrobianos.	97
Gráfica 26. Variables de respuesta en el PCA.	99
Gráfica 27. Distribución de las muestras en el PCA.	101
Gráfica 28. PCA de <i>Brochothrix Thermosphacta</i>	102
Gráfica 29. PCA de bacterias aerobias.	103
Gráfica 30. PCA de bacterias ácido lácticas.	104
Gráfica 31. PCA sobre el pH.	105
Gráfica 32. PCA de Chroma en las muestras.	106
Gráfica 33. PCA de Hue en las muestras.	107

	Página
Imagen 1. Mecanismo de acción de bacteriocinas.	30
Imagen 2. Formación de color en emulsiones.	39
Imagen 3. Efecto de la tecnología de barreras.	44
Imagen 4. Metodología general en el proyecto.	47
Imagen 5. Representación de un isoblograma.	55
Imagen 6. Determinación de actividad antimicrobiana de la bacteriocina.	59

"La vida no es fácil, para ninguno de nosotros.
Pero... ¡qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste."

Marie Curie

"No lo sé, procuro no cargar mi memoria con datos que puedo encontrar en cualquier manual, ya que el gran valor de la educación no consiste en atiborrarse de datos, sino en preparar al cerebro a pensar por su propia cuenta y así llegar a conocer algo que no figure en los libros."

Albert Einstein

Nota: Respuesta que le dio a Thomas A. Edison cuando le preguntó la velocidad del sonido.

Capítulo 1

1. Introducción

A partir del establecimiento de las primeras comunidades prehistóricas, los humanos han aprovechado las actividades que desarrollan los distintos microorganismos sobre los alimentos. Fue durante el siglo XX cuando la conciencia de la importancia de estas actividades (desarrollo, conservación, deterioro y contaminación de los alimentos), dio lugar al desarrollo de la “Microbiología de Alimentos”. Así, la conservación biotecnológica de los alimentos tal y como la conocemos hoy, se originó a partir de la comprensión científica del proceso de fermentación de los alimentos, una de las más antiguas técnicas de conservación practicada desde hace 12 000 años. Durante este extenso periodo, el ser humano logró, mediante la práctica de ensayo-error, procedimientos naturales para evitar la alteración de los diferentes alimentos (Holzapfel *et al.*, 1995).

A pesar de todos los avances tecnológicos logrados para la conservación de alimentos a lo largo de la historia, los consumidores demandan alimentos cada vez más seguros y prefieren aquellos que estén mínimamente procesados, por lo que se está retomando una conservación más natural de los alimentos, aunque aplicando los conocimientos adquiridos con el paso del tiempo de una forma más razonada. El interés en tecnologías avanzadas de procesado es más que una respuesta a las demandas expresadas por el consumidor, que valora productos similares a los frescos (fresh-like), con apariencia más natural a diferencia de los alimentos altamente procesados cuyas características nutricionales y sensoriales las consideran inferiores; sin embargo los productos similares en apariencia a los frescos, son muy perecederos (Holzapfel *et al.*, 1995).

La bioconservación se puede definir como la extensión de la vida media y de la seguridad de los alimentos mediante el empleo de su microbiota natural o controlada y/o sus productos antibacterianos como son las bacteriocinas. Los agentes bioconservantes por excelencia son, sin lugar a duda, las bacterias ácido lácticas (BAL), debido a que producen diferentes metabolitos con propiedades antimicrobianas, y contribuyen a las características organolépticas de los productos donde se aplican; además de tener el estatus GRAS (Generally Recognized As Safe). Dentro de estas bacterias productoras de antimicrobianos tenemos las que pertenecen al género *Enterococcus*, como son *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* que producen bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas taxonómicamente a la cepa productora.

Debido a la demanda de alimentos cada vez más seguros y que estén mínimamente procesados, por parte de los consumidores, se están produciendo alimentos que pueden ser afectados de manera muy significativa por microorganismos patógenos o alterantes, si no se lleva a cabo una adecuada manipulación de los alimentos durante toda la cadena de proceso y hasta el punto de venta.

Estos efectos son marcados y contundentes, especialmente en los productos cárnicos, que requieren una especial atención en el control de la materia prima y la cadena de frío, ya que un buen control de temperatura es imprescindible para alcanzar la vida útil que permita una adecuada comercialización del alimento (Simpson *et al.*, 1989).

Las principales causas de disminución de vida útil de los alimentos son la pérdida de calidad, causada por microorganismos y el crecimiento de patógenos a niveles detectables. Los microorganismos presentes en alimentos se pueden clasificar principalmente en bacterias de deterioro y patógenas para el consumidor.

Para el control o eliminación de estos microorganismos se usan diversos métodos y técnicas, como son: tratamientos térmicos, empaques especiales, aplicación de aditivos y tecnología de barreras, entre otros.

La tecnología de barreras consiste en la aplicación de diversas técnicas o estrategias combinadas, más suaves, que en conjunto consiguen una adecuada conservación de los alimentos, pero sin modificarlos intensamente con el fin de obtener alimentos más sanos y nutritivos, utilizando menos aditivos y conservar las cualidades sensoriales de los mismos.

Capítulo 2

2. Justificación

En general todos los alimentos contienen sustratos suficientes para el crecimiento de microorganismos, tanto patógenos como alterantes, por lo que es necesaria la aplicación de medidas que prolonguen la vida útil y aseguren la inocuidad de los mismos. Muchos microorganismos afectan de manera importante a los alimentos o a los consumidores de los mismos. Sin embargo también se sabe que muchos microorganismos producen agentes antimicrobianos; así como las bacterias lácticas que producen bacteriocinas, las cuales son especialmente eficaces contra las bacterias Gram positivas.

La seguridad alimentaria es un factor altamente valorado por los consumidores, por lo que la ciencia de los alimentos está dedicando muchos medios para obtener productos más seguros para el consumo humano. Las ETA, son enfermedades bacterianas que suponen pérdidas elevadas en la industria, además de los consiguientes efectos para la salud. Las bacteriocinas actúan atacando las membranas celulares de los organismos sensibles, reduciendo o incluso inactivando a la flora microbiana.

Estudios preliminares realizados en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, han reportado que *Enterococcus faecium* MXVK29 tiene la capacidad de producir una bacteriocina, la cual presenta un reducido espectro antimicrobiano contra algunas bacterias alterantes de alimentos, pero demostró tener alta actividad antilisteria (Álvarez-Cisneros *et al.*, 2010).

La utilización de estos conservadores naturales en alimentos está contemplada como parte de un mecanismo de barreras y no como agente de conservación único, por ello se deben realizar estudios para conocer con qué tipo de conservadores comerciales puede actuar en sinergia y así ampliar el espectro antimicrobiano de ambos conservadores.

Por otra parte el consumidor prefiere alimentos sin conservadores, y si se encuentran combinaciones de bacteriocinas con concentraciones muy bajas de conservadores químicos, pero con la misma actividad antimicrobiana posiblemente se tengan productos más cercanos a lo natural, pero sin perder la calidad y la inocuidad.

Capítulo 3

3. Revisión Bibliográfica

Los alimentos se componen principalmente de agua, lípidos, grasa, y carbohidratos con pequeñas proporciones de minerales y de compuestos orgánicos. Los alimentos se pueden clasificar de diferentes maneras como son los alimentos perecederos, semi-perecederos, no perecederos, cosechados, frescos, como mínimamente procesados, preservados, manufacturados, formulados, primarios, derivados secundarios, sintéticos, funcionales, etcétera (Shafiur, 2007). Dentro de los alimentos altamente perecederos se encuentran los productos cárnicos refrigerados y mínimamente procesados, que cuando son sometidos a tratamientos térmicos, sobrevive una carga microbiana residual significativa, debido a su elevada a_w y pH cercano al neutro ($a_w > 0.95$ y $\text{pH} > 5.2$), por lo que se clasifican como perecederos (Simpson *et al.*, 1989; Shafiur, 2007).

3.1 Métodos de Conservación.

Los alimentos se pueden conservar por medio de: frío, calor, utilización de conservadores químicos o combinaciones. La tabla 1 muestra la aplicación tecnológica de estos métodos. El uso del frío significa generalmente la refrigeración o la congelación; mientras que la utilización de calor implica muchos métodos de proceso, por ejemplo la pasteurización, la esterilización comercial, entre otros.

La adición de conservadores químicos y el proceso de la fermentación son también formas de conservar los alimentos. La composición física y química de los alimentos ayuda a determinar el tipo de proceso requerido para la conservación. Otros factores que influyen

en la selección del método de conservación son: el producto deseado, tipo de empaque, costo y métodos de distribución.

Tabla 1. Métodos de conservación de alimentos.

Objetivo	Fundamento	Tecnología o técnica
Inactivación de microorganismos y enzimas	Calor	Cocción, Pasteurización o Esterilización Comercial
	Radiación	Gamma, Rayo de electrones
	Descontaminación gaseosa	Exposición a óxido de etileno
Restricción en el acceso de microorganismos a los productos	Empacado	En lata, plástico, aluminio, vidrio
	Proceso Aséptico	HACCP, ISO 9000, BMP
Prevención de la oxidación	Reacción Química	Adición de antioxidantes orgánicos, inorgánicos y enzimáticos.
Inhibición del crecimiento de microorganismos	Frio	Refrigeración, congelado
	Reducción a_w	Secado, curado por adición de sales, adición de azúcares, liofilización
	Niveles de oxígeno bajo	Atmósfera controlada
	Acidificación	Reducción del pH por adición de ácidos
	Fermentación	Alcohólica, acética, láctica
	Reacción Química	Adición de conservadores inorgánicos, orgánicos y naturales

Fuente: (Gould, 1989; 1995; 2001)

3.1.1 Conservadores usados en la industria cárnica.

Los conservadores son un grupo de aditivos cuya finalidad es la de prevenir el crecimiento microbiano de: hongos, levaduras y bacterias, así como mantener la frescura. La FDA (U.S. Food And Drug Administration) define a los conservadores como "cualquier sustancia

química que, cuando se agrega a los alimentos puede prevenir o retardar el deterioro de éstos, pero no incluye la sal y el azúcar común, vinagres, especias o aceites extraídos de especias, sustancias agregadas a los alimentos por exposición directa de estos al humo de madera o químicos aplicados por sus propiedades insecticidas o herbicidas” (FDA, 21CFR101.22, a, 5).

Los conservadores son usados para prevenir o retardar el deterioro químico y biológico de los alimentos; estos incluyen antioxidantes para prevenir la autoxidación de pigmentos, sabores, lípidos y vitaminas; compuestos antipigmentativos, para prevenir el oscurecimiento enzimático y no enzimático; y compuestos antiendurecimiento, para prevenir los cambios de textura. Los aditivos usados para prevenir el deterioro microbiológico son llamados antimicrobianos (Davidson y Branen, 2005); como son: ácido ascórbico, ascorbato de sodio, ácido láctico, sorbato de sodio, nitrato de sodio, nisina, etc.

3.1.2 Antimicrobianos empleados en la industria cárnica.

Los agentes antimicrobianos son definidos por la FDA como “sustancias usadas como conservadores alimenticios para prevenir el crecimiento de microorganismos y su subsecuentes desperdicios, incluyendo fungistáticos, antilevaduras e inhibidores de crecimiento”, (FDA, 21CFR170.3, o, 2). Sin embargo el uso de antimicrobianos se ha incrementado como intervención principal para la inhibición o inactivación de microorganismos patógenos en alimentos (Davidson y Zivanovic, 2003; Davidson y Branen, 2005).

Los antimicrobianos pueden ser clasificados como tradicionales o naturales y químicos, los primeros incluyen los extractos de especias y hierbas, así como el uso de bioconservadores; los segundos abarcan compuestos orgánicos, inorgánicos y aquellos que han sido sintetizados como: ácido acético y acetatos, ácido láctico y lactatos, nitratos y nitritos, sulfitos, ácido cítrico y citratos, parabenos, etc.

Benzoato de sodio: su efecto antimicrobiano aumenta en su forma no disociada (pH 2.0-4.5) y disminuye a pH > 5.0, inhibe principalmente mohos y levaduras (Davidson & Branen, 2005), así como algunas bacterias catalasa (+), pero a altas concentraciones, interviniendo en el ciclo del ácido cítrico. Tiene un valor de ingesta diaria admisible (ADI) de 0-5 mg/kg peso corporal (Lück y Jager, 1999).

Lactato de sodio: excelente antimicrobiano contra bacterias anaeróbicas por descenso del pH, es ineficaz contra mohos y levaduras. Se considera aditivo GRAS, por lo que no existe un límite para su uso (Davidson *et al.*, 2002). Se ha utilizado con éxito como agente antimicrobiano porque proporciona un gusto salado leve que realza el sabor de la carne, conserva el color, contribuye a la capacidad de retención del agua y mejora la jugosidad; el ácido aparece naturalmente en productos de carne. Se ha utilizado junto con nitritos en salchichas sin que se presente un efecto sinérgico (Doores, 2005).

Nitrito de sodio: Los nitritos liberan óxidos de nitrógeno que atacan grupos aminos del sistema deshidrogenasa (enzimas con SH) de las células microbianas. Valor ADI para nitritos, 0-0.2 mg/kg peso corporal, dosis mayores pueden formar nitrosohemoglobina, lo que conduce a la cianosis. Su efecto antimicrobiano aumenta a pH ácido (Lück y Jager, 1999) en presencia de ascorbato e isoascorbato (Long y

Barker, 1999) y eritorbato (Tompkin, 2005), así como bajo condiciones de anaerobiosis (Davidson *et al.*, 2002) NaCl, sorbatos y polifosfatos. Es muy eficiente contra bacterias Gram (+) y Gram (-) (Simpson y Sofos, 2009). La norma oficial mexicana limita su uso a 156 partes por millón (ppm).

Sorbato de potasio: efectivo antimicrobiano cuya efectividad aumenta en su forma no disociada (pH 2.0-4.5) y disminuye a pH > 5.0, inhibe esencialmente mohos y levaduras (Davidson *et al.*, 2002), así como algunas bacterias catalasa (+), pero a altas concentraciones, interviniendo en el ciclo del ácido cítrico. Se considera un aditivo GRAS, por lo que en general no existe un límite para su uso; sin embargo la EFSA (European Food Safety Authority) y diferentes autoridades internacionales restringen su uso en ciertos alimentos (Smith y Hong-Shum, 2003). En México está limitado su uso a 1000 ppm, en la NOM-213-SSA1-2002.

Propianato de sodio: antimicrobiano con una efectividad en un rango de pH 2.0 a 5.5 y disminuye a pH > 6.0, se usa generalmente para controlar o eliminar mohos y levaduras así como algunas bacterias, su uso en alimentos no está limitado al tener el grado de aditivo GRAS (Smith y Hong-Shum, 2003). Solo se permiten 1000 ppm bajo la legislación mexicana a partir del año 2002.

Parabenos: Derivados del ácido benzoico con una débil sensibilidad al pH que permite utilizarlos cerca de la neutralidad (pH 3-8), activos contra mohos, levaduras y menos contra bacterias. Se usan en concentraciones de 0.05-0.1% en alimentos. A pesar de su baja toxicidad, su baja solubilidad, su precio y el sabor que confieren a los alimentos limitan su uso (Smith y Hong-Shum, 2003).

3.2 Tecnologías de conservación.

La mayoría de las técnicas de preservación de alimentos actúan retrasando o inhibiendo totalmente el crecimiento de microorganismos. Pocas técnicas inactivan los microorganismos. Mientras que el calor sigue siendo la técnica más usada extensivamente para la inactivación, recientemente ha estado aumentando el interés en el desarrollo de alternativas. Éstas incluyen el uso de las altas presiones hidrostáticas, descargas eléctricas de alto voltaje, el láser de alta intensidad y de las pulsaciones de luz, termosonificación (combinación de calentamiento suave con el ultrasonido), procesamiento óhmico y radiofrecuencias. Además de un número de antimicrobianos naturales, incluyendo las lisozimas, extractos de especias y bacteriocinas como la nisina y la pediocina.

Así como también la utilización de la tecnología de barreras como el “*sous vide*” que combina diversas técnicas y tecnologías con lo cual se obtiene lo mejor de las tecnologías combinadas con una reducción significativa de sus respectivas desventajas (Thippareddi y Sánchez, 2006).

3.3 Bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos termoestables activos, sintetizados vía ribosomal por bacterias lácticas y tiene un mecanismo de inmunidad específico. Se caracterizan por presentar un efecto antagónico contra especies de microorganismos taxonómicamente relacionadas, ya sean patógenos y/o causantes de deterioro (Cotter *et al.*, 2005). Dentro de los géneros de bacterias lácticas productoras, se encuentran

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Enterococcus* (Heng *et al.*, 2007).

El uso de bacterias lácticas y de sus metabolitos; como las bacteriocinas en forma de extractos crudos, semi-purificados o purificados, ofrecen un potencial en la conservación de alimentos, siendo una alternativa en la industria alimentaria que podría ayudar a reducir el uso de conservadores químicos y disminuir la intensidad del tratamiento térmico, resultando en alimentos con mejores propiedades nutricionales y organolépticas (Gálvez *et al.*, 2007). En la tabla 2 se muestra la clasificación de bacteriocinas propuesta por Cotter.

Tabla 2. Clasificación de bacteriocinas.

Clase	Subclase	Características	Descripción	Ejemplos
Clase I	Se han propuesto 11 subclases	Bacteriocinas con lantionina	Lantibióticos de uno y dos péptidos	Péptido sencillo: nisina, mersacidina, lacticina 481
				Péptido doble: lacticina 3147, citolisina
Clase II	IIA	Bacteriocinas sin lantionina, pequeños péptidos heterogéneos.	Bacteriocinas tipo pediocina	Pediocina PA1, leucocina A
	IIB		Bacteriocinas de dos péptidos	Lactacina F
	IIC		Bacteriocinas de un solo péptido y lineales	Lactococina A, divergicina A
Clase III	IIIA	Proteínas, no bacteriocinas	Son grandes proteínas líticas termolabiles	Lisostafina, enterolisina a
	IIIB		Son grandes proteínas no líticas termolabiles	Helveticina J, steptococina A-M57
Clase IV		Péptidos con grupo tiol ($-SH$) activo	Bacteriocinas cíclicas	Enterocina AS48, reuterina 6

Fuente: (Cotter *et al.*, 2005; Heng *et al.*, 2007).

3.3.1 Espectro antimicrobiano.

La mayoría de las bacteriocinas generadas por las bacterias Gram (-) actúan esencialmente sobre especies microbianas relacionadas taxonómicamente con ellas, mientras que las bacteriocinas de las Gram (+) son antagonistas de una mayor diversidad de especies Gram (+) (Tagg *et al.*, 1976). Aunque, las bacterias Gram (+) como *Lactobacillus acidophilus* (Vicent *et al.*, 1959), producen bacteriocinas que inhiben el desarrollo de bacterias Gram (-). Su utilización antimicrobiana frente a bacterias Gram (-) ha dado buenos resultados cuando son combinadas con otras sustancias como algún ácido orgánico (Mustapha *et al.*, 2002).

Las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas se han clasificado en tres clases, respecto a su espectro antimicrobiano: a) bacteriocinas con un estrecho margen de acción, restringido a microorganismos de la misma especie; b) bacteriocinas con una actividad intermedia que inhibe bacterias lácticas y algunas bacterias Gram (+); y c) bacteriocinas con amplio margen de acción, las cuales inhiben una amplia variedad de Gram (+) (Cintas *et al.*, 2001).

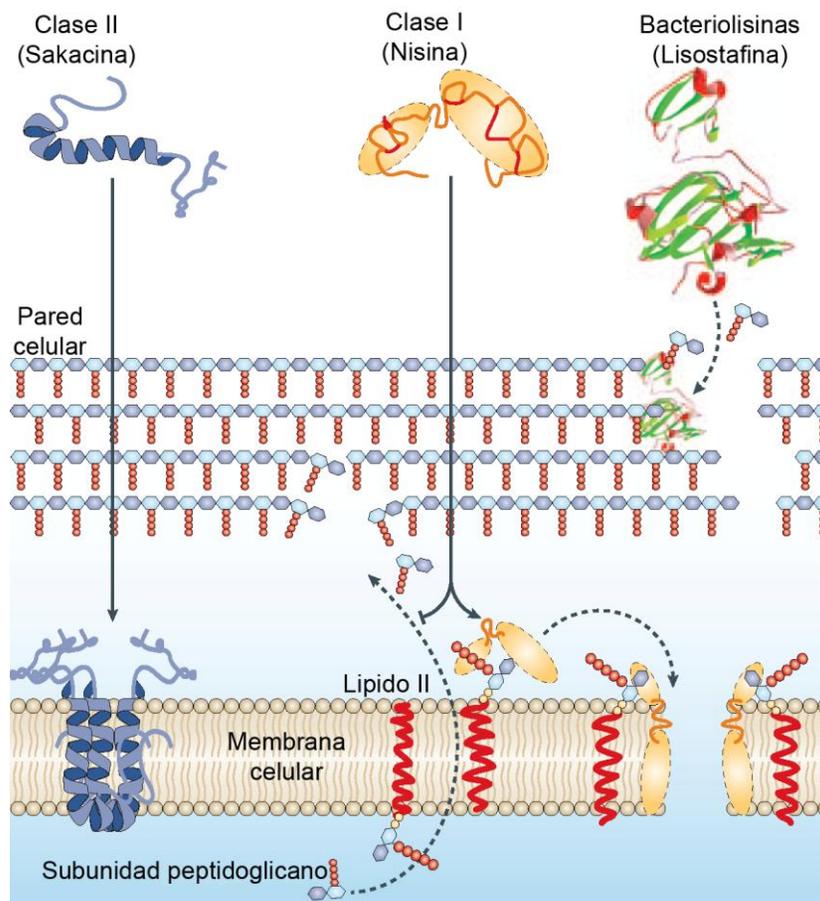
3.3.2 Mecanismo de acción.

Las bacteriocinas tienen un espectro antimicrobiano que parece estar asociado a la presencia de receptores apropiados en los microorganismos sensibles (Tagg *et al.*, 1976). Algunos miembros de la clase I, como la nisina, han demostrado tener un modo dual de acción: pueden unirse al lípido II (receptor universal y principal transportador de subunidades de peptidoglicano del citoplasma a la pared celular) impidiendo la síntesis correcta de la pared celular y conduciendo a la muerte de la célula. Además puede utilizar al lípido II e interaccionar

con la bacteriocina para iniciar un proceso de inserción en la membrana y formación de poros, que conducen a la muerte rápida de la célula. Algunas bacteriocinas de la clase II con dos péptidos (como la lacticina 3147) pueden tener esta actividad dual distribuida en los dos péptidos.

En general, los péptidos de la clase II tienen una estructura anfifílica helicoidal la cual permite que se inserte en la membrana de las células blanco, conduciendo a la despolarización y muerte. Las grandes proteínas bacteriolíticas (bacteriolisinas o clase III de las bacteriocinas) causan la muerte y lisis de la célula (Cotter *et al*, 2005; Imagen 1).

Imagen 1. Mecanismos de acción de bacteriocinas.



Fuente: (Cotter *et al*, 2005).

3.3.3 Métodos de detección de actividad de bacteriocinas.

Se basan en la cuantificación de la inhibición producida en un microorganismo sensible; este tipo de ensayos son las técnicas más ampliamente utilizadas para la determinación cuantitativa de bacteriocinas (Hoover y Chen, 2005). El análisis por difusión en agar, es indudablemente el más usado a pesar de las inconveniencias y limitaciones de su uso (Papagianni *et al.*, 2006).

La técnica de difusión en agar tiene por finalidad correlacionar el diámetro del halo de inhibición con la sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano (bacteriocina) determinado (Riera *et al.*, 2008). El funcionamiento del método, depende en gran parte de la capacidad humana; el juicio y la precisión no pueden ser obtenidos cuando las zonas de inhibición son difusas o no son perfectamente circulares así como las dificultades relacionadas con la difusión de la sustancia activa (Papagianni *et al.*, 2006).

3.3.4 Bacteriocinas del género *Enterococcus*.

El género *Enterococcus* pertenece al grupo de bacterias ácido lácticas Gram (+), son cocáceas agrupadas en pares o cadenas cortas, no esporuladas, catalasa negativo, oxidasa negativo y anaerobios facultativos, tienen un crecimiento óptimo a temperaturas de 35° C, aunque algunas especies del género crecen en un rango de 10 – 45° C, en presencia de NaCl al 6.5% y pH de 9.6; puede sobrevivir a tratamientos de 65° C durante 30 minutos (Špelina *et al.*, 2007).

También pueden producir bacteriocinas (enterocinas) que generalmente son de tipo II, muy efectivas contra diversas bacterias

lácticas y algunos microorganismos deteriorantes y patógenos como listerias (Devriese *et al.*, 2006). Dentro de este género existen algunas cepas productoras como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus munditi*. Las enterocinas identificadas se clasifican dentro de la clase I, clase IIA, clase IV y clase III de las bacteriocinas (según corresponde a la clasificación presentada en la tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de algunas enterocinas.

Clase	Bacteriocina	Cepa Productora
Clase I	Citolisina	<i>E. faecalis</i> DS16
Clase IIA	Enterocina A Mundticina Enterocina CRL35 Enterocina SE-K4 Enterocina P Bacteriocina 31 Bacteriocina RC714	<i>E. faecium</i> CTC492 <i>E. mundtii</i> AT06 <i>E. faecium</i> CRL35 <i>E. faecalis</i> K-4 <i>E. faecium</i> P13 <i>E. faecalis</i> Y1717 <i>E. faecium</i> RC714
Clase III	Enterolisina A	<i>E. faecalis</i> LMG 2333
Clase IV	Enterocinas AS-48 Enterocina B Enterocinas L50A Enterocinas L50B Enterocina RJ-11 Enterocina Q Enterocinas 1071A Enterocinas 1071B	<i>E. faecalis</i> S-48 <i>E. faecium</i> T136 <i>E. faecium</i> L50 <i>E. faecium</i> L50 <i>E. faecalis</i> RJ-11 <i>E. faecium</i> L50 <i>E. faecalis</i> BEF 1071 <i>E. faecalis</i> BEF 1071

Fuente: (Foulquié *et al.*, 2006).

3.3.5 Uso de enterocinas en alimentos.

Aunque los enterococos tengan una larga historia de uso artesanal como cultivos iniciadores en la preparación de varios tipos de quesos, son asociados a veces a patogenicidad. Sin embargo después de muchos estudios sobre patogenicidad y virulencia puede ser concluido que los

cultivos enterococcáceos que carecen de actividad hemolítica y que no llevan genes de resistencia de citolisina ni de vancomicina pueden ser vistas con seguridad y se pueden utilizar como iniciadores co-cultivo, o probióticos (De Vuyst *et al.*, 2003). La tabla 4 muestra algunas de la enterocinas usadas en alimentos, así como el microorganismo principal al que inhiben.

Tabla 4. Enterocinas usadas en alimentos.

Cepa Productora	Enterocina	Producto probado	Microorganismo blanco
<i>E. faecium</i> 7C5	Bacteriocina sin identificar	Taleggio (Queso de Italia)	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>E. faecium</i> 7C5	Bacteriocina sin identificar	Leche	<i>Listeria innocua</i>
<i>Lactococcus lactis</i> MG1614	Enterocina A	Queso Cottage	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>E. faecium</i> WHE 81	Enterocinas A y B	Queso Munster	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>E. faecium</i> F58	Enterocinas L50A y B	Leche de cabra y Jben (Queso de cabra de Marruecos)	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>E. faecalis</i> A-48-32	Enterocina AS-48	Queso duro sin grasa	<i>Bacillus cereus</i>
<i>E. faecalis</i> A-48-32	Enterocina AS-48	Leche descremada y queso suave sin madurar	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. faecium</i> CCM 4231, <i>E. faecium</i> RZS C13 y <i>Lactobacillus sakei</i> CTC494	Enterocina CCM 4231, enterocina 13 y sakacina K	Salchichas secas fermentadas estilo español	<i>Listeria spp.</i>
<i>E. faecium</i> CTC492	Enterocinas A y B	Salchichas secas fermentadas	<i>Listeria innocua</i>
<i>E. faecium</i> CTC492 y <i>L. sakei</i> CTC494	Enterocinas A y B y sakacina K	Cerdo cocido	<i>Listeria sakei</i> CTC746

Fuente: (Khan *et al.*, 2010)

3.3.6 Ventajas y desventajas del uso de enterocinas.

Una de las ventajas del uso enterocinas en alimentos es que pueden formar parte de la dieta del ser humano y de los animales, son inactivadas por proteasas de origen gástrico o pancreático, son termoestables y pueden soportar tratamientos térmicos en alimentos. Algunas pueden soportar temperaturas y pH bajos y muestran efectos sinérgicos con otros métodos de conservación. Sus principales desventajas es que son moléculas hidrofóbicas, tienen baja solubilidad

en ciertas aplicaciones (según características del producto), son sensibles a enzimas de algunos alimentos, mientras que en su producción son sensibles a diversos factores y su estabilidad disminuye a medida que aumenta su purificación.

A pesar de las ventajas y desventajas es necesario determinar y conocer muchas de sus propiedades físico-químicas, así como el espectro de actividad antimicrobiana.

3.4 Embutidos.

Los embutidos frescos son un producto de carne compactada o molida y condimentada con hierbas aromáticas y diferentes especias (pimentón, pimienta, ajos, romero, tomillo, clavo de olor, jengibre, nuez moscada, etcétera) que es introducida ("embutida") en piel de tripas de cerdo o fundas artificiales (Food Safety and Inspection Service, 2001).

Estos pueden contener agua, sin exceder el 3% del total de ingredientes en el producto. Usualmente son sazonados, curados frecuentemente y pueden contener agentes de ligado y féculas alimentarias (por ejemplo, harina de trigo y leche deshidratada sin grasa). Éstos se deben mantener refrigerados y cocidos completamente antes de comerse. Una forma de clasificarlos desde el punto de vista de la práctica de elaboración, es en base al estado de la carne al incorporarse al producto. En este sentido, los embutidos se clasifican en:

Embutidos crudos: aquellos elaborados con carnes y grasa crudos, sometidos a un ahumado o maduración. Por ejemplo: chorizos, salchicha y salamis.

Embutidos escaldados: aquellos cuya pasta es incorporada cruda, sufriendo el tratamiento térmico y ahumado opcional, luego de ser embutidos. Por ejemplo: mortadelas, salchichas tipo Frankfurt, jamón cocido, etc. La temperatura externa del agua o de los hornos de cocimiento no debe pasar de 75 – 80° C. los productos elaborados con féculas se sacan con una temperatura interior de 72 – 75° C y sin fécula 70 – 72° C.

Embutidos cocidos: cuando la totalidad de la pasta o parte de ella se cuece antes de incorporarla a la masa. Por ejemplo: morcillas, paté, queso de cerdo, etc. La temperatura externa del agua o vapor debe estar entre 80 y 90° C, sacando el producto a una temperatura interior de 80 – 83° C (Müller y Ardoino, 2005).

Dentro de los embutidos existen dos grandes tipos de pasta: los picados y los de tipo emulsión, en ambos casos existen productos cocidos, escaldados y crudos. Este trabajo está basado en los embutidos tipo emulsión (emulsión cárnica).

Las emulsiones cárnicas pueden definirse como dispersiones del tipo grasa en agua (O/W) formadas por tejido muscular, tejido adiposo, agua, sales inorgánicas y aditivos. Estas dispersiones de pasta fina son definidas como emulsiones (Ramos *et al.*, 2007), a pesar de que las gotas de grasa son semisólidas o parcialmente cristalizadas y se encuentran dispersas en una fase continua semisólida de proteínas gelificadas, que forman la matriz, donde las gotas de grasa son efectivamente atrapadas.

Las emulsiones son sistemas inestables en los que ocurren procesos de descremado, floculación y coalescencia (Becher, 1986) por

lo cual se da la separación de agua y grasa, siendo este uno de los principales problemas en la correcta elaboración y conservación de las emulsiones cárnicas, ya que se debe asegurar la estabilidad fisicoquímica del producto durante el tiempo de vida útil del alimento (Ramos *et al.*, 2007). Algunos de los factores que influyen en las emulsiones cárnicas son:

a) Temperatura

La temperatura es uno de los factores que influyen tanto en la elaboración como en la conservación de embutidos emulsionados. Durante su elaboración es fundamental mantener temperaturas bajas para poder extraer de manera más eficiente la miosina y la actomiosina (fundamental para formar la emulsión), también evita que la pasta se caliente y se obtenga una emulsión muy inestable, así como para evitar un crecimiento de microorganismos mesófilos (Cassens, 1996; Tirado *et al.*, 2005; Müller y Ardoíno, 2002; Coreti, 1986).

Durante el almacenamiento del producto terminado, las bajas temperaturas retrasan el crecimiento de microorganismos viables en el producto, así como reacciones de auto oxidación y descomposición enzimática; las pequeñas variaciones de temperatura durante su transporte y su almacenaje fomentan el crecimiento de microorganismos y la efectividad de la refrigeración y/o el congelado se ve reducida por mucho (James y James, 2008).

b) pH

Al igual que la temperatura, el pH tiene una importancia antes y después de la elaboración de los embutidos así como durante su

conservación y almacenamiento. Para la elaboración es importante que la carne presente un pH entre 5.4 y 5.8 con lo que se consigue en la carne, la llamada "estructura abierta", en la cual las fibras musculares se retraen en virtud del jugo cedido; también en este estado penetra mejor la sal y las sustancias curantes a través de los espacios intermedios dilatados y llenos de jugo, con lo que también se reduce la posibilidad de tener defectos (Coreti, 1986). Este pH también ayuda a que la estabilidad de la emulsión se prolongue por más tiempo (Larissa, 2005).

Durante la conservación de los embutidos es de gran importancia, ya que si el pH no es el adecuado habrá un crecimiento de microorganismos; que varían en función de cómo sea el método de conservación.

c) Color

El color es el factor que más afecta la apariencia de la carne y de los productos cárnicos durante su almacenamiento y el que más influye en la preferencia de los consumidores. La nitrosomioglobina, el pigmento de la carne curada, aunque estable al calor, es muy lábil a la oxidación (Pérez y Andújar, 2000). La mayoría de los cambios de coloración de los productos cárnicos se refieren al enverdecimiento; que consiste en la aparición de zonas pardo-verdosas en la superficie y de anillos verdes en los embutidos fermentados.

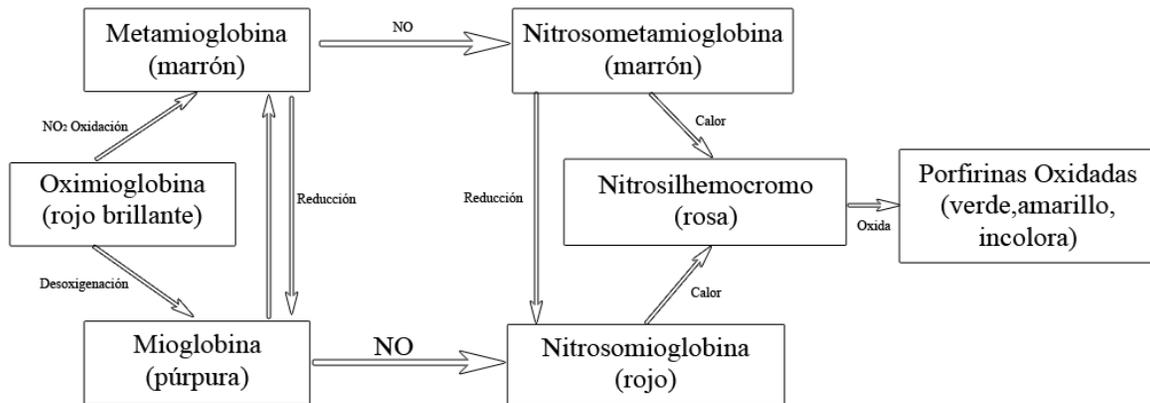
El color es una sensación subjetiva, resultado de una compleja serie de respuestas fisiológicas y psicológicas a la radiación electromagnética de longitudes de onda comprendidas en el intervalo de 400 – 700 nm (Mancini y Hunt, 2005).

En relación con los productos cárnicos, la retención del color constituye un problema muy diferente al de la carne fresca. La formación del color de la carne curada no depende del oxígeno, puesto que el color se forma por la acción del óxido nítrico. La disociación del nitroso pigmento no se incrementa a bajas tensiones de oxígeno y la velocidad de oxidación del pigmento se incrementa progresivamente con el incremento del oxígeno (Pérez y Andújar, 2000).

El efecto de los nitritos en el color de la carne es uno de los resultados más estudiado pero también es un buen ejemplo de la complejidad de las reacciones de nitrito en la carne, porque el nitrito no actúa directamente como un agente nitrificante (transferencia de óxido nítrico), sino más bien forma óxido nítrico por varios mecanismos diferentes, dependiendo de las condiciones.

La producción de óxido nítrico a partir de nitrito es un paso necesario para dar color a la carne, ya que es el óxido nítrico el que reacciona posteriormente con la mioglobina para producir pigmento rosa/ rojo que es típico del color de la carne curada. Debido a que los nitritos en la carne se disuelven en la fase acuosa, los iones nitrito (NO_2^-) están disponibles para reaccionar con los iones H^+ , iones de las condiciones de ácido débil de una mezcla de carne (pH 5.5 a 6.0) y al hacerlo, forma ácido nitroso (HNO_2) según menciona (Sebranek, 2009). La mayoría de las reacciones son incluidas en la imagen 2, donde se aprecian mejor.

Imagen 2. Formación de color en emulsiones.



Fuente: (Pérez y Andújar, 2000).

Puesto que las carnes curadas poseen un medio que ocasiona muchas reacciones químicas y bioquímicas, los productos cárnicos son más sensibles a los cambios de color por las condiciones de almacenamiento de la carne fresca. El nitrosopigmento aunque es estable al calor, es muy lábil a la oxidación. A consecuencia de esto, la pérdida gradual del color de la carne curada puede estar afectada por la exposición a la luz, la temperatura, las condiciones de empaado, el crecimiento bacteriano, etcétera.

La decoloración de la superficie de la carne curada cuando se expone a la luz, constituye uno de los problemas más graves de la retención del color de los productos cárnicos porque cataliza la oxidación de los pigmentos y puede acelerar la decoloración. La luz y el oxígeno interactúan y causan decoloración en la superficie de los productos (Watts, 1954). Sin embargo, está claro que una protección completa a la luz no es compatible con el mercado de estos productos. Tanto la luz fluorescente como la incandescente aceleran la oxidación de la

mioglobina, aunque la luz blanca tiene un efecto mayor (Satterlee y Hansmeyer, 1974).

La carne curada es mucho más susceptible a la decoloración por la luz que la carne fresca, porque acelera la disociación del óxido nítrico del nitrosopigmento. Los ascorbatos, son muy útiles en la formación del color especialmente donde el nivel de nitrito es bajo, tienen un efecto positivo en su estabilidad (Sebranek, 2009). La susceptibilidad del pigmento a la luz fluorescente depende del pH ya que el nitrosopigmento se favorece a $\text{pH} < 6$ (Pérez y Andújar, 2000).

3.5 Microorganismos presentes en carne procesada.

Los microorganismos asociados a la descomposición de la carne actúan sobre todo en las proteínas presentes, usualmente después las fuentes de energía como glucosa son consumidas. La proteólisis convierte las proteínas en péptidos solubles y aminoácidos. La acción microbiana subsecuente en los aminoácidos puede ser desaminación o descarboxilación, dando lugar a compuestos tales como el amoníaco, ácidos cetónicos, dióxido de carbono y varias aminas. El metabolismo de aminoácidos específicos puede dar lugar a sustancias como el sulfuro de hidrógeno y el indol.

Muchos de estos microorganismos causan daños directamente sobre el producto y con la consecuente formación de olores desagradables y defectos físicos, cuando se alcanzan los niveles adecuados (Cassens, 1996).

Los embutidos se pueden ver afectados por diferentes microorganismos como son: levaduras, bacterias lácticas, *Brochotrix*

thermosphacta, lactobacilos, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas sp.*, *E. coli*, entre otros.

3.5.1 Microorganismos seleccionados como posible blanco de la bacteriocina.

Listeria innocua: bacteria Gram positiva, catalasa positiva. Es un patógeno oportunista e infecta principalmente a la población inmunocomprometida (mujeres embarazadas, niños, adultos en plenitud, enfermos de SIDA y alcohólicos). La contaminación post-cocción es el principal factor que permite la contaminación de los alimentos listos para consumo (Jay, 2000).

Pseudomonas spp: bacteria Gram negativa, aeróbica, pueden crecer dentro de un pH 4.0 a 8.0 (Jay, 2000) Generan daños en los productos cárnicos, ya que degradan compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, compuestos aromáticos y xenobióticos. En ausencia de azúcares pueden atacar a los aminoácidos y producir malos olores (Adams y Moss, 2008).

Escherichia coli: bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, oxidasa negativa, catalasa positiva y mesófila. Forma parte de la flora normal intestinal de los animales (Adams y Moss, 2008), por lo que resulta un buen indicador de contaminación fecal. Puede sobrevivir a congelación, representan un riesgo para consumir si no se cocina adecuadamente (Jay, 2000). Las infecciones causadas por este microorganismo pueden ser debidas a variedades distintas de esta bacteria, con mecanismos de acción diferentes:

E. coli enterotoxigénico: Producen toxinas secretoras y el inóculo de microorganismos debe ser lo suficientemente alto como para resistir el pH ácido del estómago. Clínicamente aparece diarrea líquida, sin moco ni sangre. *E. coli* enteropatógeno: determinados serotipos, producen diarreas con heces líquidas con moco sin sangre en lactantes y niños pequeños (Adams y Moss, 2008).

E. coli enteroinvasivo: actúa invadiendo las células del epitelio intestinal. Causa diarrea aguda similar a la producida por el género *Shigella*, produciendo lesiones ulceradas en el colon. *E. coli* enterohemorrágico: produce toxinas citotóxicas (verotoxina). El cuadro se caracteriza por dolor abdominal intenso y diarrea con sangre. El serotipo más habitual es O157:H7. Se han descrito brotes por consumo de hamburguesas poco cocinadas (Adams y Moss, 2008).

Brochothrix thermosphacta: bacteria Gram positiva, catalasa positiva y anaerobia facultativa. Metaboliza azúcares por fermentación, no tiene movilidad, responsable de la generación de malos olores en la carne empacada al vacío y resistente a los nitritos. Son comunes en la superficie de carnes sometidas a algún tipo de tratamiento que se guardan en envases impermeables a los gases a temperaturas de refrigeración (Jay, 2000).

3.6 Tecnología de barreras.

La estabilidad microbiana y la seguridad de los alimentos está basada en una combinación de fuertes factores de conservación llamados “barreras” las cuáles no deberán ser superadas por los microorganismos presentes en el alimento. El efecto barrera es de fundamental importancia para la preservación de alimentos, desde una

barrera que mantenga la estabilidad microbiológica hasta una que evite que sea tóxico (Leistner, 2007; Leistner y Gould, 2005).

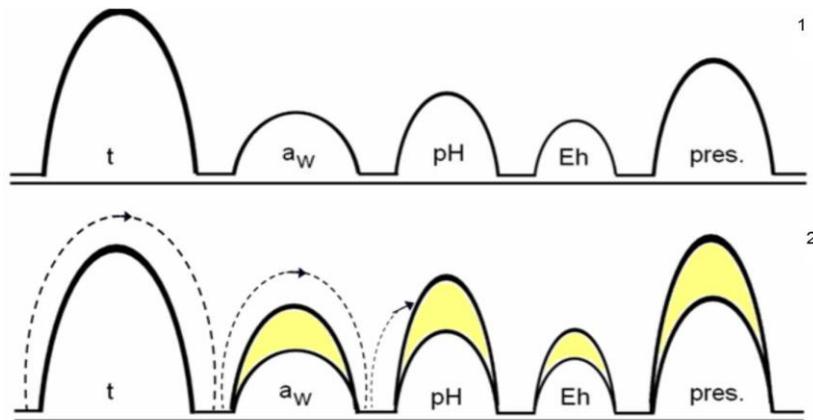
Más de 60 potenciales barreras han sido identificadas por la Unión Europea (UE), pero probablemente existan cientos de antimicrobianos de origen natural que sean barreras en potencia (Leistner, 2007). En los países industrializados la tecnología de barreras actualmente es de particular interés para los alimentos mínimamente procesados, así como en los países en vías de desarrollo donde está presente la importancia de tener alimentos estables para almacenarlos sin refrigeración y para la modificación de alimentos tradicionales de humedad intermedia (IMF y $0.6 < a_w < 0.9$), así como los de alta humedad (HMF y $a_w > 0.9$) (Leistner y Gould, 2005).

Muchas de las tecnologías de barreras actúan principalmente interfiriendo con o completamente previniendo, reacciones homeostáticas en microorganismos. La reparación de una perturbación homeostática exige mucha energía y por lo tanto, es la restricción del suministro de energía la que inhibe los mecanismos de reparación de las células microbianas y lleva a un efecto sinérgico de los factores protectores (barreras).

Las restricciones de energía para los microorganismos son causados por condiciones anaeróbicas, tales como el empaçado al "vacío" o "atmósfera modificada"; por lo tanto la interferencia con la homeostasis de los microorganismos es el fundamento más usado para preservar los alimentos (Leistner, 2007), Ver anexo A (Leistner y Gould, 2005).

La imagen 3 muestra ejemplos del uso de la tecnología de barreras. El ejemplo 1 representa un alimento que tiene cinco barreras, aquí la temperatura de almacenado es baja (t), actividad acuosa baja (a_w), acidez alta (pH), potencial redox (Eh) no es modificado y tiene conservadores (pres.); en el ejemplo 2 el microorganismo presente no puede pasar estas barreras y es un alimento estable y seguro, pero este es un caso ideal porque todas las barreras tienen el mismo peso e intensidad y raramente ocurre.

Imagen 3. Efecto de la tecnología de barreras.



Fuente: (Leistner, 2007)

Cuando se usa la tecnología de barreras es importante que todas las barreras sean las correctas y los factores protectores sean suficientes para el blanco. Cada uno de los obstáculos es un punto crítico de control dentro del proceso de producción y si cualquiera de las barreras es incorrecta, entonces el sistema de preservación de alimentos se verá afectado y fallará (Betts y Everis, 2008).

3.7 Las enterocinas y la tecnología de barreras en embutidos.

Las bacteriocinas a pesar de tener aplicaciones en muchos tipos de alimentos, no deberían ser consideradas como único conservador, sino más bien como parte de un sistema de barreras que utilice múltiples factores (Castro *et al.*, 2004). Las bacteriocinas a menudo actúan de forma sinérgica con otros tratamientos y pueden ser usadas como una barrera adicional para mejorar la seguridad de los alimentos (Leistner, 2007).

La aplicación de bacteriocinas en el biocontrol de los alimentos está orientada principalmente en dos direcciones: el uso de BAL productoras de bacteriocinas o la aplicación directa de bacteriocinas ya sea sintetizadas o producidas "*in situ*". Dentro de este panorama se ha visto que algunas bacteriocinas han sido muy efectivas al desarrollar efectos sinérgicos con altas presiones hidrostáticas, al igual que con la combinación de tratamientos térmicos. También se ha observado que la adición de bacteriocinas a los sistemas alimentarios tiene efecto sobre algunas propiedades organolépticas como el aroma y el sabor entre otros. (Hugas *et al.*, 2003).

Capítulo 4

4. Objetivos

4.1 Objetivo general:

Determinar la efectividad de un extracto de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29 en combinación con otros conservadores de uso común en la industria cárnica (benzoatos, sorbatos, nitritos y lactatos) contra microorganismos de deterioro y patógenos in vitro y en un sistema modelo de emulsión cárnica.

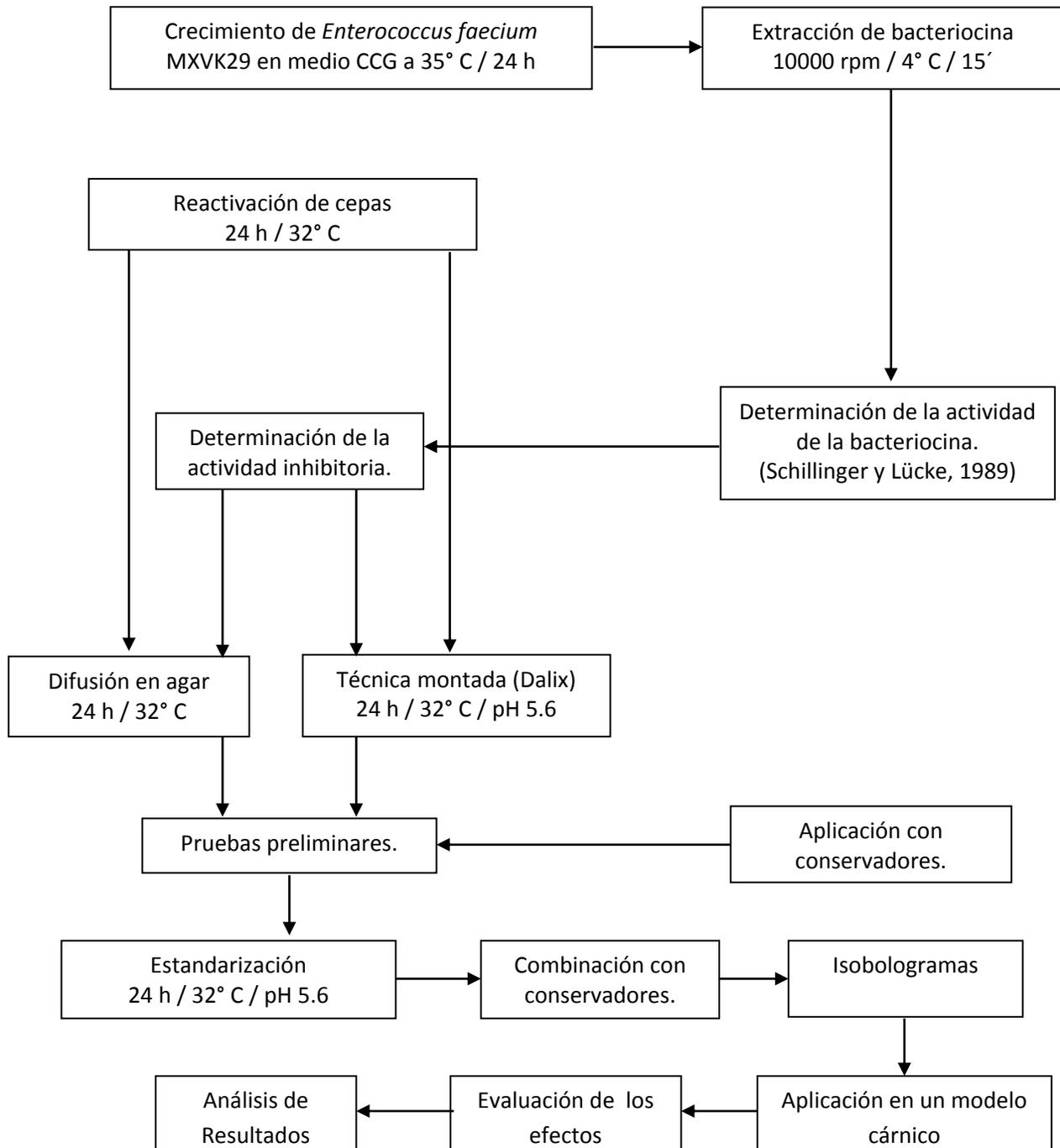
4.2 Objetivos específicos:

- a) Obtener un extracto crudo de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29.
- b) Determinar la concentración inhibitoria de la bacteriocina y de los conservadores contra *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* y *Pseudomonas putida*.
- c) Evaluar el efecto antimicrobiano de la bacteriocina en combinación con conservadores químicos in vitro contra los microorganismos reto.
- d) Determinar el o los antimicrobianos que tengan un efecto sinérgico con la bacteriocina contra *Brochothrix thermosphacta* y ver sus efectos en una emulsión modelo, aplicando la tecnología de barreras.

Capítulo 5

5. Metodología

Imagen 4. Metodología general en el proyecto.



5.1 Crecimiento de cepas.

Las cepas se obtuvieron de diferentes fuentes (tabla 5), *Enterococcus faecium* fue cultivado en medio CCG (Anexo B); *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* y *Pseudomonas putida* en medio TSB (Anexo B). Todos los microorganismos fueron incubados a 32° C.

Tabla 5. Cepas utilizadas y clasificación.

Cepa	Tipo de Bacteria
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK29(2)	Gram (+)
<i>Brochothrix thermosphacta</i> NCIB-10018(2)	Gram (+)
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090(2)	Gram (+)
<i>Escherichia coli</i> JM P101(1)	Gram (-)
<i>Pseudomonas putida</i> (2)	Gram (-)

(1) Dr. M. Collins, Queen 's University of Belfast, Irlanda.

(2) Laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México.

5.2 Extracción de la bacteriocina.

5.2.1 Extracto crudo.

La extracción del compuesto antimicrobiano se llevó a cabo a partir de un cultivo de 24 horas de *Enterococcus faecium* MXVK29 el cual fue sometido a un tratamiento térmico a 70° C durante 30 minutos para la inactivación de las proteasas (Katla *et al.*, 2003) que pudieran estar presentes en el medio. Posteriormente se ajustó el pH del cultivo a 6.5 con una solución 10M de NaOH para neutralizar metabolitos ácidos producidos por la cepa.

Las células se mantuvieron en agitación a 4° C durante 10 horas. Posteriormente se sometieron a centrifugación a 3100 x g durante 20 minutos a 4° C para descartar células y retener el sobrenadante con la bacteriocina; luego se liofilizó a 0.005 atm y -60° C para concentrar el compuesto antimicrobiano. Una vez concentrado se disolvió en agua destilada y esterilizada para obtener una solución de bacteriocina 500 mg/mL, finalmente se filtró a través de membranas estériles Millipore (Durapore® Membrane Filters, GV, Irlanda) con tamaño de poro de 0.22 µm. El filtrado obtenido es lo que se denomina extracto crudo (EC).

5.3 Determinación de la actividad inhibitoria.

El extracto crudo liofilizado se disolvió en buffer de fosfatos 0.1M pH 7, al cual se le determinó la concentración de proteína por el método de Bradford, en un Biofotómetro Eppendorf® 6131. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de dos. La actividad antimicrobiana del extracto crudo se realizó por el método de difusión en agar (Schillinger y Lücke, 1989) con modificaciones, utilizando *Listeria innocua* ATCC33090 como cepa sensible. La técnica consistió en depositar 30 µL (EC) en pozos hechos con una pipeta Pasteur estéril en agar TSA semisólido (0.8% de agar bacteriológico), sobre una capa del mismo medio pero con 1.5% de agar bacteriológico.

El medio semisólido (10mL) fue previamente inoculado con 70 µL de un cultivo en fase logarítmica 10^6 - 10^7 ufc/mL ($D.O_{600nm} = 0.15$) de la cepa sensible (*Listeria innocua* ATCC33090). La actividad del compuesto antimicrobiano tipo bacteriocina se evaluó determinando el halo de inhibición formado, una vez incubada la placa a 37 °C durante 24 h para el desarrollo de la cepa sensible. Para determinar la actividad de los extractos crudos, las cepas productoras se incubaron en

condiciones de anaerobiosis, para descartar presencia de halos derivados de la producción de peróxido de hidrógeno.

La actividad de extracto crudo de bacteriocina se reportó en Unidades Arbitrarias por gramo de extracto liofilizado (UA/g). Las unidades específicas (UA/ μg de proteína) se calcularon con las UA/mL o UA/mg entre μg de proteína/mL o μg de proteína/mg; estando definida 1 UA como el inverso de la máxima dilución (base 2) en la cual se tiene un halo de inhibición de 2 mm de diámetro entre el volumen del compuesto antimicrobiano colocado en cada pozo por el factor de conversión ($D \times 1000/30$, donde D = inverso dilución; (Bhunia *et al.*, 1991; Chikindas *et al.*, 2004).

$$UA = \frac{D}{V} \times F_D$$

UA = unidades arbitrarias en un mililitro.

D = inverso de la dilución base 2.

V = volumen de bacteriocina en cada pozo (30 μL).

F_D = factor de conversión (1000 μL / 1mL).

5.4 Actividad antimicrobiana de los conservadores.

La determinación se hizo mediante una técnica montada (Dalix) que es una combinación de la técnica de Miles y Misra (Miles *et al.*, 1938) y el método de la traza de la dilución (Pérez *et al.*, 2002). Para ello se reactivaron las cepas de los microorganismos sensibles (*Enterococcus faecium*, *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*). Las concentraciones utilizadas para cada conservador se determinaron de acuerdo a los datos reportados en la

bibliografía (anexo A; Smith, 1993; Lück y Jager, 1999; Davidson *et al.*, 2002; Davidson y Branen, 2005).

Se realizaron soluciones de los conservadores a diferentes concentraciones, usando el buffer de citratos (pH 5.6) como disolvente, con excepción del lactato de sodio. Se prepararon cajas con 5 mL de agar TSA (1.5%) y 5 mL de cada una de las soluciones de los diversos conservadores: lactato de sodio (0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 10 y 20 mg/mL), benzoato de sodio (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL), sorbato de potasio (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL) y nitrito de sodio (como sal cura, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg/mL) así como la bacteriocina (3.125, 6.25, 12.5, 25, 37.5 y 50 mg/mL).

Se utilizó un control negativo (sin antimicrobianos) y dos controles positivos probando por separado cada uno de los antimicrobianos. Las cajas preparadas con los diferentes antimicrobianos se dividieron en secciones y en cada sección se colocaron 10 μ L de inóculo de los diferentes microorganismos a una $DO_{\lambda 600nm} = 0.1$ para *E. coli*, *P. putida* y *B. thermosphacta* y a una $DO_{\lambda 600nm} = 0.15$ para *L. innocua*; las cajas se incubaron por 24 horas a 32° C.

Para las combinaciones se tomaron 2.5 ml del antimicrobiano A (bacteriocina) y 2.5 ml del antimicrobiano B (el que corresponda según la combinación). Después de 24 h de incubación, se observó en que dilución de cada una de las bacterias existía una inhibición total del crecimiento y posteriormente se estimó la concentración bacteriana que fue inhibida.

5.4.1 Actividad antimicrobiana de las combinaciones.

La evaluación de la combinación de agentes antimicrobianos fue necesaria debido a que un microorganismo puede ser resistente a la inhibición y/o eliminación por dosis convencionales de un solo antimicrobiano, pero al ser expuesto a una combinación de agentes puede aumentar su actividad antimicrobiana. Existen además varias razones que nos llevan a la combinación de antimicrobianos para la inhibición de microorganismos por ejemplo (Eliopoulos y Moellering, 1991):

- a) Algunos agentes solo pueden utilizar hasta ciertas concentraciones límites, debido a que pueden causar toxicidad si se utilizan por arriba de dichas concentraciones.
- b) Desarrollar un proceso adecuado para la conservación de alimentos mediante tecnología de barreras.

Cuando se combinan dos antimicrobianos, pueden suceder tres efectos; Un efecto aditivo, que es igual a la suma de los efectos observados con los agentes probados individualmente o igual al agente más activo en la combinación (Barreto, 2003). El sinergismo donde el efecto que se observa con una combinación es mayor que la suma de los efectos observados de los agentes probados individualmente. El antagonismo ocurre cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto es reducida con la presencia de un segundo agente antimicrobiano.

Las pruebas de combinación se realizaron con la técnica descrita en el punto 5.4, junto con un arreglo tipo ajedrez. El diseño tipo ajedrez se utiliza porque se entiende fácilmente, los cálculos matemáticos

necesarios para interpretar y calcular los resultados son simples y se obtienen buenos resultados cuando se desea definir si existe sinergismo entre agentes. El término tablero de ajedrez se refiere a diluciones múltiples de dos antimicrobianos evaluados en concentraciones iguales por arriba y por debajo de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) o concentraciones mínimas bactericidas (CMB) (Eliopoulos y Moellering, 1991).

5.4.2 Evaluación de los efectos de las combinaciones.

Un método para saber el tipo de interacción que siguen los antimicrobianos es el uso de isobogramas. Estos diagramas se realizan usando los datos de CMIs (concentraciones mínimas inhibitorias) directamente o calculando las CFIs (Concentraciones Fraccionarias Inhibitorias). Este método para evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes agentes sobre crecimiento microbiano, está basado en el diseño tipo ajedrez (Davidson y Parish, 1989).

Para evaluar el tipo de efecto que presentan las mezclas se calcularon las CFIs para los microorganismos diana. Con las CMIs o CMBs obtenidas se construyen los isobogramas y se calcula la concentración fraccional inhibitoria (CFI) de acuerdo a lo reportado por (Davidson y Parish, 1989) así como el cálculo del índice CFI (CFI_I).

Las CMB de los antimicrobianos empleados en forma individual se definieron como la cantidad de agente antimicrobiano que inhibió el crecimiento de los microorganismos diana durante 24 horas a 35°C. Una vez determinadas las CMB individuales se aplicaron los diseños tipo tablero de ajedrez para evaluar los efectos sobre el crecimiento de los

microorganismos diana de las diferentes mezclas de agentes antimicrobianos.

Las CMI se transforman a las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI). Las concentraciones fraccionales inhibitorias de un agente antimicrobiano individual (A) es la relación de la CMI del antimicrobiano en combinación con un segundo compuesto (AB) a la CMI del antimicrobiano por si solo (A), es decir, la concentración de un compuesto necesaria para inhibir el crecimiento tiene un valor de 1, y la concentración necesaria del compuesto para inhibir el crecimiento cuando se combina con otro agente antimicrobiano se expresa como una fracción:

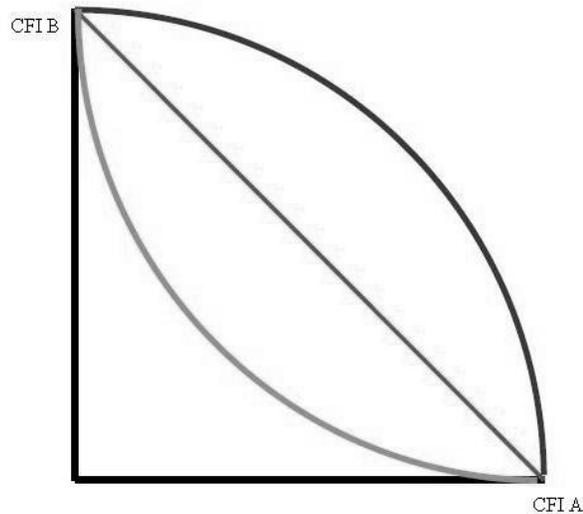
$$\text{CFI A} = (\text{CMI de A en presencia de B}) / (\text{CMI de A individualmente})$$

$$\text{CFI B} = (\text{CMI de B en presencia de A}) / (\text{CMI de B individualmente})$$

$$\text{Índice CFI} = \text{CFI A} + \text{CFI B}$$

A partir del valor del índice CFI se puede determinar si la mezcla es aditiva, antagónica o sinérgica. Una mezcla es aditiva si el valor del índice CFI es igual a la unidad, antagónica si es > 1 y sinérgica si es < 1 . Estas mismas fórmulas y criterios se pueden aplicar a mezclas de 3 o más antimicrobianos según lo reportado por (Berenbaum, 1978) (Branen y Davidson, 2004), ver anexo C.

Imagen 5. Representación de un isoblograma de la combinación de dos antimicrobianos.



La curva por debajo de la diagonal representa un efecto sinérgico, mientras que la curva por encima representa un efecto antagónico.

5.5 Evaluación en un modelo cárnico.

En este punto, solo los antimicrobianos que presentaron un efecto sinérgico con la bacteriocina fueron evaluados en una emulsión cárnica modelo contra uno de los microorganismos diana que en base a la bibliografía y los resultados de los puntos anteriores fue el más adecuado.

5.5.1 Modelo cárnico.

Se realizó una emulsión cárnica según la formulación (anexo B), se dividió en partes suficientes para agregar los antimicrobianos (nitrito y lactato de sodio) seleccionados de la sección anterior. Las diferentes "pastas" se embutieron en una funda de celulosa, que se sometió a un proceso térmico (72° C por 30 minutos), posteriormente se realizó un

choque térmico (0° C por 5 minutos). Las muestras elaboradas tenían un tamaño de 2.5 cm de largo y un diámetro de 2 cm. La funda de celulosa se retiró en condiciones estériles y se aplicó la bacteriocina a las concentraciones adecuadas (3.125 y 6.125 mg/mL) a manera de recubrimiento. Una vez que se agregó la bacteriocina, los embutidos se dejaron secar en flujo laminar y en condiciones estériles a 30° C por 2 minutos.

Se prepararon 60 muestras con sus respectivos duplicados para realizar un seguimiento de los efectos microbiológicos, pH y cambios de color de la emulsión cárnica elaborada. El seguimiento se realizó durante 30 días a 10° C. Las muestras se inocularon (ver tabla 6) con *B. thermosphacta* a una $DO_{\lambda 600nm} = 0.1$ con equivalente a $10^6 - 10^7$ ufc/mL. Por último se envasaron al vacío (0.005 atm) y se colocaron en refrigeración a 10° C.

Tabla 6. Diseño de experimentos para obtener una emulsión cárnica

Emulsión	Inoculo	Tipo	Grupo				Días de Muestreo				
							1	3	7	14	30
sola	No	Control	1	2	3	4	Si	Si	Si	Si	Si
sola	Si	Control	1	2	3	4	Si	Si	Si	Si	Si
con bacteriocina [3.125]	Si	Control	1	2	3	4	Si	Si	Si	Si	Si
con bacteriocina [6.25]	Si	Control	1	2	3	4	Si	Si	Si	Si	Si
con nitritos [0.05]	No	Control	1	2			Si	Si	Si	Si	Si
con nitritos [0.05]	Si		1	2			Si	Si	Si	Si	Si
con nitritos y bacteriocina [3.125]	Si			2		4	Si	Si	Si	Si	Si
con nitritos y bacteriocina [6.25]	Si			2		4	Si	Si	Si	Si	Si
con lactato [0.2 ppm]	No	Control	1			3	Si	Si	Si	Si	Si
con lactato [0.2 ppm]	Si		1			3	Si	Si	Si	Si	Si
con lactato y bacteriocina [3.125]	Si					3	4	Si	Si	Si	Si
con lactato y bacteriocina [6.25]	Si					3	4	Si	Si	Si	Si

Todas las concentraciones están dadas en mg/mL. Los Controles sirven como referencia al momento de comparar los diferentes tratamientos.

5.5.2 Análisis microbiológico.

Se realizó con base en las normas oficiales vigentes (NOM-109-SSA1-1994, 1994; NOM-110-SSA1-1994, 1994); la metodología se escaló para poder trabajar con muestras de menor tamaño, por lo que los datos obtenidos son válidos.

5.5.2.1 Cuenta estándar.

Se realizó el muestreo de acuerdo a las normas microbiológicas para productos cárnicos y alimenticios (NOM-092-SSA1-1994, 1994; NOM-213-SSA1-2002, 2002). En medio cuenta estándar y se incubó por 24 h a 35 ° C.

5.5.2.2 Bacterias ácido lácticas.

El muestreo se hizo en medio APT y según las indicaciones de este medio (anexo B). Se incubaron en cámaras de anaerobiosis por 24 h a 35° C.

5.5.2.3 *Brochothrix thermosphacta*.

La determinación se hizo de acuerdo a la (ISO 13722, 1996) (anexo B). En medio STAA y se incubó por 48 h a 25° C.

5.5.3 Medición de pH.

Se tomó 1g de la muestra y se homogenizó en 9 mL de solución salina, y se determinó el pH empleando un potenciómetro Hanna Instruments®, U.S.A. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

5.5.4 Medición de color.

La determinación de color se realizó empleando un colorímetro Hunter Lab ColorFlex® modelo D25-PC2 (Hunter-Lab, Inc. Virginia, USA). La lectura fue realizada con las muestras dentro del empaque (sin abrir) con un observador patrón a 10°, iluminante D₆₅ y un puerto de 0.75 pulgadas. Cada lectura se realizó por cuadruplicado, obteniendo los valores: L*, a* y b*, además del espectro de reflectancia para cada muestra. Con estos se obtuvieron los valores de Hue y Chroma, presentes en las emulsiones cárnicas (American Meat Science association, 1991).

$$\text{Hue} = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*}$$

$$\text{Chroma} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

5.5.5 Análisis Estadístico.

Todos los experimentos fueron acompañados al menos por un duplicado y se analizaron empleando el análisis de componentes principales (PCA) con el programa de The Unscrambler X® para Windows® (CAMO Software AS, Oslo, Norway). También se analizaron empleando el análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias se realizó por el método de Duncan con el programa estadístico SPSS para Windows® (SPSS 19.0 Inc, Chicago, Illinois, USA). El nivel de significancia establecida en todos los casos fue de $\alpha=0.05$.

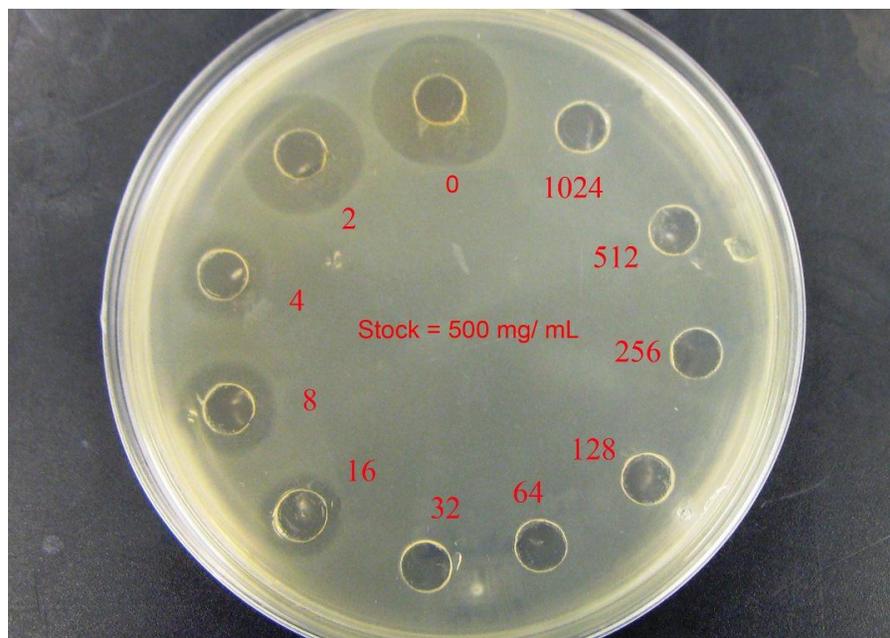
Capítulo 6

6. Resultados y discusión

6.1 Determinación de la actividad inhibitoria.

La actividad se evaluó determinando la dilución más alta en la que se observó un halo de inhibición (Imagen 6) cuando se disuelven 500mg de bacteriocinas por mL de buffer. El EC de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* presentó halos de inhibición hasta la dilución 16, dando una actividad de 1066.7UA/g de extracto crudo liofilizado (533.3 UA/mL de extracto) y una concentración de proteína de 11.33 μ g/mL de extracto, que expresado en unidades específicas correspondió a 46.34 UA/ μ g de proteína (Anexo C).

Imagen 6. Determinación de actividad antimicrobiana de la bacteriocina por el método de difusión en agar.



Microorganismo sensible: *Listeria innocua* ATCC33090

6.2 Actividad antimicrobiana de los conservadores.

Las concentraciones de benzoato de sodio, sorbato de potasio, nitrito de sodio (como sal cura) y lactato de sodio con los diferentes microorganismos reto están reportadas en el anexo A. Las pruebas antimicrobianas se realizaron por la técnica dalix para los diferentes microorganismos diana (*Listeria innocua*, *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*) se muestran en la tabla 7.

Los benzoatos y sorbatos en concentraciones 0.1 y 0.2 mg/mL tienen un efecto inhibitorio sobre los microorganismos diana utilizados, excepto en *Pseudomonas putida*; debido a que el pH de 5.6 es más cercano a el mecanismo de acción de estos conservadores, puesto que su eficacia se encuentra entre un pH de 2.0 a 4.5 (Chipley, 2005).

Una limitante durante el experimento fue el pH, ya que se decidió no disminuirlo de 5.6, debido a que microorganismos como *Listeria innocua* no crecen a pH menores a este valor. Las pruebas con altas concentraciones de benzoatos y sorbatos en las que no hubo inhibición contra los microorganismos, se puede atribuir a una posible resistencia que presentan dichos microorganismos.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de conservadores contra microorganismos de deterioro y patógenos a pH 5.6 y aw 0.99

Antimicrobiano	[mg/mL]	<i>Listeria innocua</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
CNT		⊖	⊖	⊖	⊖
Bacteriocina	3.125	¥	¥	¥	⊖
	6.25	¥	⊖	¥	⊖
	12.5	¥	¥	¥	⊖

	25	¥	¥	¥	⊖
	37.5	¥	¥	¥	⊖
	50	¥	¥	¥	⊖
Benzoato de sodio	0.1	¥	¥	¥	⊖
	0.2	¥	¥	¥	⊖
	0.4	⊖	⊖	⊖	⊖
	0.6	⊖	¥	⊖	⊖
	0.8	⊖	¥	⊖	⊖
	1.0	⊖	¥	¥	⊖
Sorbato de potasio	0.1	¥	¥	¥	⊖
	0.2	¥	¥	¥	⊖
	0.4	⊖	¥	⊖	⊖
	0.6	⊖	¥	⊖	⊖
	0.8	⊖	¥	¥	⊖
	1.0	⊖	¥	⊖	⊖
Lactato de sodio	0.1	⊖	¥	⊖	⊖
	0.2	¥	¥	¥	⊖
	0.4	⊖	¥	⊖	⊖
	0.5	⊖	¥	¥	⊖
	10	⊖	¥	¥	⊖
	20	⊖	¥	⊖	⊖
Sal Cura	0.05	¥	¥	¥	⊖
	0.1	¥	¥	¥	⊖
	0.2	⊖	¥	⊖	⊖
	0.4	⊖	¥	⊖	⊖
	0.6	⊖	¥	⊖	⊖
	0.8	⊖	¥	⊖	⊖
CNT Control (Agar TSA pH 5.6) ⊖ Crecimiento del microorganismo ¥ Inhibición del microorganismo					

El lactato presentó inhibición sobre los microorganismos evaluados, con excepción de *Pseudomonas putida*, debido a que las concentraciones usadas de lactato son bajas, y para poder observar un efecto inhibitorio contra *Pseudomonas* se requieren concentraciones mayores al 2% (Doores, 2005). La eficacia contra *Escherichia coli* en todas las concentraciones evaluadas del conservador, se puede deber al

descenso de pH que se causó en el medio, además del uso de concentraciones $10^1 - 10^3$ ufc/mL del microorganismo.

Sin embargo, a pesar de usar concentraciones $10^1 - 10^3$ y un pH de 5.6, *Pseudomonas* no fue inhibida, lo cual se puede deber a que estas pueden crecer a pH bajo, mientras que *Listeria innocua* y *Brochothrix thermosphacta* son menos susceptibles (Doores, 2005), ya que se ha encontrado que este mecanismo es totalmente reversible y en presencia de ácido láctico y/o sus sales los microorganismos productores gastan energía en tratar de eliminar el ácido y no gastan energía en reproducirse, además se ha encontrado que *Listeria* es ácido tolerante (Lehrke *et al.*, 2011) y su límite de tolerancia depende del medio en que se encuentre, por lo que solo a 0.2 mg/mL del antimicrobiano hay inhibición hacia estos microorganismos. *Brochothrix thermosphacta* a pesar de ser un productor de ácido láctico, puede resistir más sus efectos ya que es un microorganismo, cuyo metabolito principal en condiciones aerobias no es el ácido láctico (Stackerbrandt y Jones, 2006).

Por otro lado, la bacteriocina presentó un efecto antimicrobiano muy eficaz contra *Listeria innocua* y *Brochothrix thermosphacta* en todas las concentraciones usadas, mientras que para *Escherichia coli*, solo hubo crecimiento en la concentración de 6.25 mg/mL ya que por lo general las bacterias Gram (-) son más resistentes que las Gram (+). Mientras que *Pseudomonas putida* presentó resistencia porque además de ser Gram (-) es un microorganismo que presenta diversos mecanismos de defensa, como la producción de enzimas proteolíticas capaces de degradar los péptidos antimicrobianos y crece en pH de 4.0 a 8.0 (Guérin-Méchin *et al.*, 2004; McPhee y Griffiths, 2011; Zago y Chugani, 2009).

La actividad observada contra bacterias Gram negativas es inusual (Alvarado *et al.*, 2005; Martín-Platero *et al.*, 2006), aunque existen algunos reportes de bacteriocinas producidas por BAL que inhiben a estos microorganismos (De Kwaadsteniet *et al.*, 2005; Line, *et al.*, 2008).

Las diferentes concentraciones utilizadas de nitrito de sodio, presentaron un efecto antimicrobiano contra *Escherichia coli*, mientras que para *Listeria innocua* y *Brochothrix thermosphacta* solo hubo inhibición con 0.5 y 1.0 mg/mL debido a que los nitritos que contiene la sal cura generalmente son más efectivos a pH ácido puesto que se transforman en HNO_2 y NO , estos tienen dos áreas fundamentales de la reacción: (1) con la célula bacteriana y (2) con diversos componentes del medio, haciendo que no estén disponibles para su metabolismo posterior (Shafiur, 2007). Sin tomar en cuenta que muchas otras sustancias como ascorbatos y eritorbatos favorecen la efectividad de los nitritos, y cuya interacción con los nitritos no se pueden dar en el medio (Smith, 1993; Lück y Jager, 1999; Tompkin, 2005).

Por otra parte ya que no hubo efecto sobre *Pseudomonas putida*, debido a lo anteriormente mencionado y a que son muy adaptables a diferentes condiciones, este microorganismo ya no se utilizó en el resto de los experimentos.

6.2.1 Actividad antimicrobiana de las combinaciones.

Las pruebas de combinación de conservadores se realizaron con base en los resultados de la actividad antimicrobiana de cada uno de los conservadores por separado.

Los resultados de la combinación (arreglo tipo ajedrez) de la bacteriocina con los conservadores (benzoato de sodio, lactato de sodio, sorbato de potasio y nitrito de sodio) se observan en la tabla 8. Se consideraron únicamente las 3 concentraciones más bajas utilizadas para cada microorganismo, donde no se observó crecimiento de los diferentes microorganismos en estudio, cuando se utilizaron de forma individual.

Tabla 8. Pruebas combinatorias de conservadores químicos con la bacteriocina de acuerdo a un arreglo tipo ajedrez.

Microorganismo	Bacteriocina [mg/mL]	Benzoato [mg/mL]			Sorbato [mg/mL]			Lactato [mg/mL]					Nitrito de sodio [mg/mL]		
		0.1	0.2	0.4	0.1	0.2	0.4	0.1	0.2	0.4	0.5	10	0.05	0.1	0.2
<i>Listeria innocua</i>	3.125	⊖	⊘	⊘	⊖	⊖	⊘	⊖	⊖	⊖	---	---	⊘	⊖	⊘
	6.25	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊖	⊖	⊘	---	---	⊘	⊘	⊘
	12.5	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	---	---	⊘	⊘	⊘
<i>Escherichia coli</i>	3.125	⊖	⊖	⊖	⊖	⊘	⊘	⊘	⊖	⊘	---	---	⊘	⊘	⊘
	6.25	⊘	⊘	⊖	⊖	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	---	---	⊘	⊘	⊘
	12.5	⊘	⊘	⊘	⊖	⊖	⊖	⊘	⊘	⊖	---	---	⊘	⊘	⊘
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	3.125	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	---	⊘	---	⊘	⊖	⊘	⊘	⊘
	6.25	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	---	⊘	---	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘
	12.5	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	---	⊘	---	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘

⊘ Inhibición del microorganismo
 ⊖ Crecimiento del microorganismo
 --- No evaluado

Las combinaciones de benzoatos y bacteriocina en general presentan una mejor inhibición contra los diversos microorganismos, lo que resulta interesante ya que puede significar un posible efecto sinérgico, el cual se determina de forma cuantitativa con la construcción de isobogramas. Al comparar las tablas 8 y 9, podemos deducir una

tendencia de mayor inhibición en presencia de ambos conservadores en sus diferentes combinaciones.

6.2.2 Evaluación de los efectos de las combinaciones.

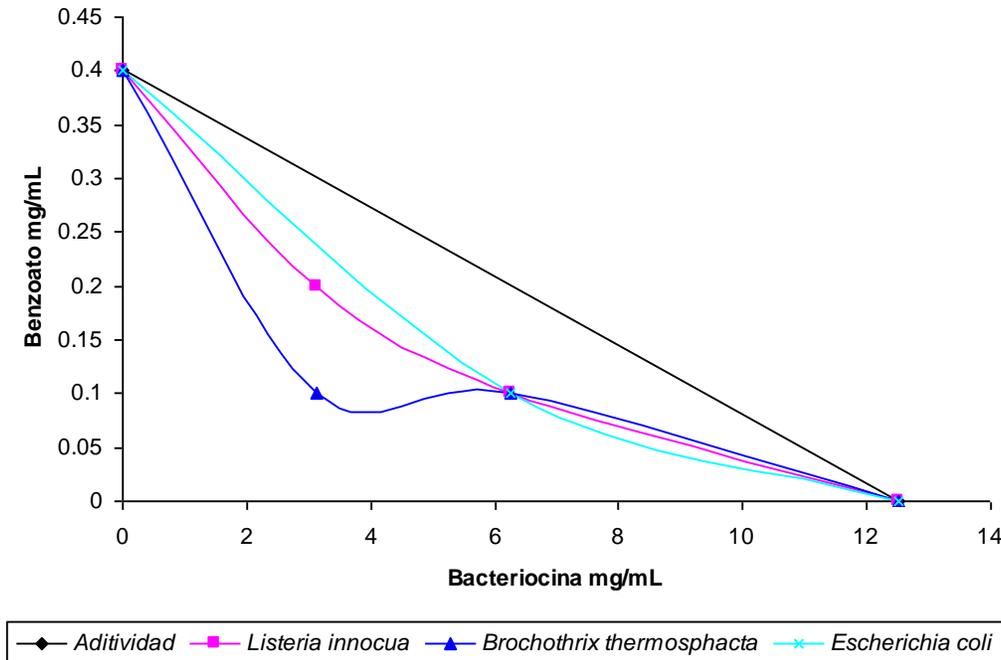
Para evaluar el tipo de efecto que presentan las mezclas se calcularon las concentraciones fraccionales inhibitorias para *B. thermosphacta*, *E.coli* y *L.innocua*. En el anexo C se muestran los resultados de las CFI para estos microorganismos con los diferentes conservadores.

Los isobogramas indican si existe un efecto (sinérgico, aditivo o antagónico) en las mezclas benzoato de sodio – bacteriocina, sorbato de potasio – bacteriocina, lactato de sodio – bacteriocina y sal cura – bacteriocina, contra los microorganismos diana. Una línea recta, marca que el efecto es aditivo (línea de aditividad), si la curva es desviada por debajo y hacia la izquierda de la línea recta el efecto es sinérgico y si la línea es desviada por encima y a la derecha, el efecto es antagónico (Tompkin, 2005).

Las pruebas realizadas mostraron que las combinaciones de benzoatos y bacteriocina tienen un efecto sinérgico contra tres de los microorganismos en estudio (*B.thermosphacta*, *E.coli* y *L.innocua*) con una $CFI_I < 1$ (0.63, 0.38 y 0.75, respectivamente). Los isobogramas corroboraron este hecho, ya que indicaron de forma cualitativa que existe un efecto sinérgico entre la bacteriocina y el conservador contra los microorganismos evaluados.

En la gráfica 1 se observa que existe un efecto sinérgico entre la bacteriocina y el benzoato de sodio contra *B.thermosphacta*, *E.coli* y

L.innocua, además el isoblograma indica que la actividad antimicrobiana se incrementa en las combinaciones con concentraciones bajas de bacteriocina (3.125 y 6.250 mg/mL) y benzoato de sodio (0.1 y 0.2 mg/mL).

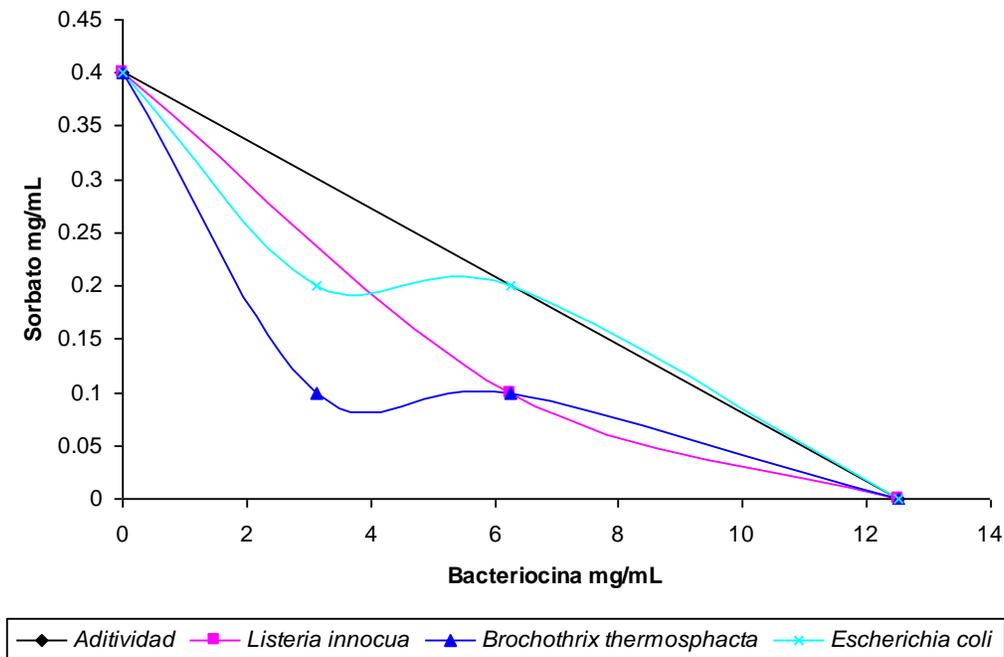


Gráfica 1. Isoblograma de la combinación benzoato de sodio – bacteriocina para *B. thermosphacta*, *E.coli* y *L.innocua* a_w 0.99 y pH 5.6

Las combinaciones de sorbato de potasio y bacteriocina tienen un efecto sinérgico contra *B.thermosphacta* y *L.innocua*, pero al ser probados contra *E.coli* sólo se demostró este efecto en la primera mitad del isoblograma (0 a 6.250 mg/mL), en tanto que en la otra mitad se observó un efecto aditivo (gráfica 2).

Además la concentración fraccional inhibitoria obtenida contra *B.thermosphacta* cuando se utiliza la combinación de bacteriocina con sorbato de potasio o benzoato de sodio es la misma ($CFI_I = 0.63$), lo cual se puede deber a que el mecanismo de acción de ambos conservadores

es a nivel de pared celular en su forma disociada (Lück, Erich y Jager, 1999). Por otra parte, *L.innocua* presentó un perfil diferente cuando se probó la combinación con el sorbato de potasio, ya que además de tener una CFI_I mayor (0.75), sólo se encontró una combinación con efecto sinérgico (0.1 y 6.250 mg/mL).



Gráfica 2. Isoblograma de la combinación sorbato de potasio – bacteriocina para *B. thermosphacta*, *E.coli* y *L.innocua* a_w 0.99 y pH 5.6

Finalmente el uso de esta combinación demostró tener dos tipos de efectos frente a *E.coli*; uno de tipo sinérgico, que se observa en las concentraciones más bajas de ambos conservadores (0.2 y 3.125 mg/mL) y otro de tipo aditivo a partir de 6.250 mg/mL.

Este último efecto indica que cuando se utilizan cualquiera de los dos conservadores en combinación, la suma de los efectos de cada compuesto es aproximadamente igual al uso de cada uno de forma independiente (López-Malo *et al.*, 2005). El lactato de sodio presentó un

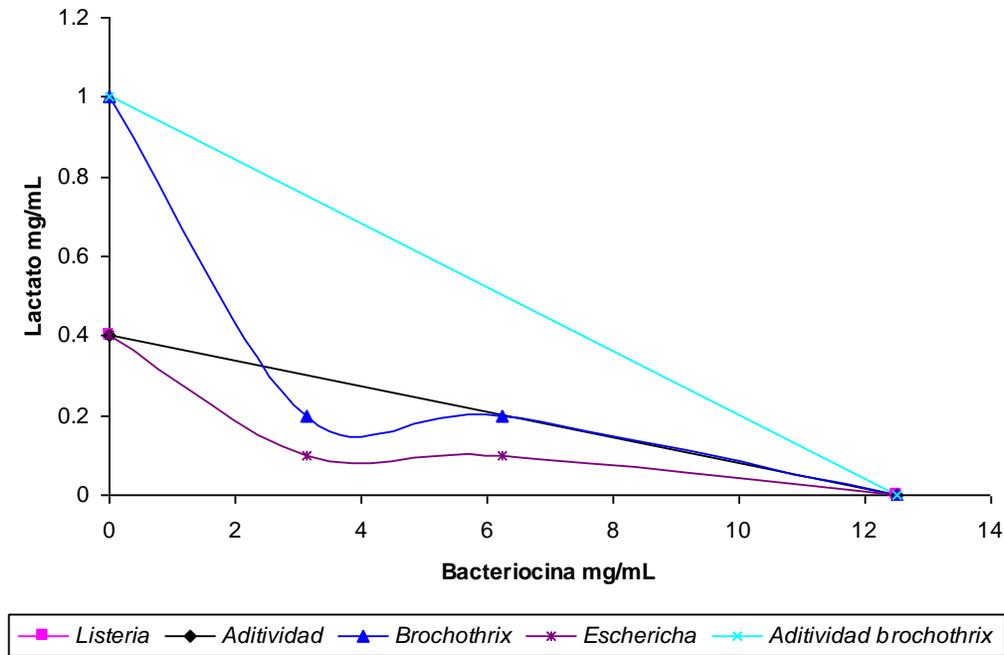
efecto bactericida para *B. thermosphacta* cuando se trabajó a una concentración de 10 mg/mL, a diferencia de *E.coli* y *L.innocua* que necesitaron una menor concentración para obtener el efecto deseado (0.4 mg/mL).

En la gráfica 3 se observa que el efecto de las combinaciones de lactato de sodio y bacteriocina es de tipo sinérgico contra *B.thermosphacta* y *E.coli*, mientras que para *L.innocua* demostraron un efecto aditivo en todas las concentraciones utilizadas. *B.thermosphacta* presenta una $CFI_I = 0.51$, encontrando dos combinaciones en las que se tiene un mayor efecto antimicrobiano (0.2 y 3.125 mg/mL; 0.2 y 6.250 mg/mL).

Por otra parte, para *E.coli* se obtuvo una $CFI_I = 0.62$, con dos combinaciones de efecto sinérgico en las concentraciones más bajas (0.1 y 3.125 mg/mL; 0.1 y 6.250 mg/mL). Un perfil que llama la atención es el presentado por *L.innocua*, ya que como se mencionó tiene un efecto aditivo, acorde al valor de la concentración fraccional inhibitoria que este presenta ($CFI_I = 1$), además como se aprecia en el isoblograma las combinaciones utilizadas para este microorganismo caen en la línea de aditividad.

Este efecto aditivo indica que la efectividad del antimicrobiano no se reduce ni mejora en la presencia de un segundo compuesto (López-Malo *et al.*, 2005), es decir que se puede utilizar el lactato de sodio o la bacteriocina de forma individual, ya que no hay una mejora en la actividad inhibitoria por la adición de la mezcla de estos compuestos sobre *L.innocua*, en las concentraciones del estudio. Tanto la bacteriocina como el lactato de sodio pueden inhibir el desarrollo de

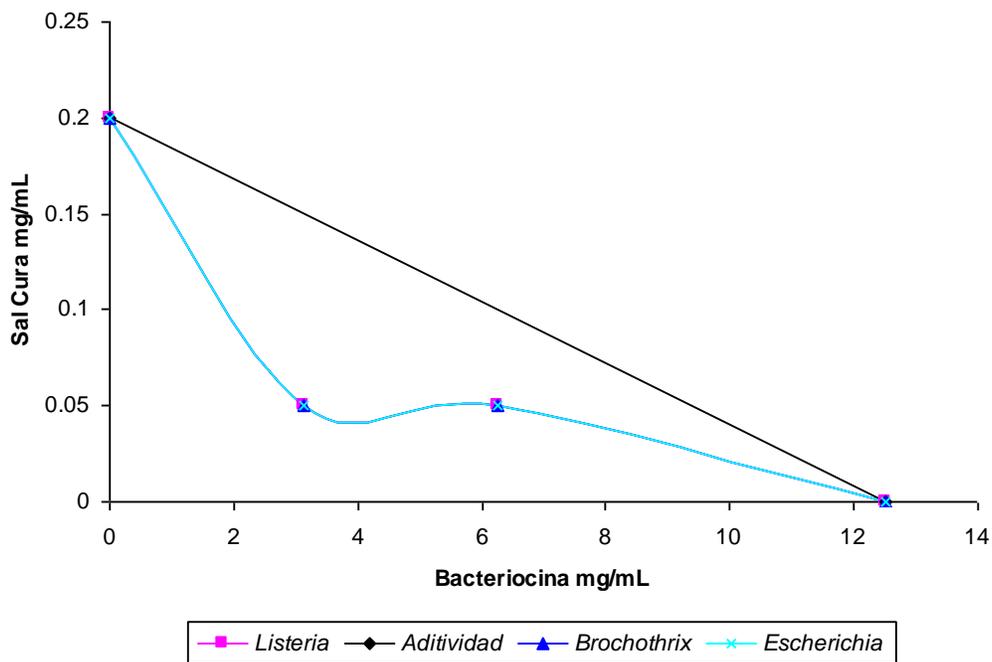
listeria, acorde con resultados preliminares (Álvarez-Cisneros *et al.*, 2010) y lo señalado por (Glass *et al.*, 2002) respectivamente.



Gráfica 3. Isoblograma de la combinación lactato de sodio – bacteriocina para *B. thermosphacta*, *E.coli* y *L.innocua* a_w 0.99 y pH 5.6

Éstos últimos autores han reportado que *Listeria sp.* puede ser inhibida por cualquier sal de lactato sin la necesidad de incorporar otro método de conservación. Los resultados obtenidos con este conservador pueden indicar que la bacteriocina favorece la actividad inhibitoria del lactato contra *B.thermosphacta* y *E.coli*, lo que puede proporcionar buenos resultados en alguna aplicación en productos cárnicos, ya que además de que ambos conservadores son naturales, se disminuye la sensación de consumir productos con un alto contenido de conservadores químicos. El nitrato de sodio presentó un efecto bactericida para las tres cepas en estudio (*B.thermosphacta*, *E. coli* y *L.innocua* cuando se utilizó la concentración más alta (0.2 mg/mL).

En la gráfica 4 se demuestra que la combinación de nitrito de sodio con la bacteriocina es de tipo sinérgico con una $CFI_I=0.62$, además el perfil de los tres microorganismos en estudio fue el mismo en presencia de los conservadores, encontrándose dos combinaciones en las que se tiene el efecto antimicrobiano (0.05 y 3.125 mg/mL; 0.05 y 6.250 mg/mL).



Gráfica 4. Isoblograma de la combinación sal cura – bacteriocina para *B. thermosphacta*, *E.coli* y *L.innocua* a_w 0.99 y pH 5.6

6.3 Modelo cárnico emulsionado.

Para la realización del modelo cárnico, se utilizaron solo las combinaciones más eficientes con respecto a la inhibición de los microorganismos en estudio. De los diferentes conservadores utilizados "in vitro" se estableció que el nitrito de sodio (0.05 mg/mL) y el lactato de sodio (0.2 mg/mL) presentaron un efecto sinérgico en combinación con la bacteriocina (3.125 y 6.25 mg/mL).

Además de los microorganismos utilizados se decidió solo trabajar con *Brochothrix thermosphacta*, debido a que los conservadores elegidos tienen actividad antimicrobiana contra este microorganismo deteriorante que se encuentra principalmente en embutidos.

6.3.1 Análisis microbiológico.

Las pruebas microbiológicas se seleccionaron de acuerdo al modelo propuesto, ya que las bacterias ácido lácticas se encuentran en abundancia en los productos cárnicos (embutidos); la cuenta estándar se realizó como indicador de buenas prácticas de manufactura, puesto que el modelo cárnico no se elaboró en condiciones asépticas; el medio selectivo (STAA) se utilizó para evaluar el posible efecto inhibitorio contra *Brochothrix thermosphacta* (microorganismo reto). En la tabla 9 se indica la nomenclatura de los tratamientos.

Tabla 9. Nomenclatura de los tratamientos.

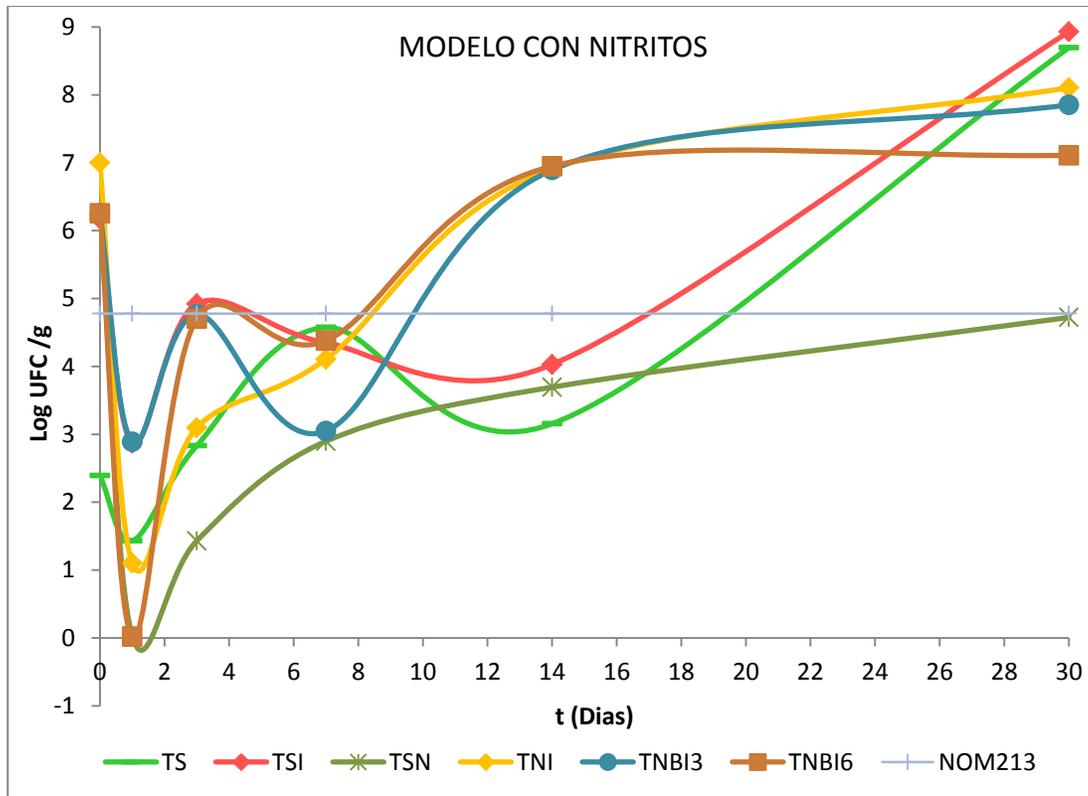
Tratamiento	Descripción
TS	SISASB
TSI	CISASB
TSN	SICNSB
TNI	CICNSB
TNBI3	CICNCB3
TNBI6	CICNCB6
TSL	SICLSB
TLI	CICLSB
TLBI3	CICLCB3
TLBI6	CICLCB6
TBI3	CISACB3
TBI6	CISACB6

SI= sin inóculo; CI= con inóculo (*B. thermosphacta*); SA= sin antimicrobiano; CN= con nitritos (0.05 mg/mL); CL= con lactato (0.2 mg/mL); SB= sin bacteriocina; CB3= con bacteriocina (3.125 mg/mL); CB6= con bacteriocina (6.25 mg/mL).

6.3.1.1 Cuenta estándar.

En las gráficas 5-7 observamos el crecimiento de microorganismos aerobios - anaerobios facultativos que de algún modo sobrevivieron los tratamientos inducidos sobre el modelo cárnico. Algunos de los microorganismos que se han encontrado en productos de tipo emulsionados son por ejemplo: *Lactobacillus*, *Brochothrix*, etc; de estos *Brochothrix thermosphacta* es el que más abunda en este tipo de productos (Zamudio, 2006).

La gráfica 5 muestra los controles que incluyen un tratamiento solo (TS), el cual no incluye antimicrobiano alguno y no fue inoculada, con lo cual se puede decir que la carga microbiana inicial se considera aceptable si se toma en cuenta el límite de la norma NOM-213-SSA1-2002 (NOM213) que establece un máximo de 60 000 UFC/mL equivalente a 4.778 logaritmos UFC/mL, suponiendo que el modelo se pueda considerar un producto cocido (NOM-213-SSA1-2002, 2002). Este mismo tratamiento presenta una curva bifásica de crecimiento (Schlegel, 1997) debido a las condiciones del entorno, ya que al estar en condiciones de anaerobiosis solo sobrevivieron los aerobios facultativos y algunos anaerobios estrictos que estuvieran latentes, con lo cual se explica el descenso del crecimiento al día 7 para después volver a crecer al día 14, lo que significa que entre el día 7 y el 14 los microorganismos se adaptan a las condiciones de vacío (Leistner y Gould, 2005) para crecer en las nuevas condiciones satisfactoriamente.



Gráfica 5. Variación de la población de aerobios en el modelo cárnico.

En esta misma gráfica hay un tratamiento solo que si fue inoculado (TSI), que se asemeja al tratamiento TS ya que tiene una curva de crecimiento similar, sin embargo este tratamiento supera la NOM 213 al tercer día pero también en ese punto comienza un descenso del crecimiento lo cual indica que las condiciones de anaerobiosis actúan como una barrera (Leistner y Gould, 2005) y este descenso continua hasta el día 14, que es cuando el crecimiento vuelve a aumentar, una vez que la barrera fue superada.

El hecho de que la cuenta de aerobios resulte alta puede ser causada por *B. thermosphacta* que es facultativo. El tratamiento solo al que se le adicionaron los nitritos y no fue inoculado (TSN) presenta una curva de crecimiento típica (mayoritaria en los microorganismos), lo cual puede deberse a que los nitritos inhibieron el crecimiento de los pocos

microorganismos presentes puesto que los nitritos al estar en medio ácido producen HNO_2 , que además es catalizado por la presencia de eritorbato y cloruro de sodio, esto da como resultado que los nitritos actúen liberando óxidos de nitrógeno que atacan grupos aminos del sistema deshidrogenasa de las células microbianas (Tompkin, 2005)) y por ello se observa una curva por debajo de la del tratamiento TS ya que posiblemente causó que algunos se adaptaran. TSN importante.

Otro tratamiento es el que tiene nitritos y si fue inoculado (TNI) que tiene un parecido en la curva de crecimiento con TS ya que también presenta una ligera meseta entre los días 3 y 7, lo cual puede atribuirse al vacío; hay que resaltar que en un principio logra disminuir la alta carga microbiana y explica que esta curva esté por encima de la de TSN.

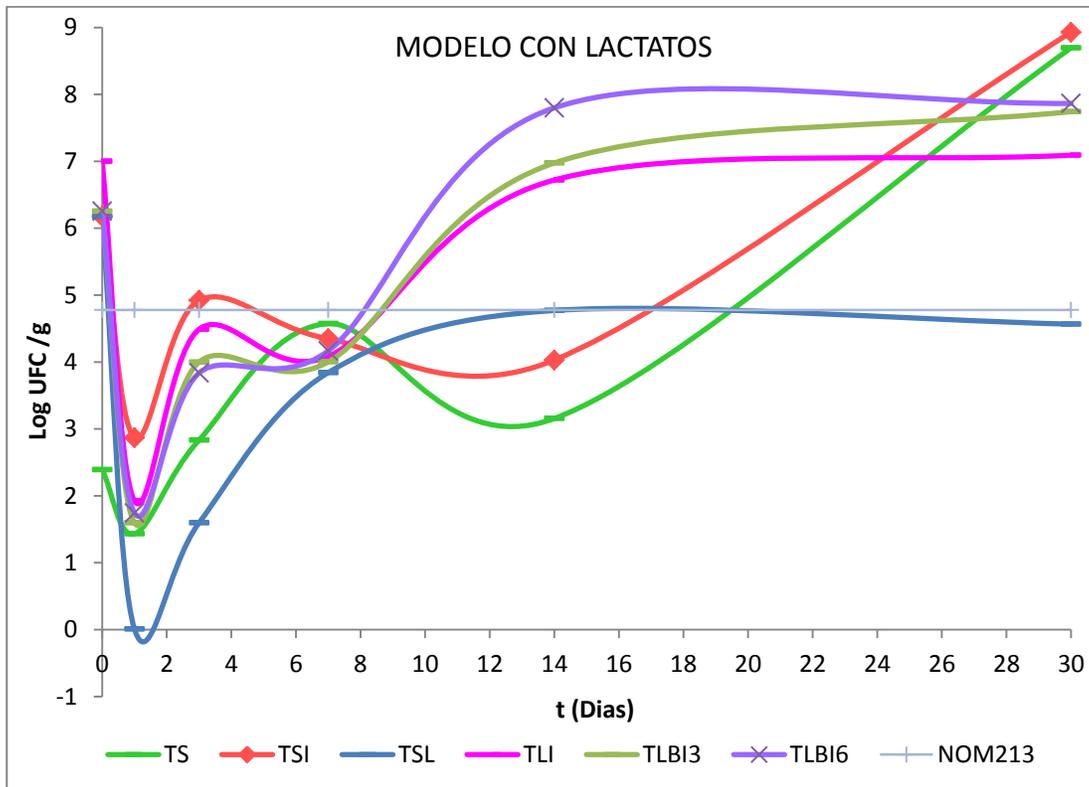
Aquí aparece el primer tratamiento que tiene una combinación de antimicrobianos, los nitritos y la bacteriocina [3.125 mg/mL] y que también fue inoculado (TNBI3), presentando un comportamiento similar a TS, con la diferencia de que se tiene una carga microbiana más alta y al día 3 ésta llega al límite permitido por la NOM213 si se considera un producto cocido, pero dentro de lo normal si se considera un producto curado; existe un descenso en la carga microbiana que hasta el día 7 fue causado por el vacío existente, aunque después se reanuda el crecimiento. El hecho de que la combinación sea menos eficiente que los antimicrobianos por separado puede deberse a la similitud que tienen en su forma de actuar y que al ser agregados a diferentes tiempos, el primero (nitritos) haya causado suficiente estrés en los microorganismos, que el segundo ya no pueda actuar, además hay que tomar en cuenta que *B.thermosphacta* es proteolítica (Stackerbrandt y Jones, 2006) y posiblemente degradara la bacteriocina. Importante.

La segunda combinación es el tratamiento con bacteriocina [6.25 mg/mL] y que también se inoculó (TNBI6), exhibe un crecimiento similar a TNBI3, pero a diferencia de este TNBI6 disminuye más la carga microbiana en un principio, para llegar al día 3 al límite de la NOM213 y luego disminuir la carga por la presencia del vacío y reanudar el crecimiento en el día 7.

La gráfica 6 incluye 3 tratamientos discutidos en la gráfica 5; por lo que restan 3 tratamientos por detallar como el que tiene lactato e inóculo (TLI) que al igual que otros presenta una curva de crecimiento parecida a TS y que considerando que tiene una carga microbiana más alta resulta eficiente comparada con TSI ya que inhibe algunos microorganismos. En la gráfica 6, el tratamiento solo sin inóculo fue adicionado con lactato (TSL) presentó una curva de crecimiento similar a la del tratamiento TSN ya que en este caso el lactato crea un descenso de pH principalmente en el citoplasma de las células y afecta su metabolismo (C. de Wit y Rombouts, 1990), inhibiendo de manera significativa la poca carga microbiana en comparación con TS, pero no tan eficientemente como en el tratamiento TSN puesto que el lactato solo tiene un mecanismo. Importante

El tratamiento de lactato con bacteriocina [3.125 mg/mL] e inóculo (TLBI3) se comporta como el TLI, con la diferencia de que ésta combinación inhibe más microorganismos en un inicio, posteriormente se presenta la meseta donde los microorganismos se adaptan a la anaerobiosis (entre los días 3 y 7) para continuar creciendo después de este lapso. Por último está la combinación de lactato con bacteriocina [6.25] e inóculo (TLBI6) que reacciona como TLBI3 pero con menos eficiencia que ésta y mayor que TLI, lo cual significa que el descenso de pH por parte de lactato favorece el crecimiento de bacterias lácticas, de

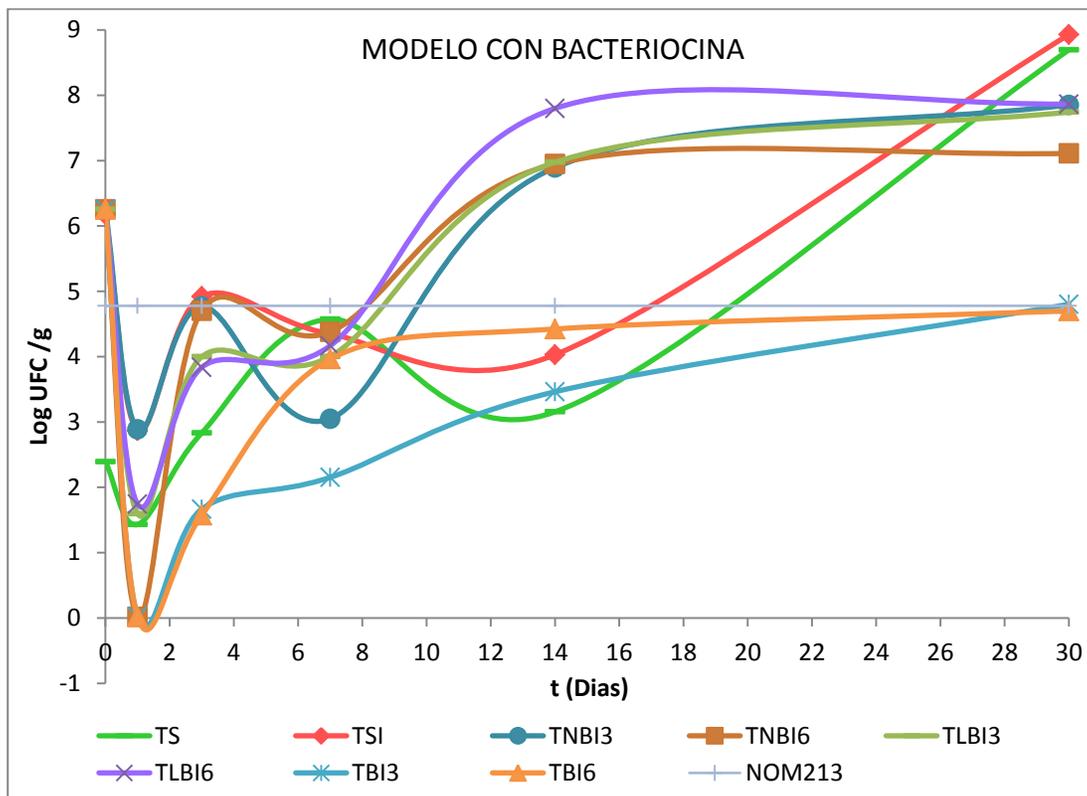
las cuales muchas son facultativas y por lo tanto hacen que las cuentas se eleven (Ballongue, 2004). Importante



Gráfica 6. Variación de la población de aerobios en el modelo cárnico.

La gráfica 7 presenta un tratamiento con bacteriocina a una concentración de 3.125 mg/mL y que fue inoculado (TBI3), este muestra una curva de crecimiento parecida con el tratamiento TS ya que se puede apreciar algo similar a una meseta entre los días 3 y 7, lo que indica una pequeña fase de adaptación ante la presencia de vacío, la bacteriocina en un principio inhibe el crecimiento de algunos de los pocos microorganismos presentes posiblemente mediante la destrucción de la membrana celular (Cotter *et al.*, 2005), hay que hacer constar que *B.thermosphacta* es proteolítica y pudiera degradar alguna cantidad de bacteriocina (Stackerbrandt y Jones, 2006). Importante

El ultimo tratamiento mostrado en la gráfica 7 corresponde al adicionado con bacteriocina con concentración 6.25 mg/mL y que también fue inoculado (TBI6), aquí se puede notar un crecimiento similar al de TSL, que en un principio parece ser menos eficiente que éste pero que después del día 7 aparentemente logra un efecto bacteriostático sobre los microorganismos. importante



Gráficas 7. Variación de la población de aerobios en el modelo cárnico.

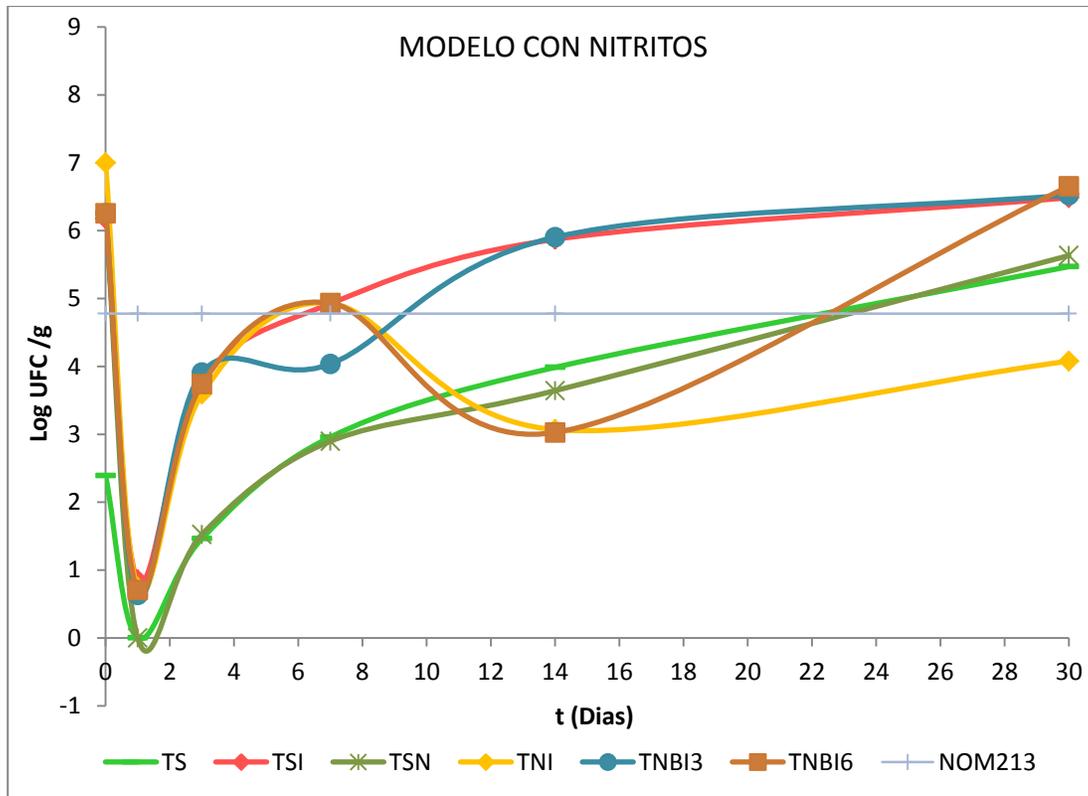
Con todo lo anterior podemos indicar con base únicamente en la comparación del tratamiento con antimicrobiano y sus combinaciones e inoculado contra el TSI, quien causa el mejor efecto deseado (bactericida y/o bacteriostático), además de considera que el modelo entra dentro de los productos cocidos lo que hace que los mejores sean: TBI3, TBI6 y TNBI3 (En orden decreciente).

6.3.1.2 Bacterias ácido lácticas.

Puesto que solo con el hecho de realizar una prueba no es posible explicar gran parte de la eficiencia o ineficiencia de los antimicrobianos o sus combinaciones en un sistema cárnico se hizo un muestreo para BAL; como se mencionó antes estos microorganismos se encuentran en este tipo de productos, en general la biota es un reflejo de la matanza y entornos de procesamiento, debido a su omnipresencia en el ambiente de la procesadora de carne (Jay, 2000).

La gráfica 8, presenta 6 tratamientos del crecimiento de BAL, para el caso de TS presenta una curva de crecimiento típica o de una fase y que puede ser considerada como aceptable ya que la pendiente poco pronunciada permite que el tratamiento sea estable microbiológicamente hasta el día 20, ya que hasta ese punto no se ha rebasado el límite de la NOM213 de cuenta estándar, el cual hay que resaltar incluye las BAL presentes en el producto muestreado.

Al comparar este tratamiento con su homólogo de la cuenta estándar (gráfica 5) se nota claramente que la cantidad de BAL viables es menor que las células viables de la cuenta estándar, que si bien no sucede siempre así durante todo el periodo de evaluación, como en el día 14 en donde las BAL > Cuenta estándar, es un buen indicativo del tiempo que dura el sistema modelo el cual es de aproximadamente 18 días y en base a esto podemos comparar todos los demás tratamientos y decidir en cuál de ellos hay un mejor efecto deseado.



Gráfica 8. Variación de la población de BAL en el modelo cárnico.

El tratamiento TSI muestra una curva de crecimiento similar a la del TS, con la diferencia de que al tener una carga microbiana mayor, rápidamente se alcanzan los límites de la NOM213 (6 días), que al compararlo con su igual en cuenta estándar (gráfica 5) se observa una tendencia parecida, sin embargo aquí no hay una curva bifásica lo cual confirma que solo las bacterias aerobias facultativas logran pasar la barrera que representa el empaque al vacío.

Cuando vemos el tratamiento TSN en la gráfica 8, puede notarse que sigue una tendencia similar a la de TS, pero podemos ver que no es muy eficaz contra las BAL presentes en el modelo cárnico, puesto que va muy de cerca con la curva de crecimiento de TS lo que significa que no hay un efecto bactericida considerable sobre las BAL.

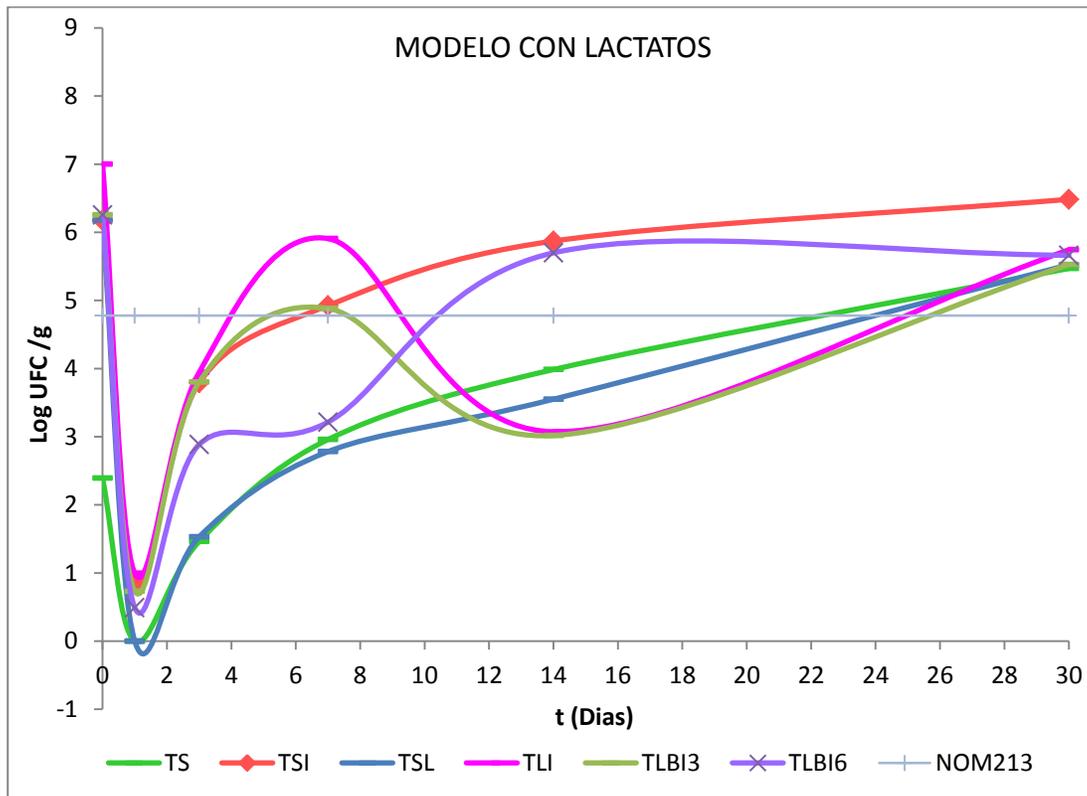
Continuando con la gráfica 8, el tratamiento TNI en un principio no resulta adecuado contra las BAL, ya que estas bacterias los primeros 7 días alcanzan la población límite; después del día 7 comienza una inhibición del crecimiento de BAL por parte de los nitritos presentes en el tratamiento.

El tratamiento combinado TNBI3 sigue las tendencias de TNI lo cual muestra un efecto bacteriostático hacia las BAL por parte de la bacteriocina, sin embargo no es muy prologando, por lo que las BAL siguen creciendo. El tratamiento TNBI6 indica tendencias muy similares a TNI, mostrando así una inhibición de las BAL por parte de la bacteriocina que está en mayor concentración que en TNBI3, aunque esto no dura mucho, ya que a partir del día 14 las BAL vuelven a crecer.

Continuando con la gráfica 9 podemos notar que el tratamiento TLI presenta una curva de crecimiento similar a TNBI6 aunque en un principio no se ve algún efecto contra las BAL, al llegar al día 7 empieza un periodo de inhibición no obstante, al llegar el día 14 se reanuda el crecimiento de las BAL.

El TLBI3 muestra la misma tendencia que TLI pero es más eficiente que ésta, ya que llega a una concentración de bacterias menor antes de que haya un efecto de inhibición de las BAL, lo cual puede ser causado por la bacteriocina presente en este tratamiento. Mientras que el TLBI6 exhibe una curva de crecimiento bifásica en la que al llegar el día 3 empieza a mostrar un efecto bacteriostático contra las BAL, lo cual permite lograr que el modelo sea estable por más tiempo.

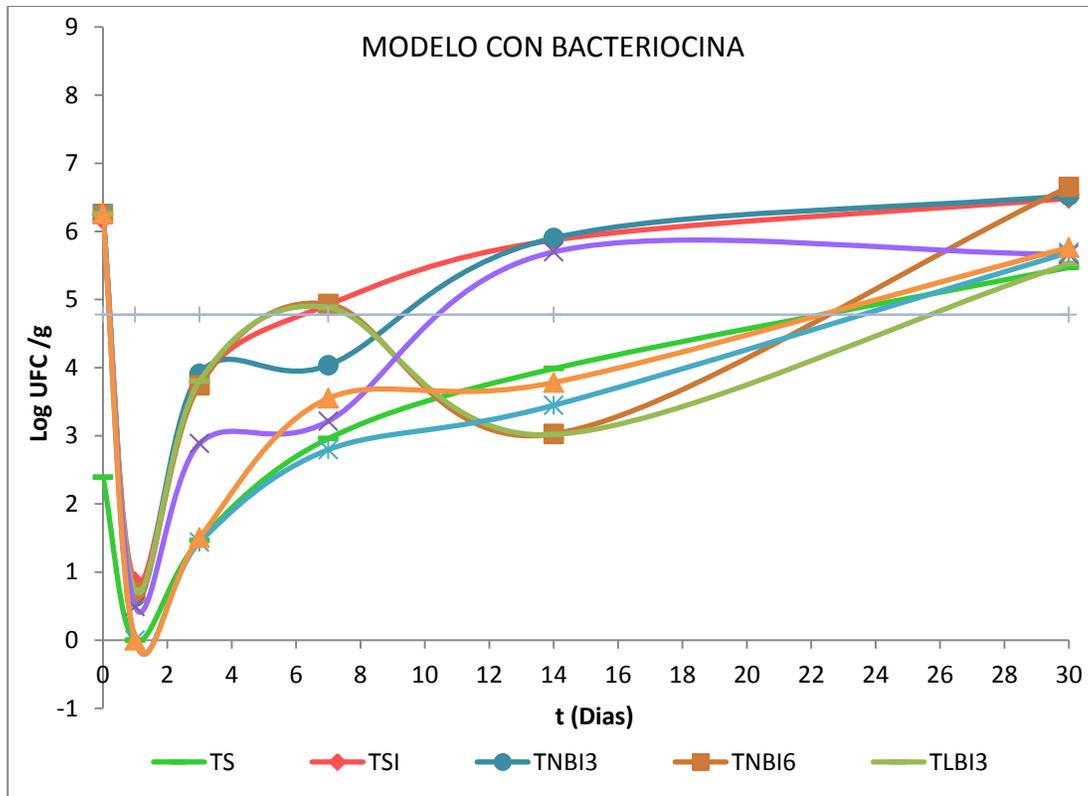
El tratamiento TSL presenta la misma tendencia de TSN con respecto a TS más sin embargo es ligeramente más efectivo contra las BAL que TSN.



Gráfica 9. Variación de la población de BAL en el modelo cárnico.

En la gráfica 10, se observa que el tratamiento TBI3 es aún más efectivo contra las BAL que TSN y TSL; por último el TBI6 muestra una curva bifásica lo cual puede significar que las BAL se adaptan a la presencia de la bacteriocina y durante este periodo la cantidad de microorganismos no aumenta, lo cual prologa el tiempo que durará (estable) el modelo cárnico.

Siguiendo los criterios del punto anterior seleccionamos los conservadores que exhiben el mejor efecto deseado y que son: TBI3, TBI6 y TLBI6 (En orden decreciente).



Gráfica 10. Variación de la población de BAL en el modelo cárnico con la bacteriocina.

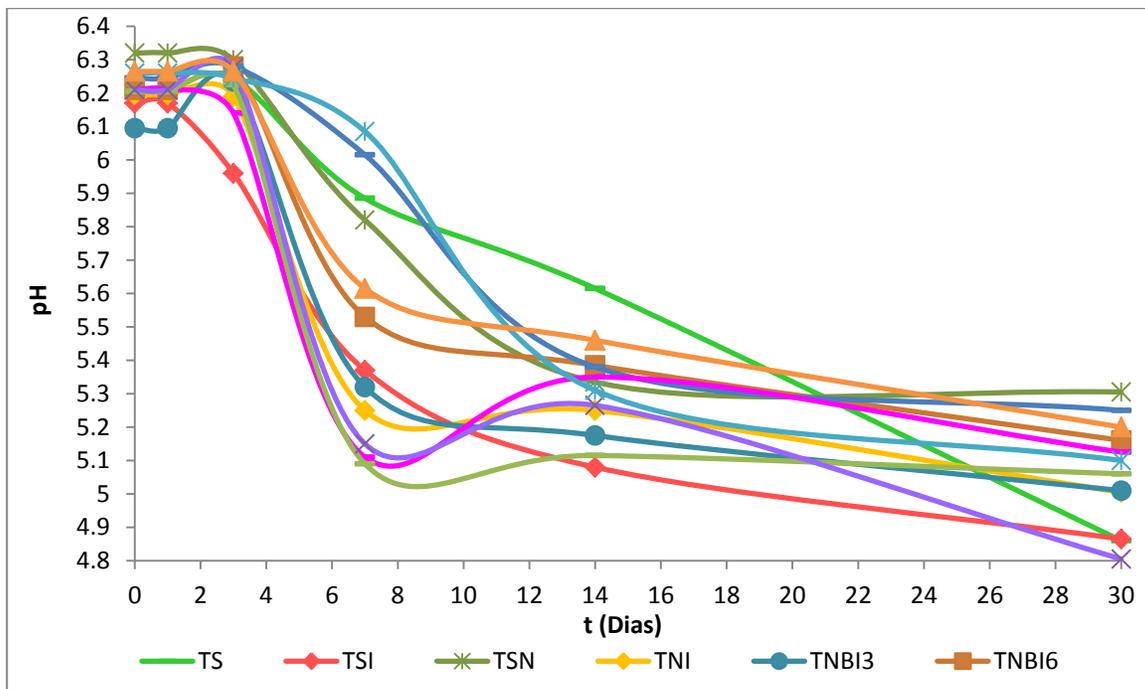
6.3.1.3 Medición de pH.

Las BAL son organismos fermentativos que causan un descenso en el pH del medio en que crecen, esto se debe principalmente a que las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico como metabolito a partir de los azúcares presentes en el sustrato, dependiendo si son homofermentativas o heterofermentativas utilizan rutas como la glucólisis; el ácido láctico producido y dependiendo la cantidad que se produzca, causa la disminución del pH en el producto (Weimer, 2011; Axelsson, 2004).

Como se observa en la gráfica 11, todos los tratamientos demuestran un descenso después de 6 días de almacenamiento; esto se puede deber a la presencia de BAL, la que es mayor en TSI, causando

un descenso rápido del pH. El tratamiento TS exhibe un descenso de pH de manera lineal lo cual se puede deber principalmente a la baja concentración de BAL (como se ve en la gráfica 8); en TSL, TLI, TLBI3 y TLBI6, el descenso se ve favorecido por la presencia de lactato de sodio. Los tratamientos TSN, TBI3 y TBI6 exhiben un descenso de pH de manera lenta ya que la cantidad de BAL presentes en el medio es aún menor que en los tratamientos anteriormente mencionados.

Finalmente TNI, TNBI3 y TNBI6 tienen un descenso de pH rápido debido a que tienen la mayor carga de BAL. Los mejores tratamientos de interés para ser aplicados en un modelo cárnico son aquellos que tengan un pH cercano a 5.5 o menor, ya que a estos valores de pH se logra una buena efectividad de los nitritos, así como un adecuado desarrollo de color (Coreti, 1986). De todos los tratamientos analizados, solo 5 cumplieron con la condición de pH (TBI6, TNBI6, TNBI3, TNI y TLI).



Gráfica 11. Variación del pH de los diferentes tratamientos del modelo cárnico.

6.3.1.4 *Brochothrix thermosphacta*.

Esta bacteria es de interés comercial o industrial, porque causa aromas y sabores desagradables en los productos empacados al vacío y almacenados a temperaturas de refrigeración, lo que ocasiona un rechazo por parte del consumidor.

La cuenta de esta bacteria se realizó en agar STAA (anexo B) y las cajas se incubaron por 48 horas a una temperatura de 22° C en condiciones aerobias, puesto que este medio es selectivo para *Brochothrix thermosphacta*. En las gráficas 12 – 14 se observan los resultados obtenidos de la cuenta de *Brochothrix thermosphacta* presente en la emulsión cárnica.

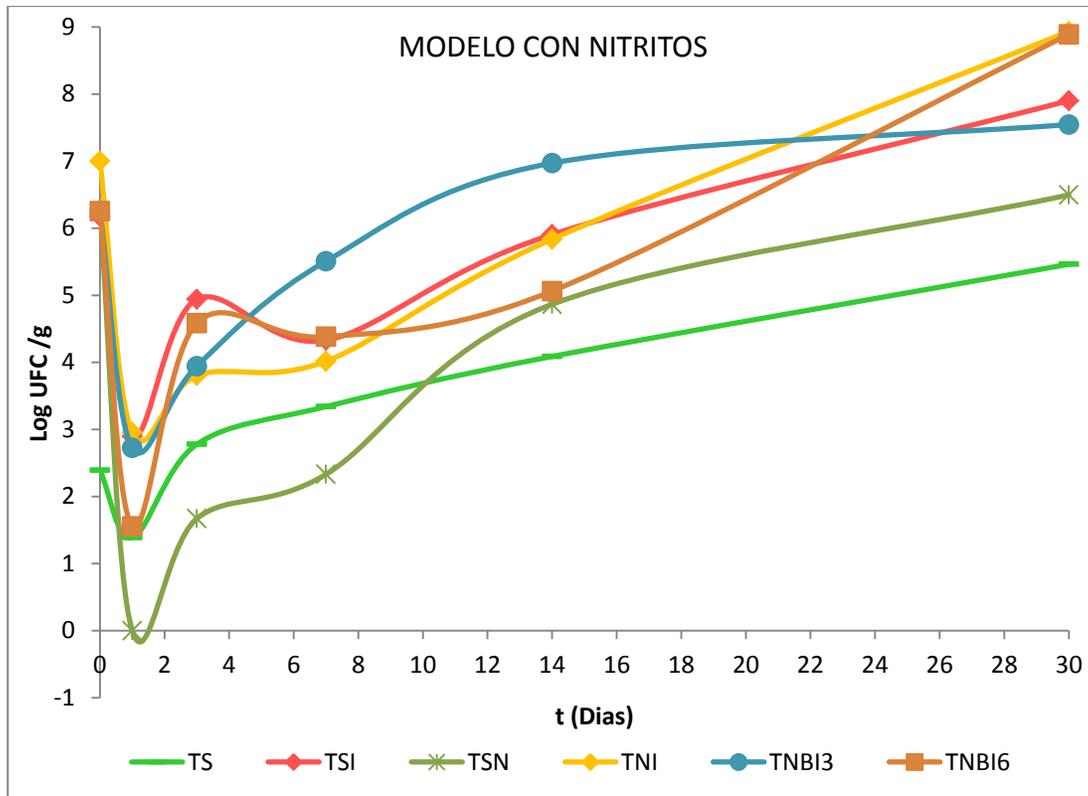
La gráfica 12, presenta 6 tratamientos del crecimiento de *B. thermosphacta*, para el caso de TS muestra una curva de crecimiento de una fase y que puede ser considerada como aceptable ya que la pendiente poco pronunciada permite que el tratamiento sea estable microbiológicamente, se recomienda que la concentración de esta bacteria no supere los 5 log UFC/mL porque después de este punto los aromas y sabores que imparte *B. thermosphacta* en la carne resultan perceptibles para el consumidor (Holley, 1999).

Hay que resaltar que este tratamiento fácilmente dura hasta el día 24, antes de pasar el límite recomendado. El tratamiento TSI muestra una curva de crecimiento del tipo bifásica, que al tener una carga microbiana mayor, rápidamente se alcanzan los límites sugeridos (3 días), que sin embargo no los rebasa ya que hay un lapso de adaptación que es causada por condiciones anaeróbicas.

Cuando vemos el tratamiento TSN en la gráfica 12, puede notarse que sigue una tendencia similar a la de TSI, pero podemos ver que es muy eficaz contra *B. thermosphacta* que a pesar de que no se inoculó intencionalmente, la bibliografía indica que está presente en la mayoría de los entornos y que en las plantas procesadoras de carne, habita en los utensilios y ésta contaminación se da principalmente después del proceso térmico y antes del envasado al vacío (Stackerbrandt y Jones, 2006).

El tratamiento TNI resulta efectivo contra *B. thermosphacta* ya que al compararlo con TSI se ve una reducción importante en la población de *B. thermosphacta* y mantiene el modelo cárnico por debajo de los límites sugeridos hasta el día 10. El tratamiento combinado TNBI3 no sigue las tendencias de TNI lo que ocasiona que no haya un control efectivo contra *B. thermosphacta* y rápidamente supera los 5 log UFC/mL.

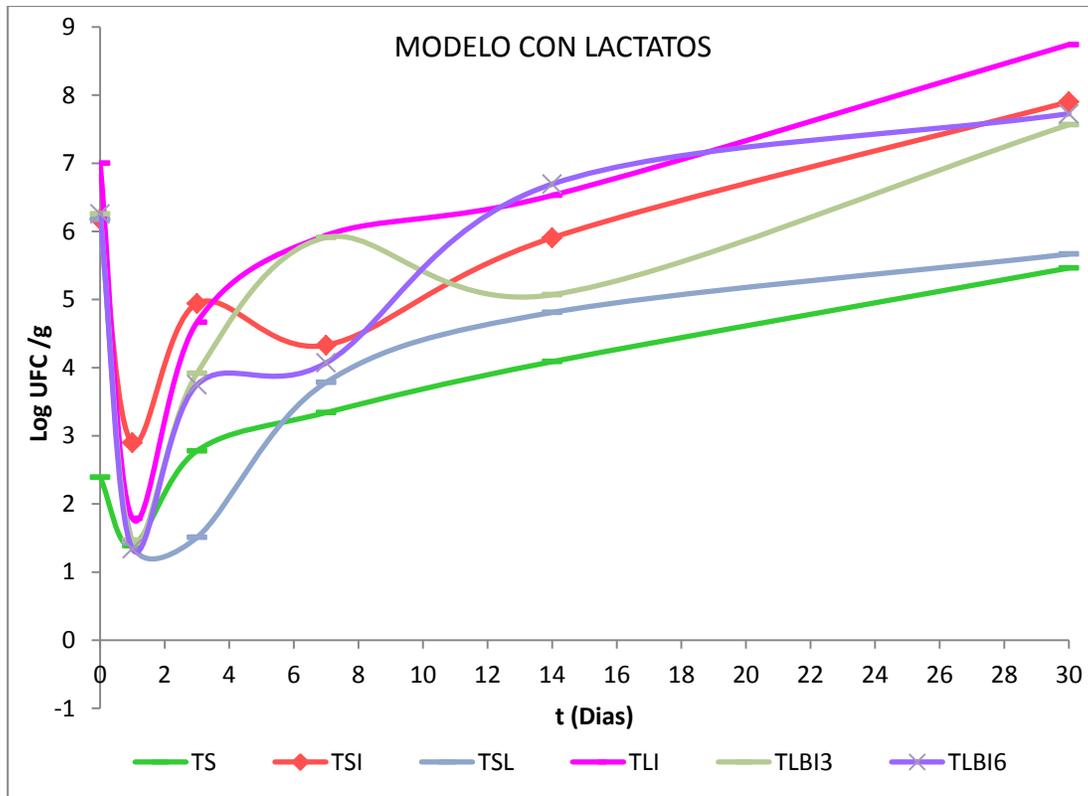
El tratamiento TNBI6 presenta tendencias muy similares a TNI, mostrando así una inhibición de *B. thermosphacta*, mayor que la causada por TNBI3 y TNI con lo que logra mantener la muestra hasta el día 14.



Gráfica 12. Variación de la población de *Brochothrix thermosphacta* en el modelo cárnico con la bacteriocina.

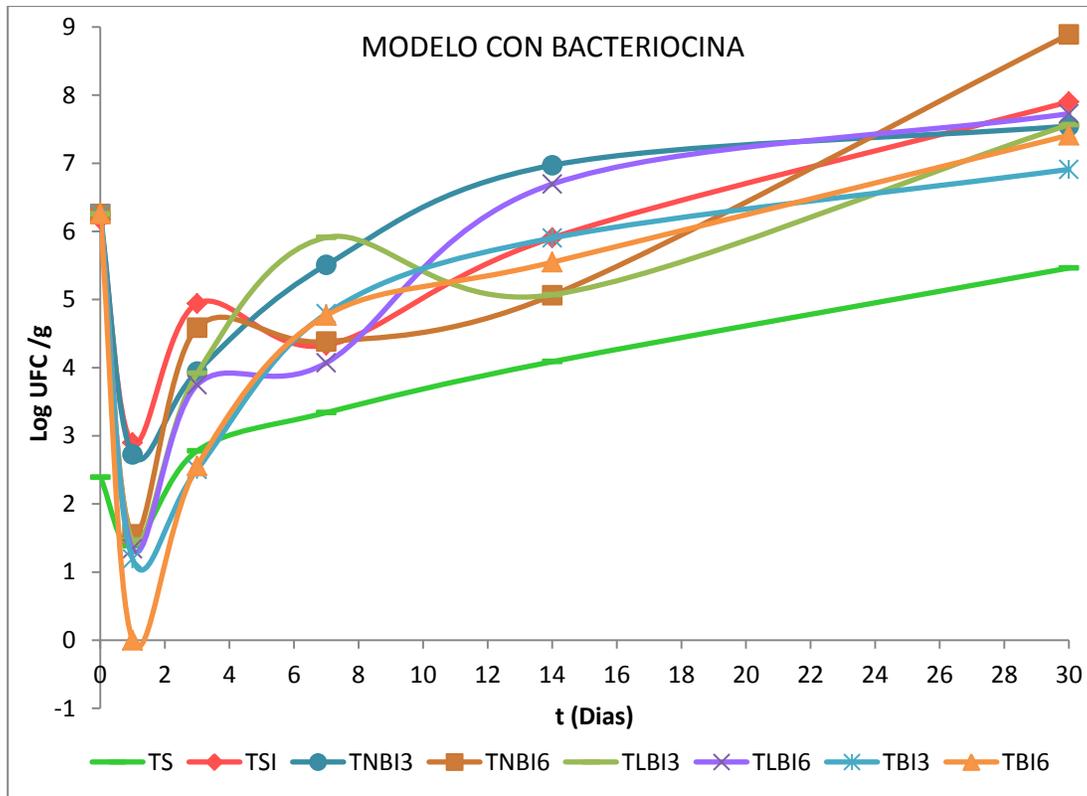
Continuando con la gráfica 13 podemos notar que el tratamiento TSL muestra la misma tendencia de TSN con respecto a TS sin embargo es ligeramente menos efectivo que TSN. Mientras que el tratamiento TLI no presenta algún efecto contra *B. thermosphacta*, y logra llegar al día 3.

El TLBI3 muestra una tendencia como TSI pero es menos eficiente que los demás tratamientos ya que al día 5 ya pasó el límite sugerido. Mientras que el TLBI6 exhibe una curva muy grande en la cual al llegar el día 4 pasa el límite y es el menos eficiente de todos.



Gráfica 13. Variación de la población de *Brochothrix thermosphacta* en el modelo cárnico con la bacteriocina.

En la gráfica 14 se observa que el tratamiento TBI3 es más efectivo contra *B. thermosphacta* respecto a TSI, puesto que logra un control muy bueno hasta el día 7; por último el TBI6 muestra una curva típica y tiene una efectividad prácticamente igual que TBI3.



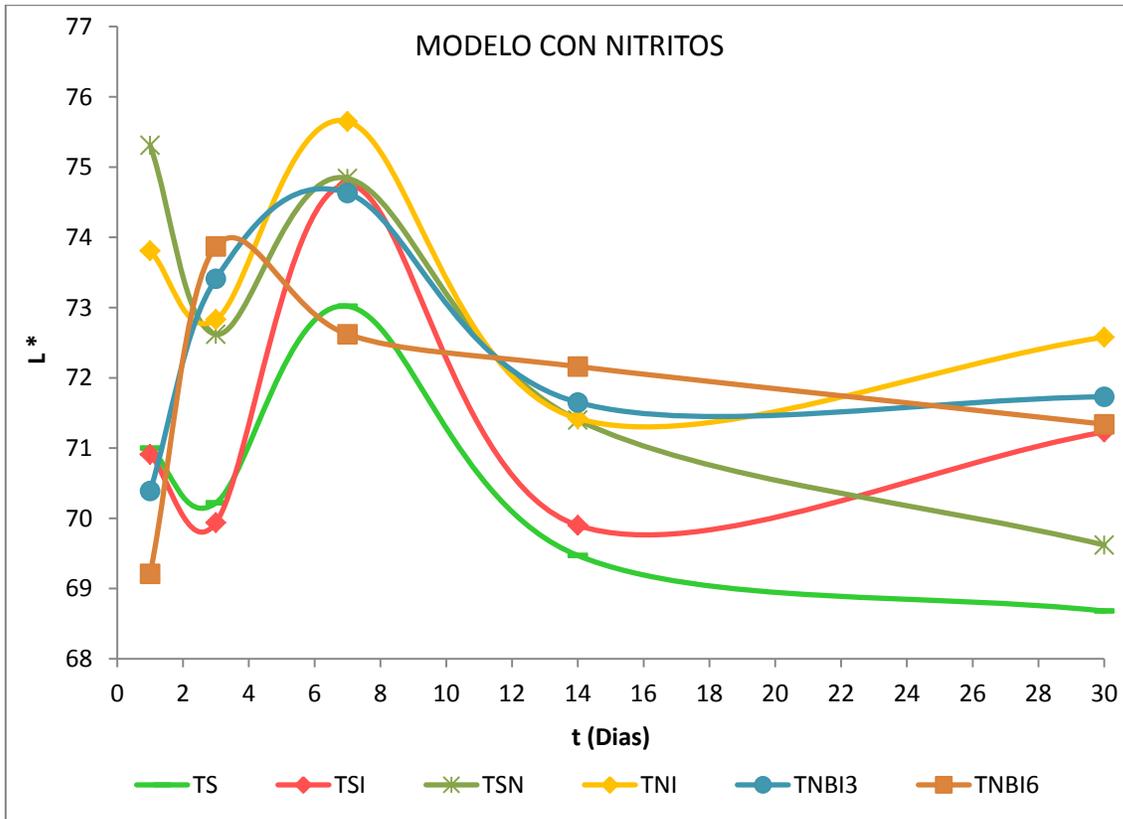
Gráfica 14. Variación de la población de *Brochothrix thermosphacta* en el modelo cárnico con la bacteriocina.

Siguiendo los criterios de este punto seleccionamos los conservadores que exhiben el mejor efecto, los cuales son: TSL, TSI, TNBI6 y TNI (En orden decreciente).

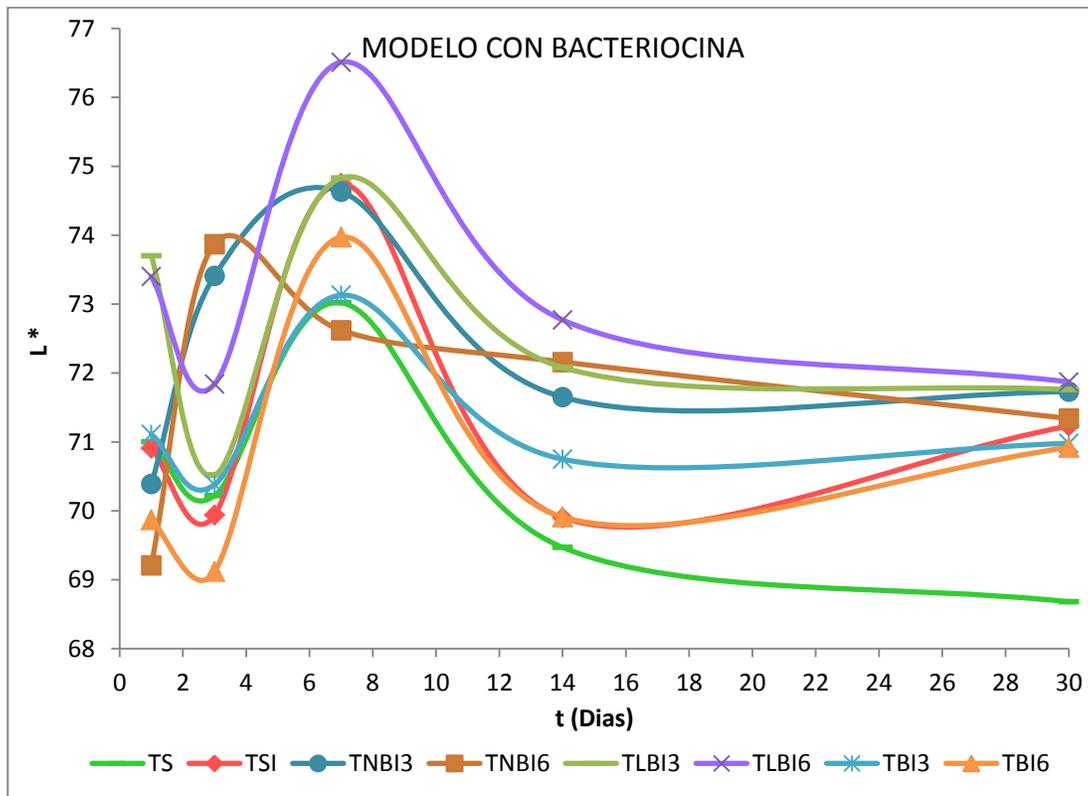
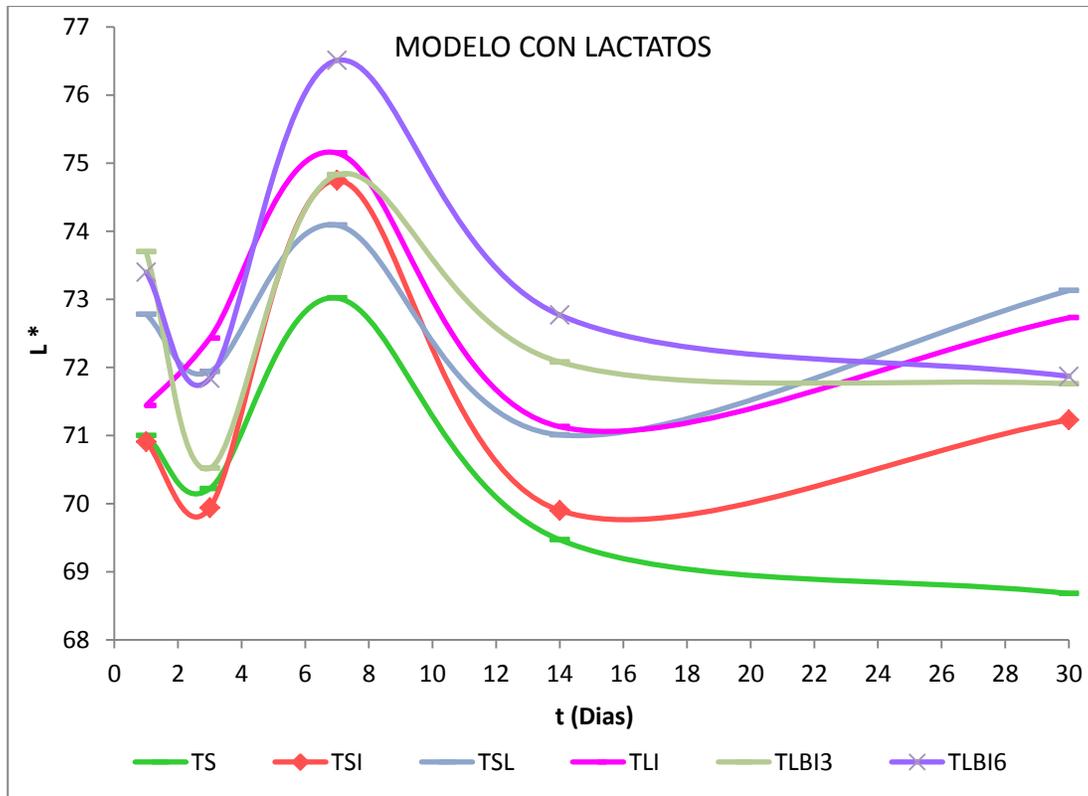
6.3.2 Medición de color.

La prueba de color se realizó para determinar si la bacteriocina, al estar en forma de recubrimiento, producía alguna variación de color en el modelo cárnico empleado. Las gráficas 15 – 17, muestran la variación de luminosidad (L*) que presentan todos los tratamientos, se han colocado agrupados en 3 gráficas diferentes para poder compararlos fácilmente.

La gráfica 15 contiene los tratamientos control como TS, TSI, TSN, TSL, TBI3 y TBI6 que tienen un comportamiento similar en la variación de la luminosidad, a través del tiempo. Esto sucede también con TNI, TNBI3, TNBI6, TLI, TLBI3, TLBI6 en las demás gráficas (16-17), aunque estadísticamente hay diferencias significativas (anexo D).



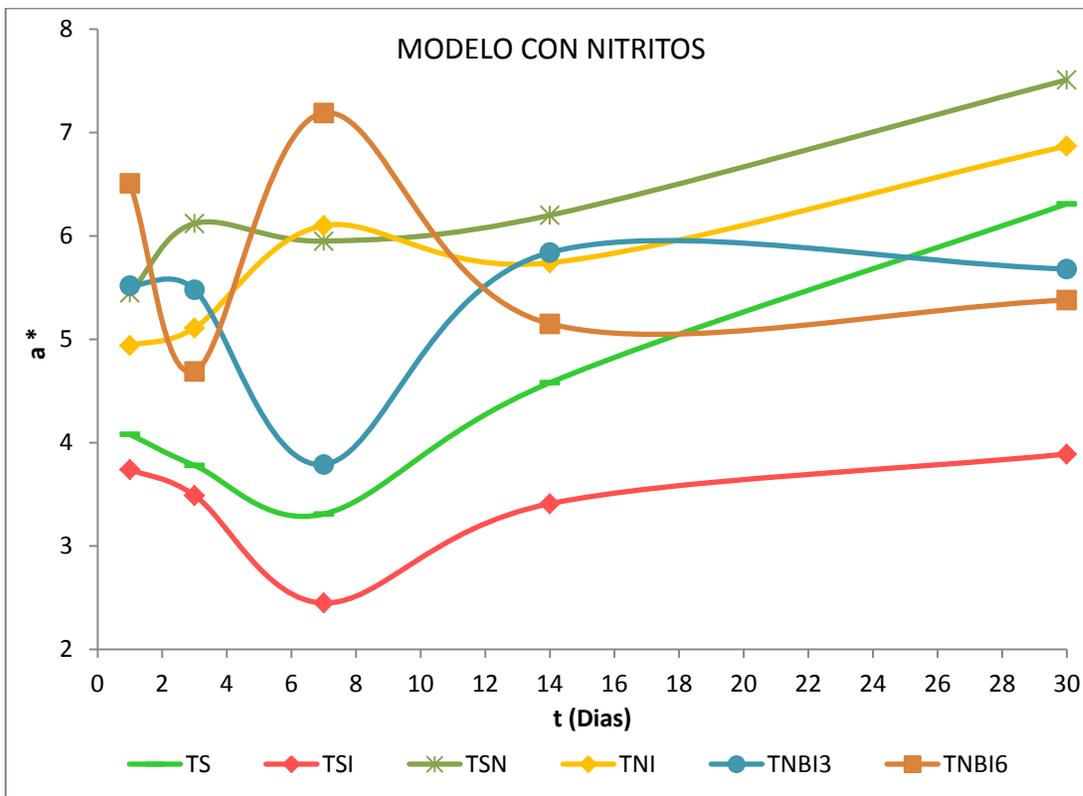
Gráfica 15. Variación de Luminosidad (L*) del modelo cárnico con diferentes antimicrobianos.



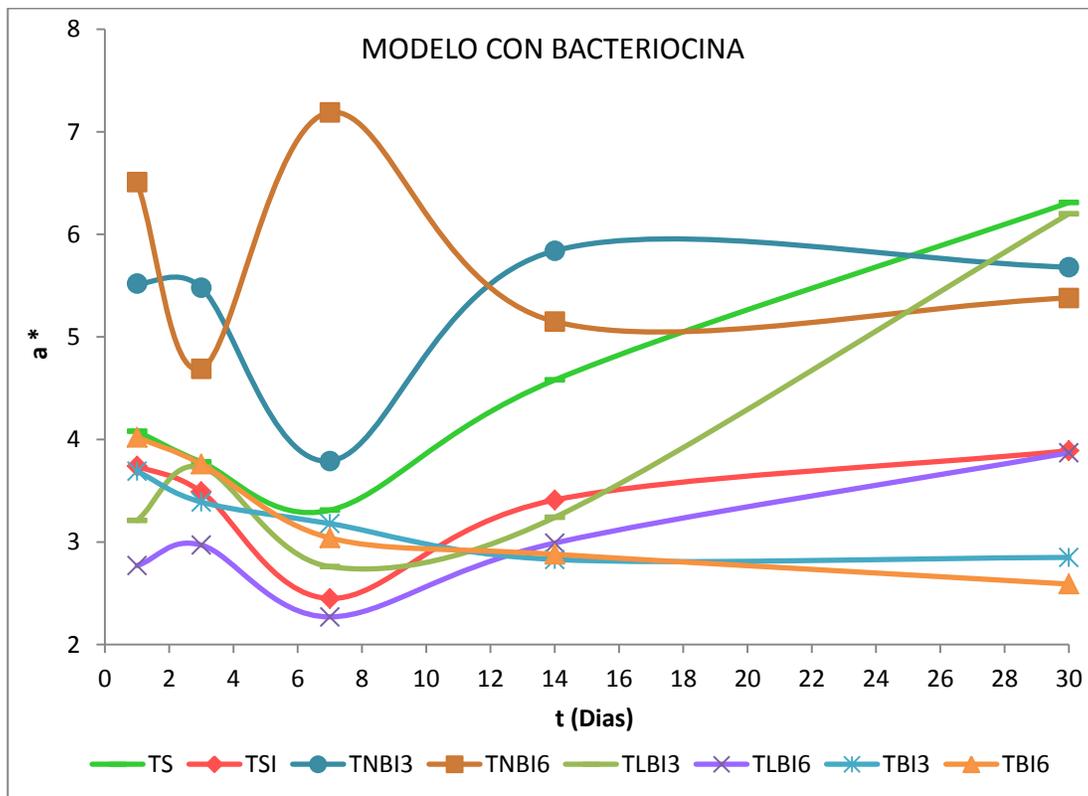
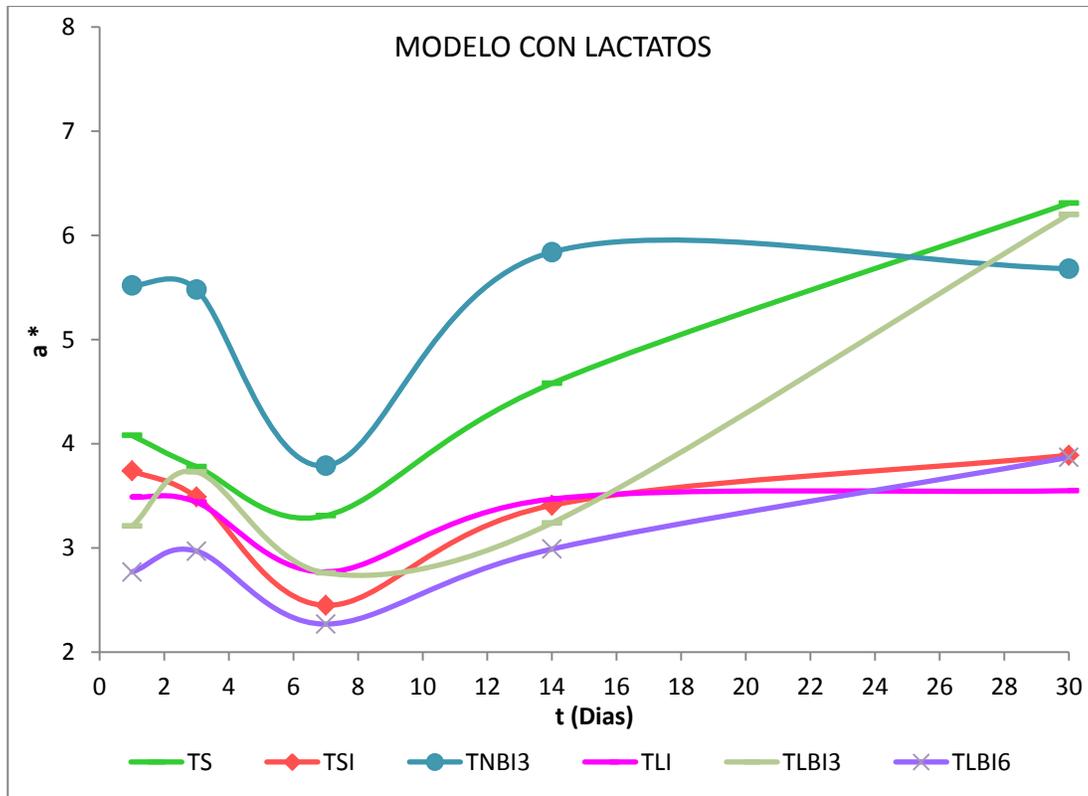
Gráficas 16 y 17. Variación de Luminosidad (L*) del modelo cárnico con diferentes antimicrobianos.

Aunque no hay diferencia significativa para cada tratamiento ($p > 0.05$) a través del tiempo, lo que significa que el tiempo no es un factor que afecte en el cambio de luminosidad, si hay una diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$), por lo que dichos tratamientos si afectan en la luminosidad.

Las gráficas 18 – 20, muestran la variación del índice de rojo (a^*) que presentan los tratamientos, se han agrupado en 3 gráficas diferentes para poder compararlos fácilmente. La gráfica 18 contiene los tratamientos control como TS, TSI, TSN, TSL, TBI3 y TBI6 que tienen un comportamiento diferente a través del tiempo. Esto sucede también con TNI, TNBI3, TNBI6, TLI, TLBI3, TLBI6 en las demás gráficas (19-20), lo que indica que algunas son estadísticamente diferentes (anexo D).



Gráfica 18. Variación de índice de rojo (a^*) del modelo cárnico con diferentes antimicrobianos.

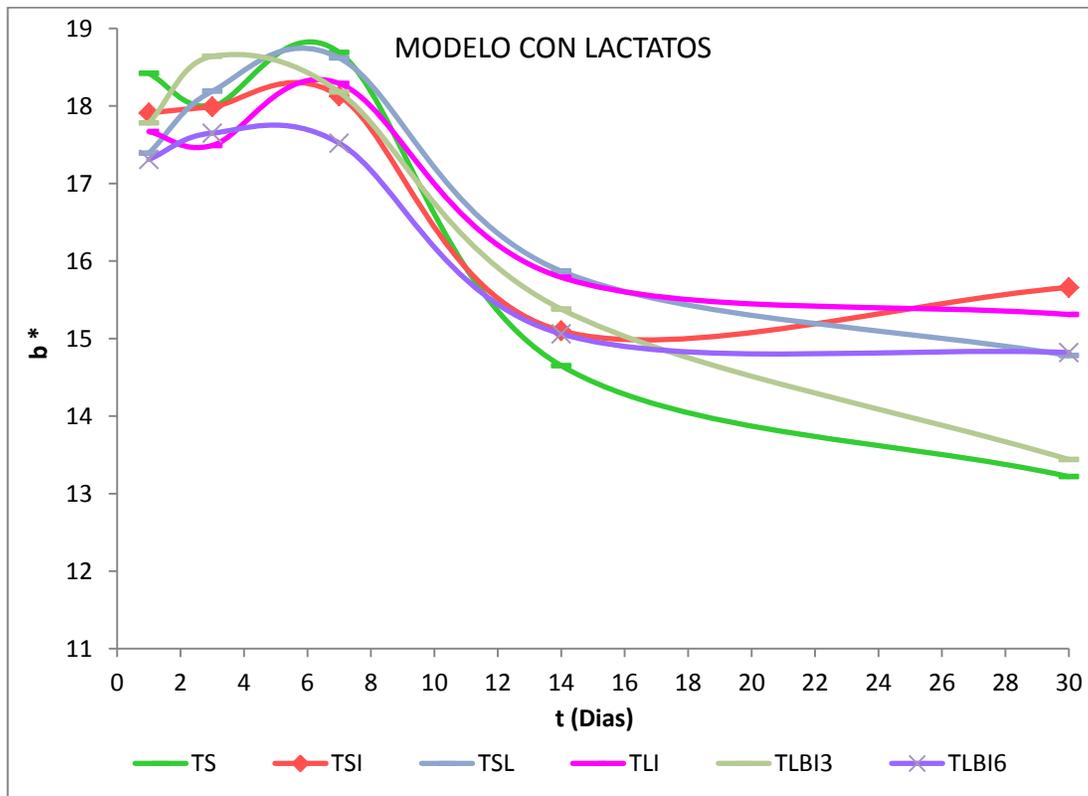
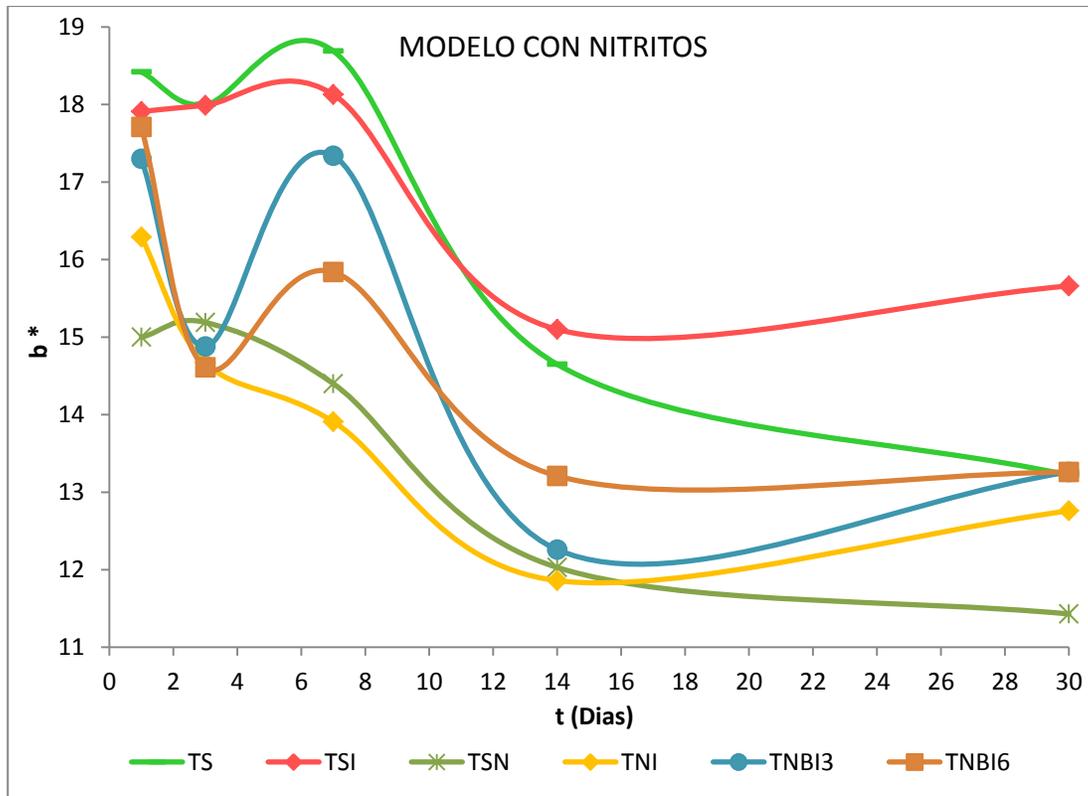


Gráficas 19 y 20. Variación de índice de rojo (a^*) del modelo cárnico con diferentes antimicrobianos.

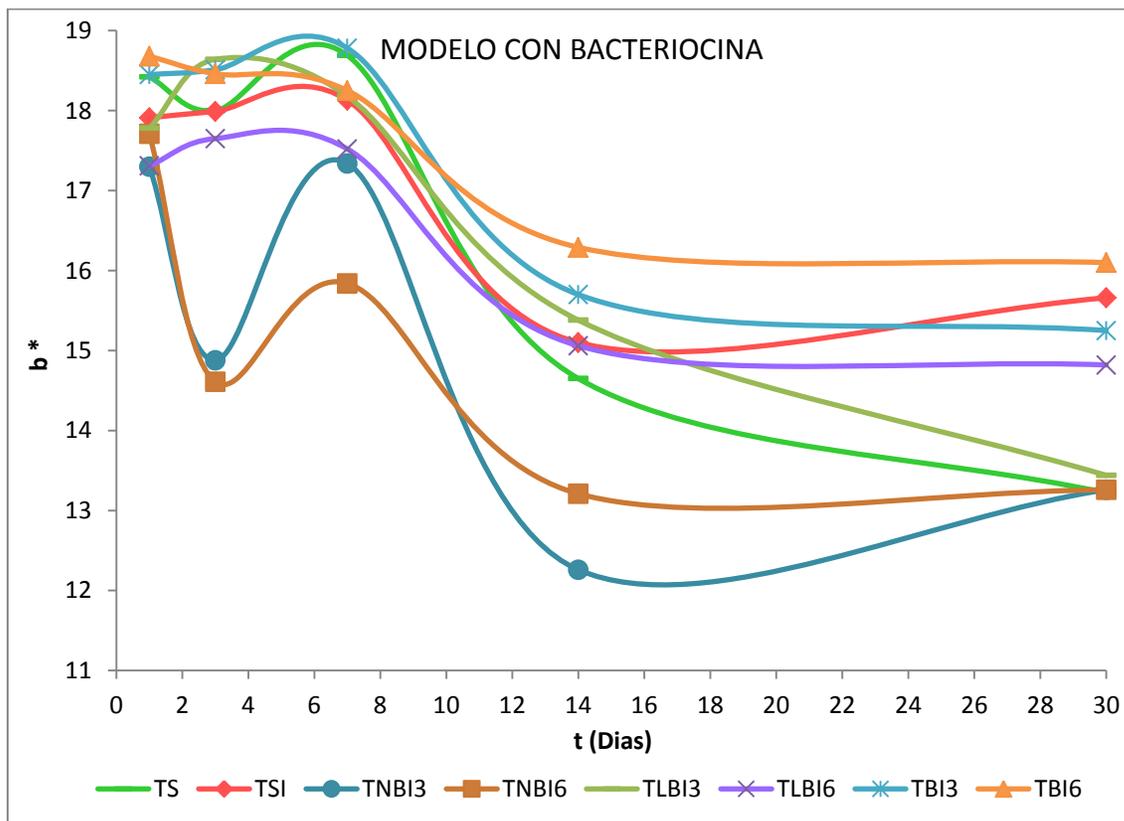
Aquí tampoco hay diferencia significativa para cada tratamiento ($p > 0.05$) a través del tiempo, lo que significa que el tiempo no es un factor que influya en la variación del índice de rojo, pero si hay una diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$), por lo que dichos tratamientos si afectan en el índice de rojo o dicho de otra manera los tratamientos repercuten en la coloración el modelo cárnico. Con lo que aquellas muestras que contienen nitritos son estadísticamente más rojas que las que no lo contienen, por otra parte la bacteriocina no influye tanto en el aumento en el color rojo ya que estadísticamente es la segunda que más afecta, estando en primer lugar los nitritos (anexo D).

Las gráficas 21 – 23, muestran la variación del índice de amarillo (b^*) que presentan todos los tratamientos, se han colocado agrupados en 4 gráficas diferentes para poder compararlos fácilmente. La gráfica 26 contiene los tratamientos control como TS, TSI, TSN, TSL, TBI3 y TBI6 que tienen un comportamiento similar a través del tiempo. Esto sucede también con TNI, TLI, TLBI3 y TLBI6 en las demás gráficas y TNBI3I con TNBI6 no tienen esta tendencia que indica que algunas son estadísticamente diferentes (anexo D).

Las muestras tampoco tienen diferencia significativa para cada tratamiento ($p > 0.05$) a través del tiempo, lo que significa que el tiempo no es un factor que afecte en la variación del índice de amarillo, sin embargo si hay una diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$), por lo que dichos tratamientos si afectan en el índice de amarillo o dicho de otra manera los tratamientos influyen en la coloración del modelo cárnico. Por lo que aquellas muestras que contienen nitritos y no tienen bacteriocina son estadísticamente menos amarillas que las demás (anexo D).



Gráficas 21 y 22. Variación de índice de amarillo (b^*) del modelo cárnico con diferentes antimicrobianos.

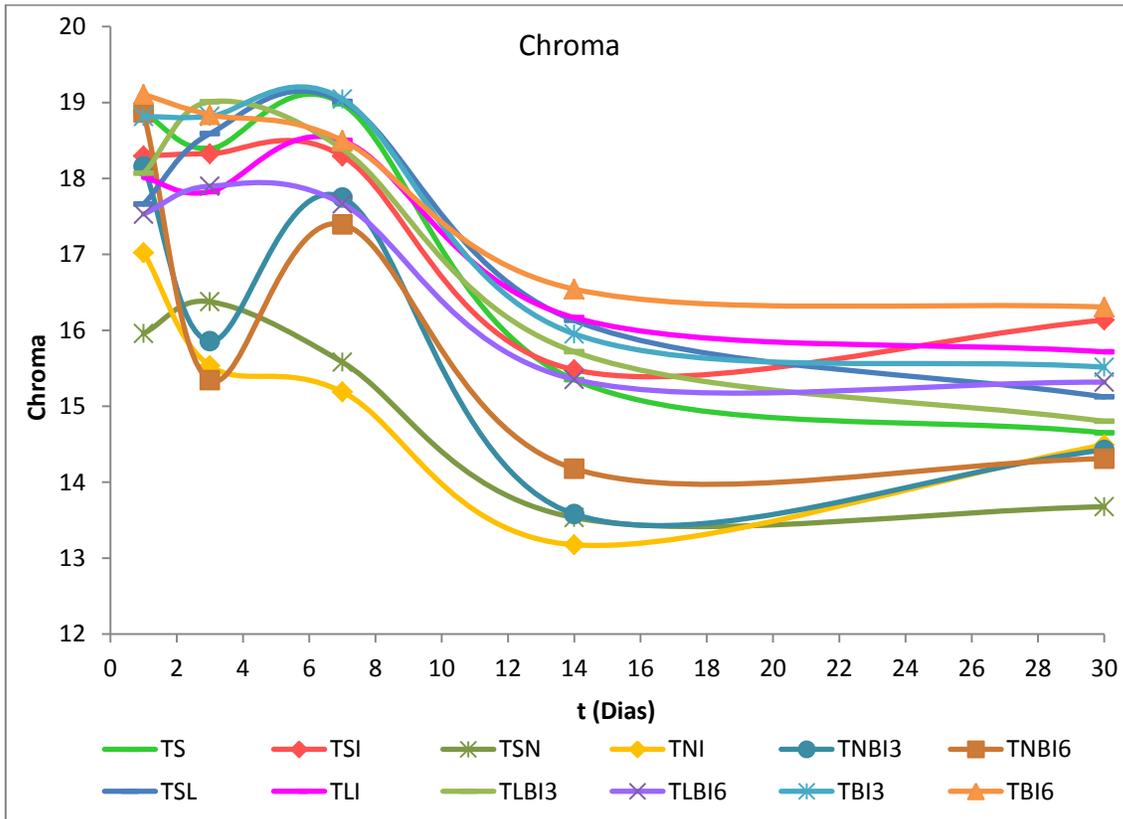


Gráfica 23. Variación de índice de amarillo (b^*) del modelo cárnico con diferentes antimicrobianos.

En la gráfica 24, se aprecia la variación de cromaticidad (Chroma) que presentan todos los tratamientos, esta gráfica contiene todos los tratamientos control como, TSI, TSL, TBI3, TBI6, TNI, TLI que tienen un comportamiento similar a través del tiempo. Esto sucede también con el resto, salvo TS, TSN y TLBI3, que varían ligeramente de la tendencia general, lo que indica que algunas son estadísticamente diferentes (anexo D).

Existe una diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$), por lo que dichos tratamientos si afectan en el chroma, cabe señalar que al haber diferencias en los parámetros L^* , a^* y b^* , la variabilidad en

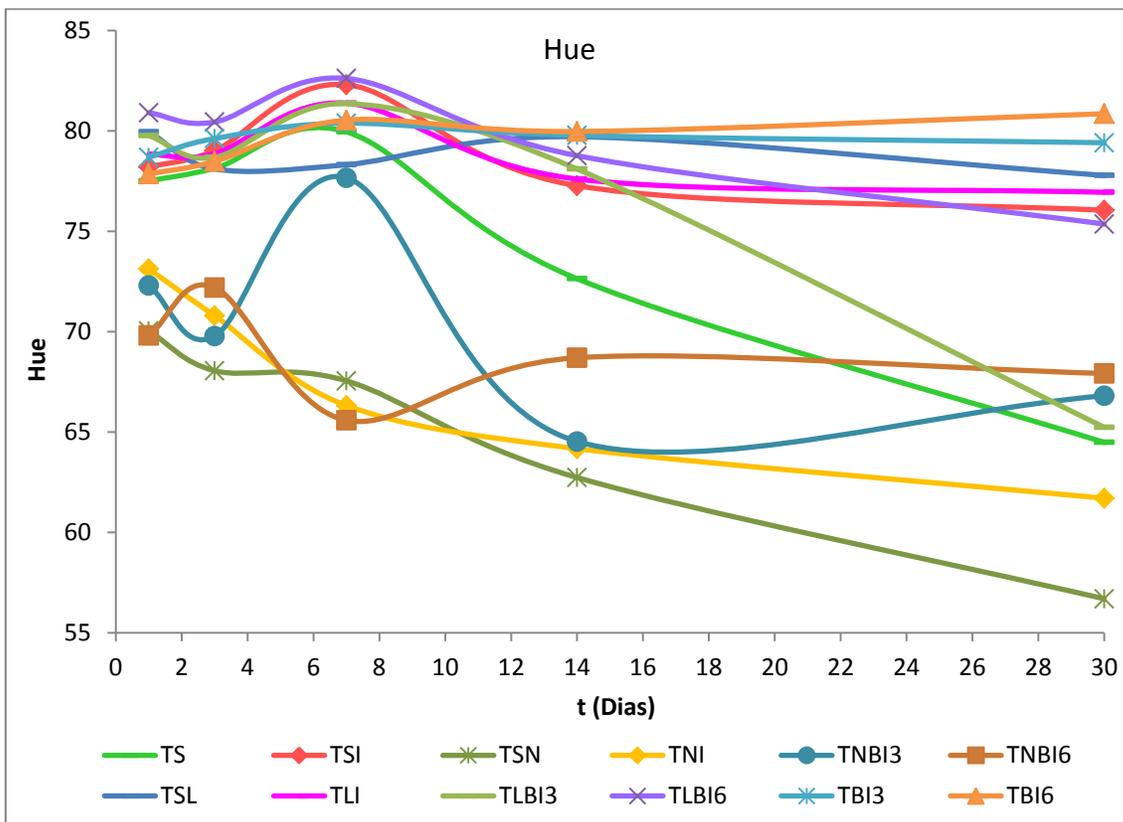
chroma es grande o dicho de otra manera: estadísticamente todas las muestras en chroma son entre sí diferentes significativamente (anexo D).



Gráfica 24. Variación de cromaticidad (Chroma) del modelo cárnico con diferentes antimicrobianos.

En la gráfica 25, se muestra la variación de matices (Hue) que presentan todos los tratamientos, esta gráfica contiene todos los tratamientos control como, TSI, TSL, TBI3, TBI6, TLI, TLBI3, TLBI6 y TS, que tienen un comportamiento similar a través del tiempo. Esto sucede también con TSN, TNI y TNBI6, que tienen una tendencia, pero diferente a la anterior, mientras que TNBI3 no sigue ninguna de las dos tendencias (anexo D).

Esto causa una diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$), por lo que dichos tratamientos si afectan en Hue, así como los parámetros L^* , a^* y b^* , puesto que Hue es dependiente de esto o mejor dicho, algunos de los tratamientos son estadísticamente diferentes significativamente en su valor Hue; ya que las que tienen nitritos se parecen más estadísticamente hablando (anexo D).



Gráfica 25. Variación de maticidad (Hue) del modelo cárnico con diferentes antimicrobianos.

6.4 Análisis estadístico.

Debido a que uno de los objetivos de este trabajo es encontrar un antimicrobiano que tenga un efecto sinérgico con la bacteriocina y que pueda conservar el modelo cárnico estable el mayor tiempo posible, se elaboraron una cantidad considerable de pruebas a éste las cuales

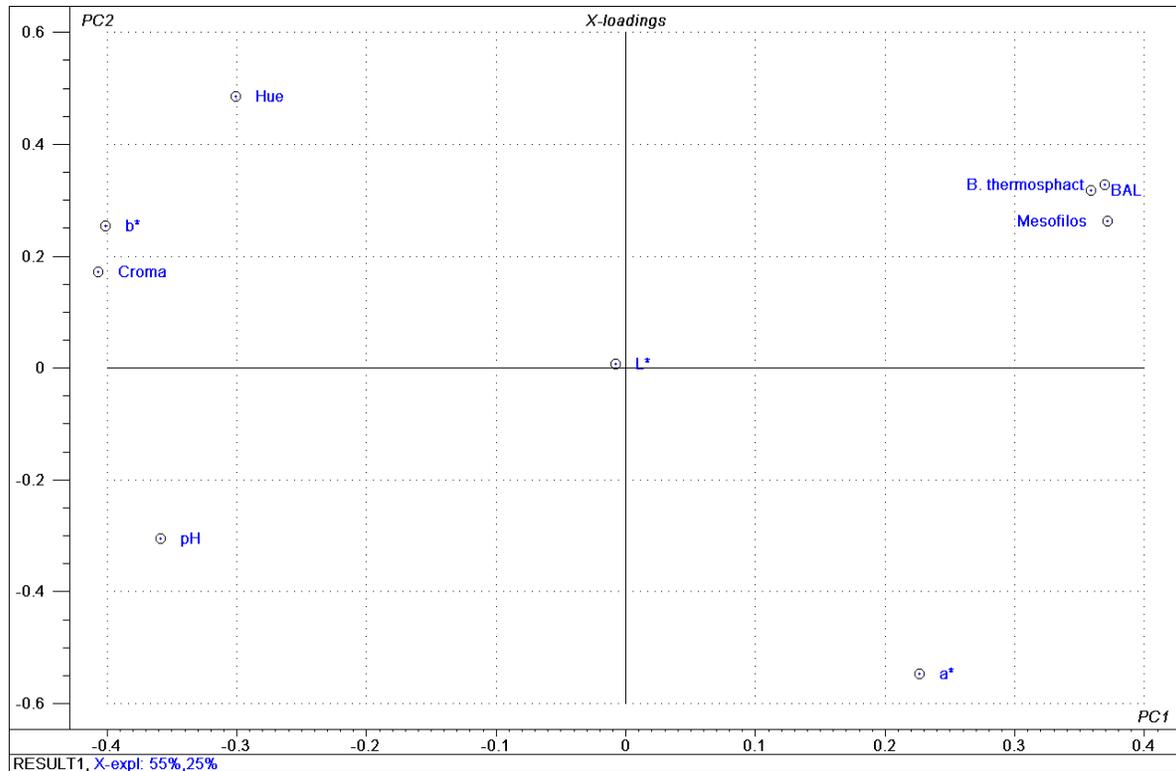
devolvieron una gran cantidad de resultados, los cuales están relacionados entre sí, por lo que se utilizó una herramienta estadística que es el análisis de componentes principales (PCA) el cual es una técnica de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables).

Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales y además serán independientes entre sí.

Un aspecto clave en PCA es la interpretación de los factores, ya que ésta no viene dada en prioridad de las variables, sino que será deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales (CAMO Software AS, 2006; Tipping y Bishop).

La gráfica 26 presenta el análisis de componentes principales y las variables de respuesta; donde cada una de las variables influye de manera diferente sobre cada uno de los tratamientos.

Lo anterior significa que las variables más alejadas del centro de la gráfica tiene una mayor influencia sobre los tratamientos que aquellas que se encuentran más cercanas al centro sin importar en que cuadrante se encuentran, de tal manera que b^* , croma (chroma), *B. thermosphacta*, BAL y mesófilos son las que más influyen o afectan de manera directa o indirecta al modelo cárnico.



Gráfica 26. Variables de respuesta en el PCA.

Al tener una gran cantidad de datos, se agruparon en una tabla para poder identificarlos más fácil en las gráficas 27 - 37. La tabla 10 indica la nomenclatura a utilizar: la abreviatura del tratamiento, así como un número para su fácil ubicación en las gráficas.

Tabla 10. Nomenclatura de las muestras para el PCA.

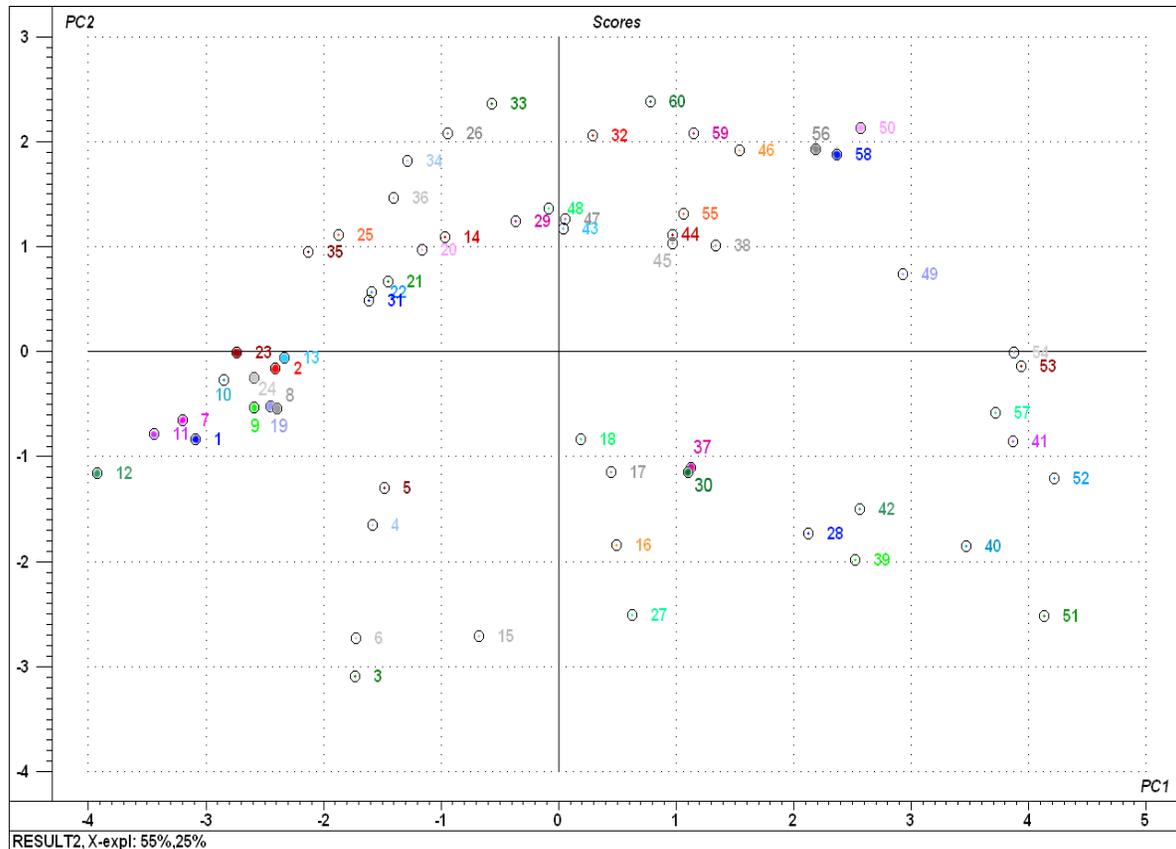
Día	Descripción	Tratamiento	No. en gráficas	Día	Descripción	Tratamiento	No. en gráficas
1	SISASB	TS	1	7	SICLSB	TSL	31
1	CISASB	TSI	2	7	CICLSB	TLI	32
1	SICNSB	TSN	3	7	CICLCB3	TLBI3	33
1	CICNSB	TNI	4	7	CICLCB6	TLBI6	34
1	CICNCB3	TNBI3	5	7	CISACB3	TBI3	35
1	CICNCB6	TNBI6	6	7	CISACB6	TBI6	36
1	SICLSB	TSL	7	14	SISASB	TS	37
1	CICLSB	TLI	8	14	CISASB	TSI	38
1	CICLCB3	TLBI3	9	14	SICNSB	TSN	39
1	CICLCB6	TLBI6	10	14	CICNSB	TNI	40
1	CISACB3	TBI3	11	14	CICNCB3	TNBI3	41
1	CISACB6	TBI6	12	14	CICNCB6	TNBI6	42
3	SISASB	TS	13	14	SICLSB	TSL	43

3	CISASB	TSI	14	14	CICLSB	TLI	44
3	SICNSB	TSN	15	14	CICLCB3	TLBI3	45
3	CICNSB	TNI	16	14	CICLCB6	TLBI6	46
3	CICNCB3	TNBI3	17	14	CISACB3	TBI3	47
3	CICNCB6	TNBI6	18	14	CISACB6	TBI6	48
3	SICLSB	TSL	19	30	SISASB	TS	49
3	CICLSB	TLI	20	30	CISASB	TSI	50
3	CICLCB3	TLBI3	21	30	SICNSB	TSN	51
3	CICLCB6	TLBI6	22	30	CICNSB	TNI	52
3	CISACB3	TBI3	23	30	CICNCB3	TNBI3	53
3	CISACB6	TBI6	24	30	CICNCB6	TNBI6	54
7	SISASB	TS	25	30	SICLSB	TSL	55
7	CISASB	TSI	26	30	CICLSB	TLI	56
7	SICNSB	TSN	27	30	CICLCB3	TLBI3	57
7	CICNSB	TNI	28	30	CICLCB6	TLBI6	58
7	CICNCB3	TNBI3	29	30	CISACB3	TBI3	59
7	CICNCB6	TNBI6	30	30	CISACB6	TBI6	60

SI: sin inoculo; CI: con inoculo (*B. thermosphacta*); SA: sin antimicrobiano; CN: con nitritos (0.05 mg /mL); CL: con lactato (0.2 mg/mL); SB: sin bacteriocina; CB3: con bacteriocina (3.125 mg/mL); CB6: con bacteriocina (6.25 mg/mL).

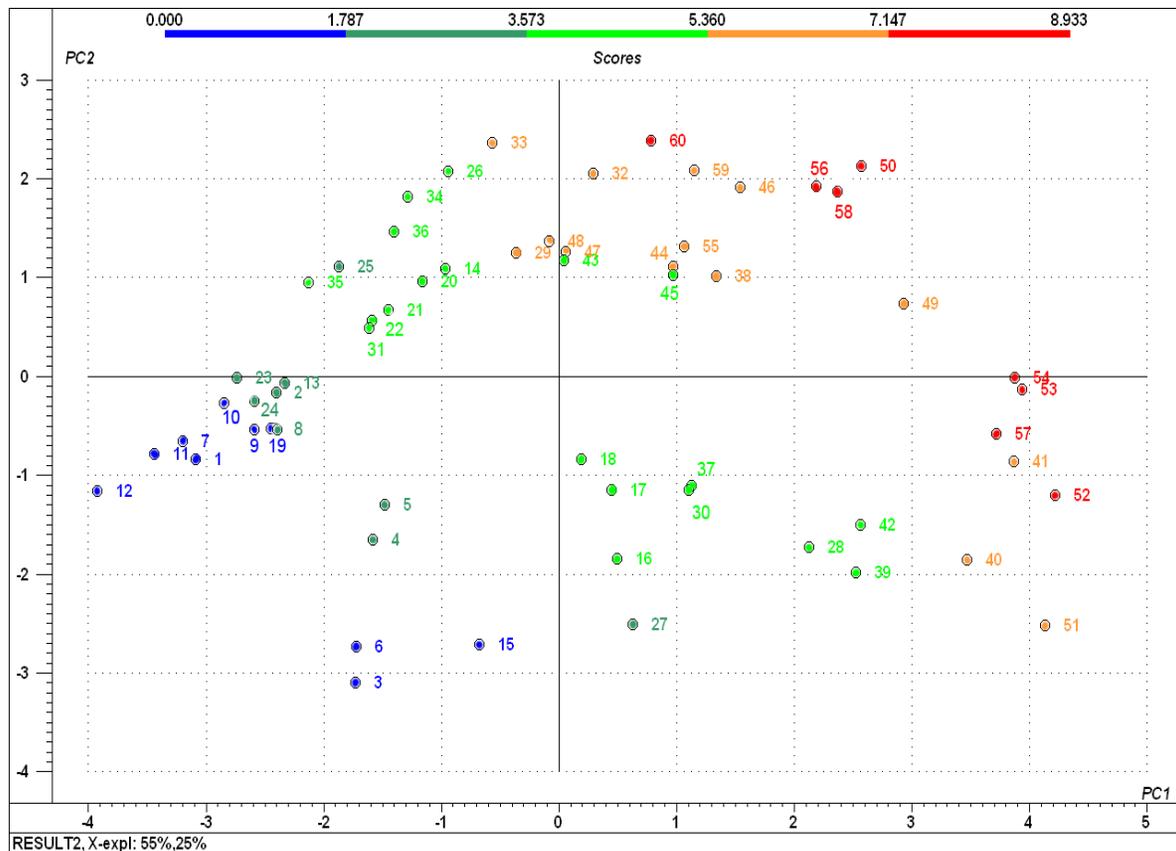
En la gráfica 27 se observan todas las muestras y como afectan las variables respuestas sobre estas, es decir aquellas muestras que tengan el mismo color son estadísticamente iguales; lo cual no sucede aquí, ya que ningún color es igual a otro, puesto que todas las variables respuesta afectan de manera diferente a las muestras, por lo que tener muestras estadísticamente iguales respecto a todas las variables en nuestro caso no sucede.

Por estos motivos se muestran varias gráficas, explicando cada una de las variables por separado y al final se encontró el tratamiento más adecuado. Empezamos por las variables microbiológicas que son el principal objetivo de este trabajo.



Gráfica 27. Distribución de las muestras en el PCA.

La gráfica 28 muestra los tratamientos respecto a *B.thermosphacta*, ya que todas aquellas muestras que se encuentran hacia la derecha y hacia arriba se ven más afectadas por esta variable, también se presenta una escala en colores para la población de *B.thermosphacta* en log UFC/mL. Con esto podemos decir que las muestras en azul son estadísticamente iguales y tienen el recuento más bajo, lo que nos permite decir que estos tratamientos son mejores, pero nos interesa también cumplir con los límites sugeridos y que duren el mayor tiempo. En ese sentido los mejores tratamientos abarcan las muestras en color verde oscuro y verde claro, que tienen un recuento entre 1.787 a 5.360 log UFC/mL.

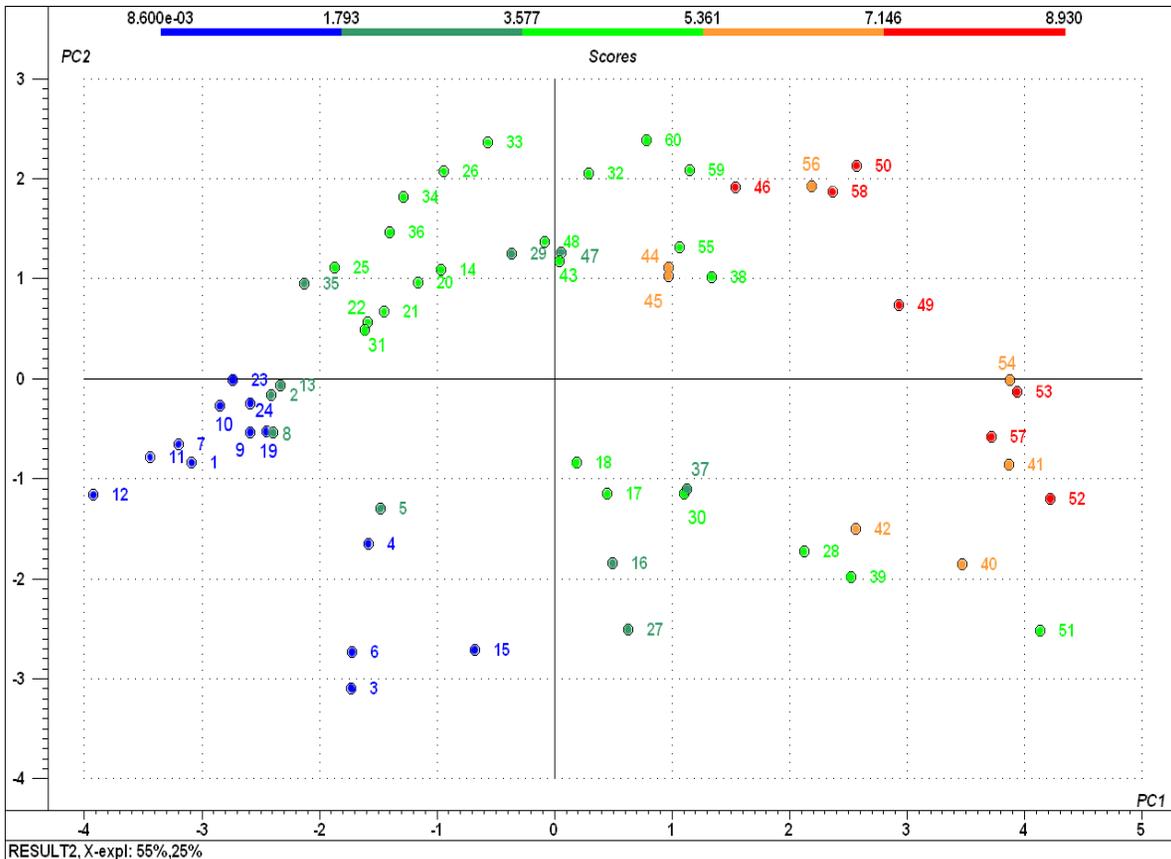


Gráfica 28. PCA de las muestras respecto a *B.thermosphacta*. Muestras con el mismo color son estadísticamente iguales; Colores diferentes, estadísticamente tienen una diferencia significativa. Escala en UFC/mL.

La gráfica 29 presenta los tratamientos respecto a las bacterias aerobias presentes, ya que todas aquellas muestras que se encuentran hacia la derecha y hacia arriba se ven afectadas por esta variable, también se muestra una escala en colores para la población de microorganismos aerobios en log UFC/mL. Con esto podemos decir que las muestras en rojo son estadísticamente iguales y tienen el recuento más alto, lo que nos permite decir que estos tratamientos son peores, por lo que nos interesan aquellos menores, que cumplan los límites establecidos y que duren el mayor tiempo.

En ese sentido los mejores tratamientos son todos los tratamientos en verde claro y verde oscuro, que tienen un recuento

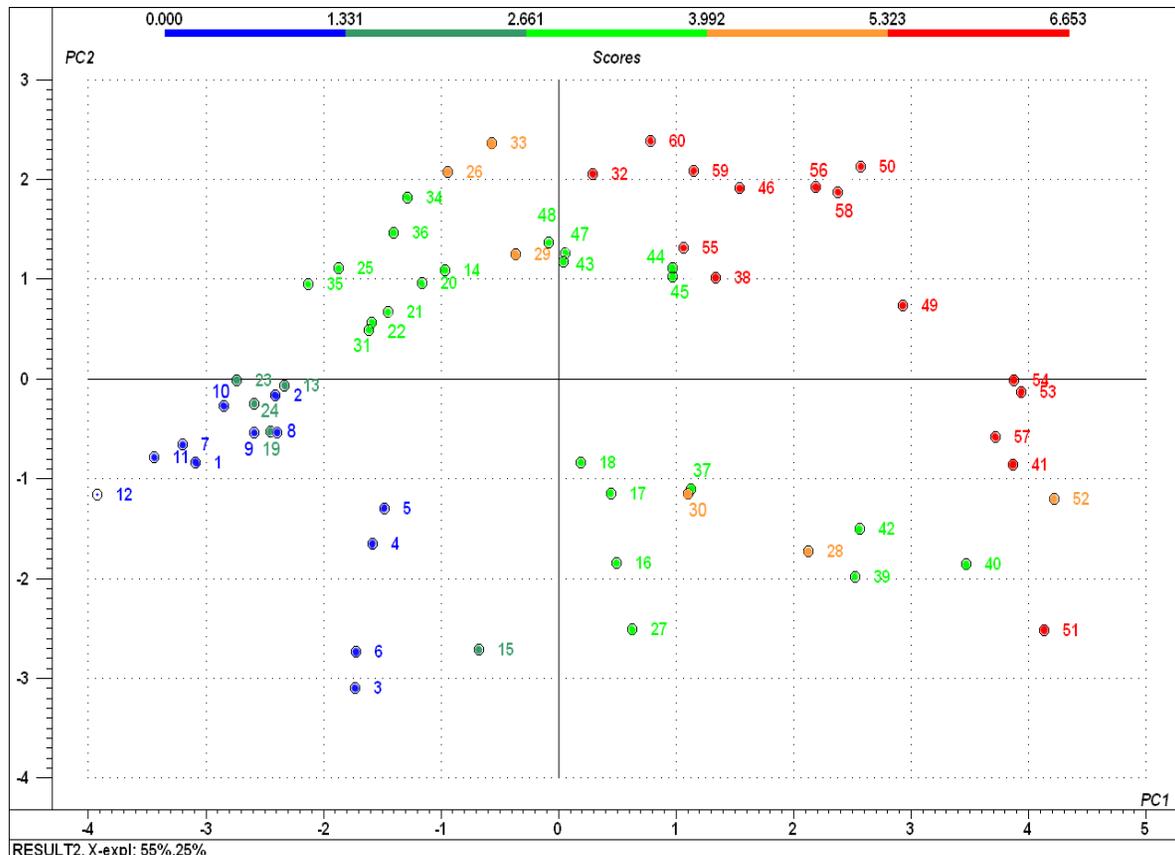
entre 1.793 y 5.361 log UFC/mL (muestras en el mismo color no presentan diferencia significativa), aunque de estos tratamientos hay algunos que pasan la norma, podemos aceptarlos, ya que hay que considerar que nosotros inoculamos sobre las muestras una cantidad considerable de microorganismos.



Gráfica 29. PCA de las muestras respecto a bacterias aerobias. Muestras con el mismo color son estadísticamente iguales; colores diferentes, estadísticamente tienen una diferencia significativa. Escala en UFC/mL

La gráfica 30 muestra los tratamientos respecto a las bacterias ácido lácticas presentes, ya que todas aquellas muestras que se encuentran hacia la derecha y hacia arriba se ven afectadas por esta variable, también se aprecia una escala en colores para la población de microorganismos aerobios en log UFC/mL. Con esto podemos decir que las muestras del mismo color son estadísticamente iguales, lo que nos

permite decir que los mejores tratamientos son los azules, pero nos interesan aquellos menores y que duren el mayor tiempo.

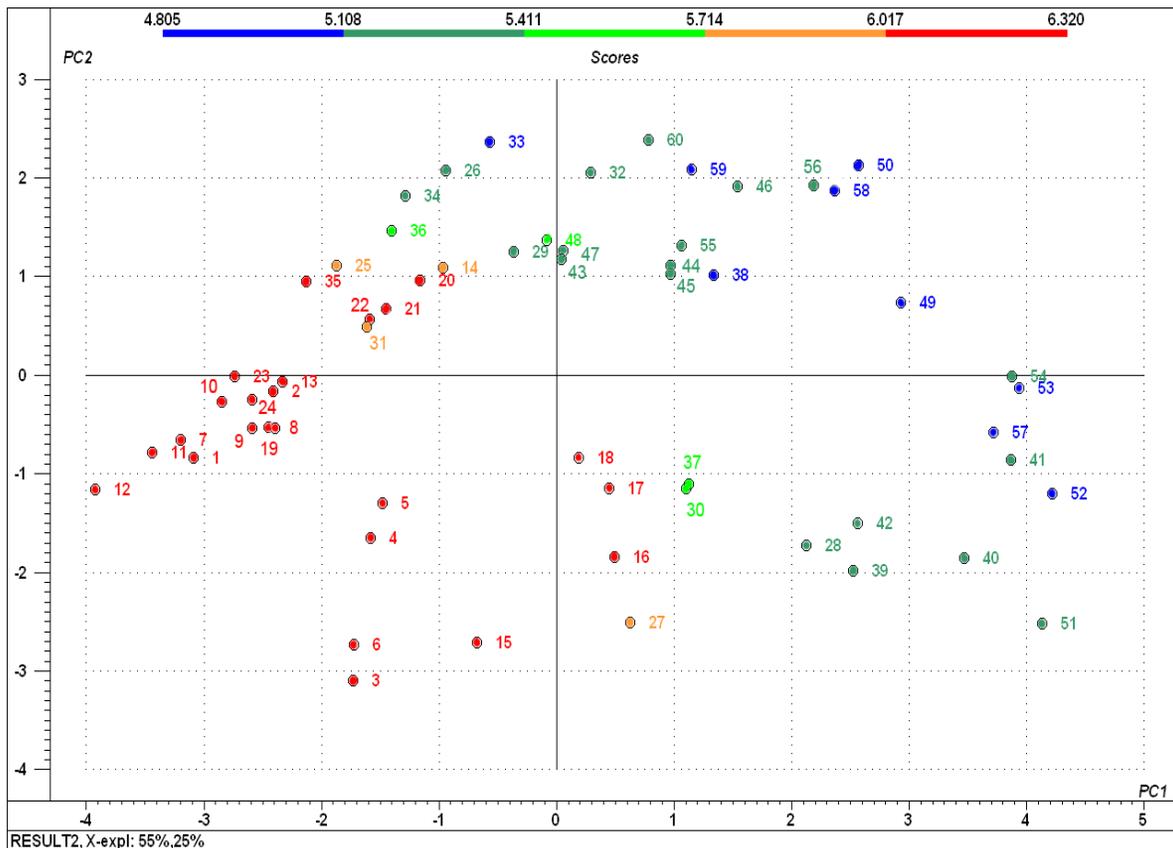


Gráfica 30. PCA de las muestras respecto a BAL. Muestras con el mismo color son estadísticamente iguales; Colores diferentes, estadísticamente tienen una diferencia significativa. Escala en UFC/mL

Bajo estos criterios, los mejores tratamientos son todos los verde claro y los naranja, que tienen un recuento entre 2.661 y 5.323 log UFC/mL, hay que considerar que se inoculó sobre las muestras una cantidad considerable de microorganismos que también pueden crecer en este medio.

En la gráfica 31 se ilustran los tratamientos conforme al pH, todas aquellas muestras que se encuentran hacia la izquierda y hacia abajo se ven más afectadas por esta variable, también se presenta una escala en colores para el pH de las muestras. Con esto podemos decir que las

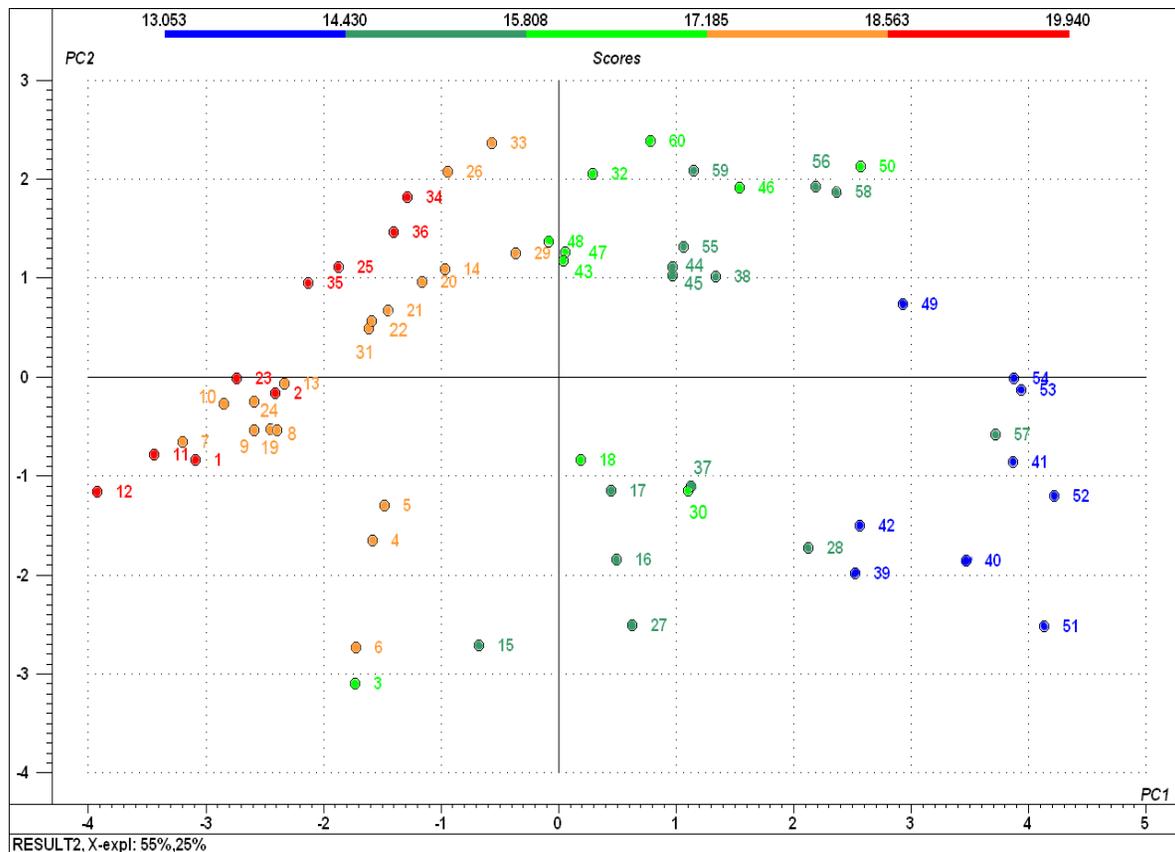
muestras del mismo color son estadísticamente iguales, lo que nos permite decir que los mejores tratamientos son aquellos que tengan un pH ácido ligeramente ácido para que los antimicrobianos sean efectivos pero no tan ácido para que exude agua (Coreti, 1986). Bajo estos criterios los mejores tratamientos son todos los verde oscuro y verde claro, que tienen un pH entre 5.108 y 5.714.



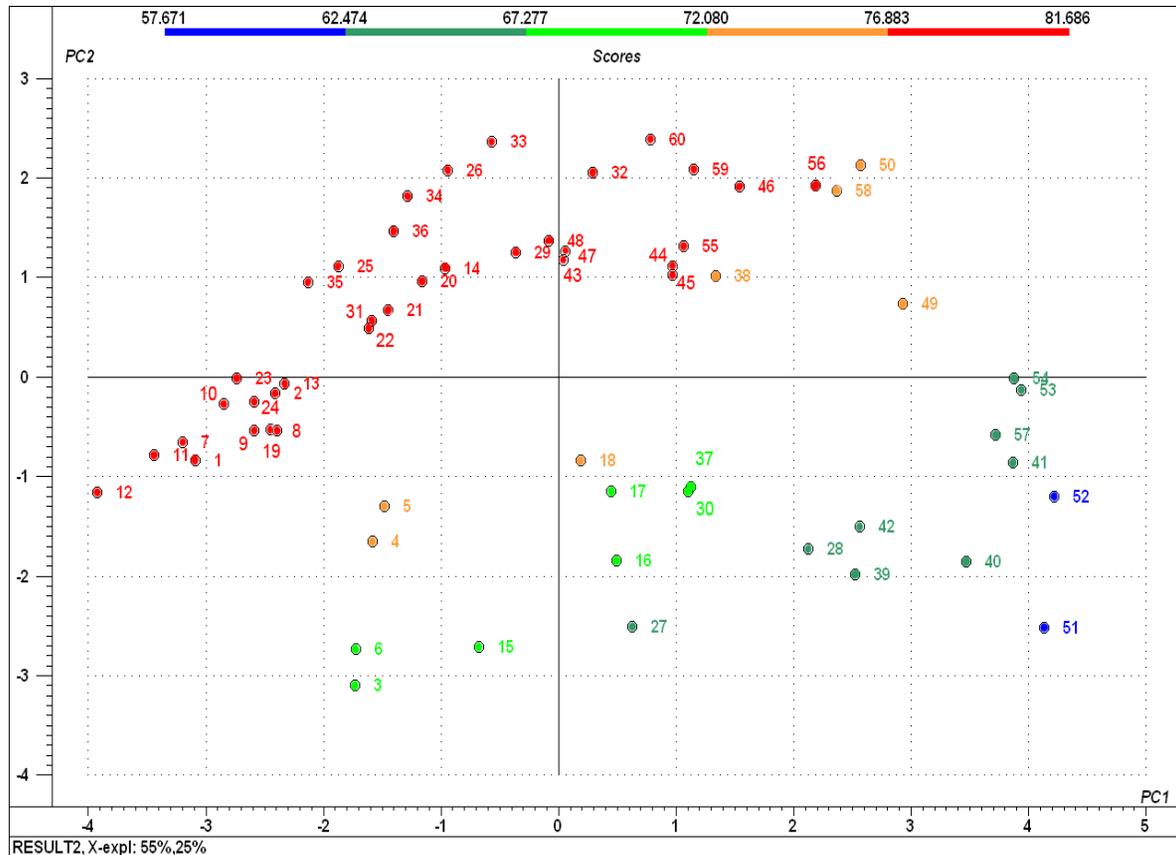
Gráfica 31. PCA de las muestras respecto al pH. Muestras con el mismo color son estadísticamente iguales; colores diferentes, estadísticamente tienen una diferencia significativa.

Puesto que también nos interesa el hecho de cómo afecta la bacteriocina en el color del modelo cárnico nos enfocamos más en chroma y hue, ya que estos valores dependen de L^* , a^* , b^* (Pandolfe, 1999).

En las gráficas 32 y 33 se ilustran los tratamientos conforme a Chroma y Hue, donde aquellas muestras que se encuentran hacia la izquierda y arriba se ven más afectadas por estas variables. Con esto se afirma que las muestras del mismo color son estadísticamente iguales, que para los fines de este trabajo los azules y los verde oscuro (según la gráfica 32 y 33) son los mejores con un chroma de 13.053 a 15.808 y de 57.671 a 67.277 en hue. Estos son los que más deseamos ya que resultan menos amarillentos y nosotros buscamos algo de rosado a rojizo.



Gráfica 32. PCA de las muestras respecto a Chroma. Muestras con el mismo color son estadísticamente iguales; colores diferentes, estadísticamente tienen una diferencia significativa. Entre más grande en la escala, mayor es Chroma.



Gráfica 33. PCA de las muestras respecto a Hue. Muestras con el mismo color son estadísticamente iguales; colores diferentes, estadísticamente tienen una diferencia significativa. Entre más grande en la escala, Hue varía de color.

Para decidir cuál de todos los tratamientos es el más adecuado bajo los criterios mencionados, se fueron seleccionando los mejores de cada variable en la tabla 11.

Tabla 11. Resumen de resultados.

Variable respuesta	Tratamientos seleccionados
Mesófilos aerobios	13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 43, 47, 48, 51, 55, 59, 60
BAL	13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 52
<i>B. thermosphacta</i>	13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 39, 42, 43, 45
pH	26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 54, 55, 56, 60

Chroma	3, 15, 16, 17, 18, 27, 28, 30, 32, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60
Hue	3, 6, 15, 16, 17, 27, 28, 30, 37, 39, 40, 41, 42, 51, 52, 53, 54, 57
Óptimos Microbiología	13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 39, 43
Óptimos Físicoquímicos	27, 28, 30, 32, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 54, 55, 56
Óptimos Global	27, 30, 37, 39, 43

Analizando la tabla 10 observamos que los tratamientos óptimos en microbiología son aquellos que coincidieron en las tres pruebas realizadas (mesófilos, BAL y *B. thermosphacta*), los óptimos en físicoquímicos son los que coincidieron en pH y Hue o Chroma; finalmente los óptimos globales son aquellos que coincidieron en microbiología y físicoquímicos al mismo tiempo.

El tratamiento número 30 es el que cumplió con todos los criterios de selección para mejorar la calidad higiénico sanitaria de los productos cárnicos emulsionados empacados al vacío y almacenados a temperatura de refrigeración (10°C). Este tratamiento es una combinación de nitritos (0.05 mg/mL) y bacteriocina (6.25 mg/mL), además de mantener las características de la emulsión cárnica como aceptables hasta el día 7. De los 5 tratamientos óptimos globales que se obtuvieron (27, 30, 37, 39 y 43), el número 30 tuvo en la variable de color, el índice de rojo más alto que los demás; con la ventaja de que tiene la concentración mínima de nitritos que pueden proteger del desarrollo de clostridios y sus toxinas (Tompkin, 2005).

De los tratamientos anteriores se puede seleccionar también uno que mantenga buenas características microbiológicas, de estabilidad de color y que dure más tiempo, aunque el color sea menos rojo que el

tratamiento 30. Sin embargo lo más importante será primero la seguridad antes que lo estético, ya que siempre se podrán usar colorantes para solventar características de color poco agradables. Uno de estos tratamientos es el (48) que tiene bacteriocina (6.25 mg/mL), se inoculó con *B. thermosphacta* y se evaluó a los 14 días, presentando buenas características microbiológicas pero al no contener nitritos la seguridad contra clostridios puede ser cuestionable y que a pesar de esto también es uno de los tratamientos adecuados para la preservación del modelo cárnico.

Capítulo 7

7. Conclusiones

La aplicación de la tecnología de barreras ayuda a desarrollar nuevos procedimientos de conservación hechos a la medida, ya que en este trabajo la aplicación de cada una de las barreras tiene un efecto directo sobre la estabilidad microbiológica y fisicoquímica del alimento, puesto que dependiendo del tiempo de conservación que se desee dar al producto serán impuestas las barreras en intensidad y tiempo.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que dentro del modelo cárnico, la combinación más efectiva fue la de bacteriocina (6.25 mg/mL) con nitritos (0.05 mg/g), ya que la efectividad depende en gran medida de la complejidad de variables que existen dentro de un entorno más apegado a la realidad.

La bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK 29 utilizada con la tecnología de barreras permitió una reducción del 68% de la cantidad máxima de nitritos permitida por la NOM-213-SSA1-2002 en un modelo cárnico, manteniendo estabilidad microbiológica y fisicoquímica en el alimento, con lo cual se reducen los efectos negativos que tienen los nitritos sobre la salud humana.

En la evaluación in vitro, la construcción de isobogramas es una herramienta muy eficiente con la cual se determinó el efecto entre los antimicrobianos en estudio; los cuales presentaron un efecto sinérgico cuando fueron combinados con la bacteriocina contra *Brochothrix thermosphacta* y *Escherichia coli*, con excepción de lactato de sodio que tuvo un efecto aditivo contra *Listeria innocua*. Aunque los isobogramas

son una herramienta de mayor uso en farmacéutica, tiene un gran potencial para aplicarla en el diseño de mezclas de conservadores.

Por lo tanto el desarrollo de modelos cárnicos bajo condiciones extremas para la evaluación de sistemas de conservación de alimentos permite garantizar la efectividad de estos en condiciones óptimas, con controles de calidad estrictos y que puedan cumplir y/o superar las normas establecidas.

Perspectivas

Durante mucho tiempo ha existido un gran interés en la reducción de la cantidad de nitritos que se adiciona a los diferentes productos cárnicos, debido a que su utilización trae consigo efectos negativos sobre la salud de los consumidores, como promover la aparición de cáncer por formación de nitrosaminas durante la preparación de los alimentos con nitritos o durante su proceso de elaboración.

Su disminución reduce la posibilidad de formación de nitrosoaminas, así como la cantidad de sodio adicionada a los productos cárnicos curados, ya que generalmente la adición de nitritos se hace mediante mezclas formuladas con nitrito y/o nitrato de sodio y cloruro de sodio. La búsqueda por reducir los nitritos en los alimentos ha considerado diferentes tecnologías como el uso de la tecnología de barreras y bioconservadores como las bacteriocinas.

La utilización de bacteriocinas no se limita a productos en los cuales ya se ha visto su efectividad, como es el caso de la nisina en quesos; sino que se puede emplear con altas posibilidades de éxito en productos lácteos (leche y yogurt) y en productos vegetales (jugos y recubrimiento para frutas).

Bibliografía

- Adams, M. R., & Moss, M. O. (2008). *Food microbiology* (3th ed.). Cambridge, U.K.: RSC Publishing.
- Alvarado, C., García-Almendárez, B., Martín, S., & Regalado, C. (2005). Anti *Listeria monocytogenes* bacteriocin like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan Mexican style cheese. *Current Microbiology* (51), 110-115.
- Álvarez-Cisneros, Y. M., Fernández, F. J., Wachter-Rodarte, C., Del Rosario Sáinz E., T., & Ponce-Alquicira, E. (2010). Biochemical characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Enterococcus faecium* MXVK29, isolated from Mexican traditional sausage. *Journal of Food Science and Agriculture* (90), 2475-2481.
- American Meat Science association. (1991). *Guidelines for Meat Color Evaluation*. Savoy, IL, U.S.A: American Meat Science Association.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In S. Seppo, A. Von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria - Microbiological and functional aspects* (pp. 20-21). New York, U.S.A.
- Ballongue, J. (2004). Capítulo 2: Bifidobacteria and Probiotic Action. In S. Salminen, A. Von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria* (pp. 105-106, 201). New York, U.S.A: Marcel Dekker Inc.
- Barreto Valdiviezo, J. A. (2003). *Respuesta de Aspergillus flavus a mezclas de extracto de canela y benzoato de sodio*. Tesis, Universidad de las Américas Puebla, Cholula, Puebla, México.
- Becher, P. (1986). *Encyclopedia of emulsion technology*. New York: Marcel Dekker.
- Berenbaum, M. (1978). A method for testing for synergy with any number of agents. *The Journal of Infectious Diseases* (137), 122-130.
- Betts, G., & Everis, L. (2008). Hurdle Techniques. In G. S. Tucker (Ed.), *Food biodeterioration and preservation* (p. 195). Singapore: Blackwell Publishing.
- Bhunja, A., Johnson, M., Ray, B., & Kalchayanad, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology* (70), 25-33.
- Branen, J. K., & Davidson, P. (2004). Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by EDTA and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology* (90), 63-74.
- C. de Wit, J., & Rombouts, F. (1990). Antimicrobial activity of sodium lactate. *Food microbiology* (7), 113-120.
- CAMO Software AS. (2006). The unscrambler methods. In *The unscrambler manual* (pp. 95-106). Oslo, Noruega.

- Cassens, R. G. (1996). Preservation against what. In *Meat preservation - Preventing losses and assuring safety* (Vol. 4, pp. 46, 61, 62). U.S.A.: Food and Nutrition Press.
- Castro Aranda, A., Ben Omar, N., Lucas López, R., Abriouel Abriouel, H., García G., M. T., & Martínez C., M. (2004). *El género Enterococcus en microbiología de los alimentos*. Jaén, España: Publicaciones de la Universidad de Jaén.
- Chikindas, M., Chi-Zang, Y., & K.L., Y. (2004). Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *International Journal of Food Microbiology* (90), 15-22.
- Chipley, J. R. (2005). Capítulo 2: Sodium benzoate and benzoic acid. In P. Davidson, J. N. Sofos, & A. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp. 11-30). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Cintas, L., Casaus, M., Herranz, C., Nes, I., & Hernández, P. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International* (74), 281-305.
- Coreti, K. (1986). *Embutidos: elaboración y defectos*. Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Cotter, P., Hill, C., & Ross, R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Microbiology Reviews* (3), 777-788.
- Davidson, P. M., & Branen, A. (2005). Food Antimicrobials - An introduction. In P. M. Davidson, J. N. Sofos, & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp. 2,3,11-38). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Davidson, P., & Parish, M. (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology* (43), 148-155.
- Davidson, P., & Zivanovic, S. (2003). The use of natural antimicrobials. In P. Zeuthen, & L. Bogh-Sorensen (Eds.), *Food preservation techniques*. Cambridge, U.K.: Woodhead Publishing Ltd.
- Davidson, P., Juneja, V., & Branen, P. (2002). Capítulo 20: Antimicrobials agents. In A. Branen, P. Davidson, & S. Salminen (Eds.), *Food additives* (pp. 563-591). New York: Marcel Dekker.
- De Kwaadsteniet, M., Todorov, S., Knoetze, H., & Dicks, L. (2005). Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus munditii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* (105), 433-444.
- De Vuyst, L., Foulquié Moreno, M., & Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International journal of food microbiology* (84), 299-318.
- Devriese, L., Baele, M., & Butaye, P. (2006). The genus *Enterococcus*: Taxonomy. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The*

Prokaryotes - A handbook on the biology of bacteria (Vol. 4, pp. 163-171). Singapore: Springer Science+Business Media, LLC.

Doores, S. (2005). Capítulo 4: Organic Acids. In P. Davidson, J. N. Sofos, & A. Branen (Eds.), *Antimicrobials In Food* (pp. 116-120). Boca Raton, FL: CRC Press.

Eliopoulos, G., & Moellering, R. (1991). Antimicrobial combinations. In V. Lorian (Ed.), *Antibiotics in laboratory medicine* (pp. 406-432). Baltimore: Williams & Williams.

FDA. (21CFR101.22 (a)(5)). Food And Drugs. In *Code of Federal Regulations*. U.S.A.

FDA. (21CFR170.3 (o)(2)). Food And Drugs. In *Code of Federal Regulations*. U.S.A.

Food safety and inspection service. (2001, 01 01). *Preparación de las carnes*. (USDA, Ed.) Retrieved 06 01, 2011, from http://www.fsis.usda.gov/en_espanol/Preparacion_Carne/index.asp

Foulquié, M., Sarantinopoulus, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology* (106), 1-24.

Gálvez, A., Abriouel, H., & Lucas, R. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* (120), 51-70.

Glass, K., Granberg, D., Smith, A., McNamara, A., Hardin, M., Mattias, J., et al. (2002). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by sodium diacetate and sodium lactate on wieners and cooked bratwurst. *Journal of food protection* (65), 116-123.

Gould, G. W. (1989). Introduction. In G. W. Gould, *Mechanisms of action of food preservation procedures* (pp. 1-10). London: Elsevier Applied Science.

Gould, G. W. (2001). New processing technologies: an overview. *Proceedings of the nutrition society* (60), 463-474.

Gould, G. W. (1995). Overview. In G. W. Gould, *New methods of food preservation*. Glasgow: Blackie Academic and Professional.

Guérin-Méchin, L., Leveau, J.-Y., & Dubois-Brissonet, F. (2004). Resistance of spheroplasts and whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal activity of various biocides: evidence of the membrane implication. *Microbiological Research* (159), 51-57.

Heng, N. C., Wescombe, P. A., & Burton, J. P. (2007). The Diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria. In M. Riley, & M. Chavan (Eds.), *Bacteriocins: Ecology and Evolution* (pp. 54, 55, 69 - 80). Heidelberg: Springer-Verlag.

Holley, R. A. (1999). Brochothrix. In R. K. Robinson (Ed.). Academic Press.

- Holzappel, W. H., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to proactive cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* (24), 343-362.
- Hoover, D. G., & Chen, H. (2005). Bacteriocins with potencial for use in foods. In P. Davidson, J. N. Sofos, & A. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp. 397-398). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Hugas, M., Garriga, M., & Aymerich, M. (2003). Functionalty of enterococci in meat products. *International journal of food microbiology* (88), 223-233.
- ISO 13722. (1996). *Meat and meat products - Enumeration of Brochothrix thermosphacta - Colony count technique*. Switzerland.
- James, S., & James, C. (2008). Food Chilling. In *Food biodeterioration and preservation* (pp. 81,82). Singapore: Blackwell Publishing Ltd.
- Jay, J. M. (2000). *Modern Food Microbiology* (6th ed.). Maryland: Aspen Publishers Inc.
- Katla, T., Netersatd, K., Vancanneyt, M., Swings, J., & Axelsson, L. (2003). Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to Sakacin P, Sakacin A, Pediocin PA-1 and Nisin. *Applied and environmental microbiology*, 69 (8), 4431-4473.
- Khan, H., Flint, S., & Yu, P.-L. (2010). Enterocins in food preservton. *International Journal of food microbiology* (141), 1-10.
- Larissa Blanno, M. (2005). La Emulsión cárnica en la elaboración de salchicha viena. *Mundo lácteo y cárnico*, 4-8.
- Lehrke, G., Hernaez, L., Mugliaroli, S. L., Von Staszewski, M., & Jagus, R. J. (2011). Sensitization of *Listeria innocua* to inorganic and organic acids by natural antimicrobials. *LWT - Food Science and Technology* (44), 984-991.
- Leistner, L. (2007). Combined methods for food preservation. In M. Shafiur Rahman (Ed.), *Handbook of food preservation* (pp. 867-869, 870, 872, 874, 878). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Leistner, L., & Gould, G. (2005). Capitulo 19: Update on hardle technology approaches to food preservation. In P. Davidson, J. Sofos, & A. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp. 621, 624, 629-630). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Line, J., Svetoch, E., Eruslanov, B., Perelygin, V., Mitsevich, E., Mitsevich, I., et al. (2008). Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (52), 1094-1100.
- Long, A., & Barker, S. (1999). Antimicrobial compounds. In F. Francis (Ed.), *Wiley encyclopedia of foos science and technology* (pp. 65-66). U.S.A.

López-Malo V., A., Palou, E., Parish, M. E., & Davidson, P. (2005). Methods for activity assay and avaluation of results. In P. Davidson, J. Sofos, & A. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp. 660-675). Boca Raton, FL: CRC Press.

Lück, E., & Jager, M. (1999). Capítulo 10: Nitritos. In E. Lück, & M. Jager, *Conservación química de los alimentos* (pp. 111-118). Zaragoza, España: Acribia S.A.

Lück, E., & Jager, M. (1999). Capitulo 21: Ácido benzoico . In E. Lück, & M. Jager, *Conservación química de los alimentos* (pp. 217-224). Zaragoza, España: Acribia S.A.

Mancini, R., & Hunt, M. (2005). Current research in meat color. *Meat Science* (71), 100-121.

Martín-Platero, A., Valdivia, E., Ruiz-Rodriguez, M., Soler, J., Martín-Vivaldi, M., Maqueda, M., et al. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupaepops*). *Applied and Environmental Microbiology* (72), 4245-4249.

McPhee, J., & Griffiths, M. (2011). *Pseudomonas* spp. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences* (p. 3487). U.K.

Miles, A., Misra, S., & Irwin, J. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene* , 38, 732-749.

Müller, S. G., & Ardoino, M. A. (2005). Elaboración y estandarización de embutidos. *Carnilac* , 9-13.

Müller, S. G., & Ardoíno, M. A. (2002). *procesamiento de carnes y embutidos - Elaboración, estandarización, control de calidad*. Organización de los Estados Americanos.

Mustapha, A., Ariyapitipun, T., & Clarke, A. (2002). Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin. *Journal of food science* (67), 262-267.

NOM-092-SSA1-1994. (1994). *Bienes y servicio - Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa* .

NOM-109-SSA1-1994. (1994). *Bienes y servicios - procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico* .

NOM-110-SSA1-1994. (1994). *Bienes y servicios - Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico* .

NOM-213-SSA1-2002. (2002). *Productos y servicios - Producto cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba* .

Pandolfe, W. D. (1999). Color and food. In F. Francis (Ed.), *Wiley encyclopedia of food science and technology* (pp. 368-369). U.S.A: Wiley and Sons.

- Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis, G., Despina, D., & Ambrosiadis, I. (2006). Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor "indicator microorganism". *Microbial Cell Factories* (5), 30.
- Pérez Dubé, D., & Andújar Robles, G. (2000). Cambios de coloración de los productos cárnicos. *Revista cubana de alimentación y nutrición* , 14 (2), 114-123.
- Pérez Reytor, D. C., Domínguez Vázquez, I., & Sosa Espinoza, Á. E. (2002). Evaluación del método de siembra en placa "traza de la dilución" en el control de calidad de bancos de mutantes de *Escherichia coli* K12. *Biotecnología Aplicada* , 19, 169-173.
- Ramos, N., Farias, M., Almada, C., & Crivaro, N. (2007). Estabilidad de salchichas con hidrocoloides y emulsificantes. *Mundo Lácteo y Cárnico* , 4-7.
- Riera, E. B., Chamorro, G., Zárata, M. N., Falcón, M., & Franco, R. (2008). Efecto del espesor y del pH del agar Mueller-Hinton en el antibiograma. *Panam Infectol* (10 Supl 1), S64-69.
- Satterlee, L., & Hansmeyer, W. (1974). The role of light and surface bacteria in the color stability of prepackaged beef. *Journal Food Science* (39), 305-308.
- Schillinger, U., & Lücke, F. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* (55), 1901-1906.
- Schlegel, H. G. (1997). Capítulo 6: El crecimiento de los microorganismos. In H. G. Schlegel, *Microbiología General* (pp. 214-215). Barcelona, España: Omega S.A.
- Sebranek, J. G. (2009). Basic curing ingredients. In *Ingredients in meat products - Properties, functionality and applications* (pp. 12-14). New York, U.S.A: Springer Science + Business Media, LLC.
- Shafiur Rahman, M. (2007). Capítulo 13: Nitrites in food preservation. In M. Shafiur Rahman (Ed.), *Handbook of food preservation* (pp. 299-308). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Shafiur Rahman, M. (2007). Food Preservation: Overview. In M. Shafiur Rahman (Ed.), *Handbook of Food Preservation* (p. 4). Boca Raton, FL, U.S.A: CRC Press.
- Simpson, C. A., & Sofos, J. N. (2009). Capítulo 14: Antimicrobial ingredients. In *Ingredients in meat products - Properties, functionality and applications* (pp. 309-333). Madison: Springer Science+Business Media.
- Simpson, R., Li, K., & Torres, J. A. (1989, Julio 9-12). A management tool to improve the microbial quality of refrigerated foods. *Proceedings of the International Conference on Technical Innovations in Freezing and Refrigeration of Fruits And Vegetables* . Davis, California, U.S.A.
- Smith, J. (1993). *Technology of reduced-additive foods*. London, Great Britain: Blackie Academic & Professional.

- Smith, J., & Hong-Shum, L. (2003). *Food additives data book*. Great Britain: Blackwell.
- Špelina, V., Schelemmerová, L., Landfeld, A., Kýhos, K., Měřička, P., & Houška, M. (2007). Thermal inactivation of enterococcus faecium. *Czech Journal of Food Science*, 25 (5), 283-290.
- Stackerbrandt, E., & Jones, D. (2006). The genus Brochothrix. In *The Prokaryotes - A handbook on the biology of bacteria* (Vol. 4, pp. 483-485). Singapore: Springer Science + Business Media, LLC.
- Tagg, J., Dajani, A., & Wannamaker, L. (1976). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriol* (40), 722-756.
- Thippareddi, H., & Sánchez, M. (2006). Thermal Processing of Meat Products. In D.-W. Sun (Ed.), *Thermal food processing - New technologies and quality issues* (pp. 185,191). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Tipping, M. E., & Bishop, C. M. Probabilistic principal component analysis. *Journal of the royal statistical society, Serie B* (61), 661-622.
- Tirado, J., Paredes, D., Velázquez, G., & Torres, J. (2005). Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5 (1), 66-76.
- Tompkin, R. B. (2005). Capítulo 6: Nitrite. In P. Davidson, J. N. Sofos, & A. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp. 171-190, 200, 210-218). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Vicent, J., Veomett, R., & Riley, R. (1959). Antibacterial activity associated with Lactobacillus acidophilus. *Bacteriol* (78), 477-484.
- Watts, B. (1954). *Oxidative rancidity and discoloration in meat - Advances in food research* (Vol. 5). New York, U.S.A.: Academic Press Inc.
- Weimer, B. (2011). Physiology and stress resistance. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences* (Vol. 3, p. 63). Elsevier.
- Zago, A., & Chugani, S. (2009). Pseudomonas. In *Encyclopedia of microbiology* (Vol. 2, p. 254). Elsevier Inc.
- Zamudio Maya, M. (2006). Capítulo 11: Microorganismos patógenos y alterantes. In Y. Hui., & M. R. Rosmini (Eds.), *Ciencia y tecnología de carnes* (pp. 350-351). México D.F., México: Limusa S.A. de C.V.

Anexo A – Información Bibliográfica

Tabla A1. Reacciones homeostática y de estrés usadas en la tecnología de barreras (Leistner & Gould, 2005).

Estrés	Reacción Homeostática
Homeostasis Activa	
Bajos niveles de nutrientes	Agotamiento de nutrientes; responsable de la fase estacionaria; producción de formas no viables de microorganismos.
Reducción de pH	Extrusión de H ⁺ que cruzan la membrana celular; mantenimiento del pH citoplasmático; mantenimiento del gradiente de pH y potencial de la membrana.
Presencia de ácidos orgánicos débiles	Extrusión de H ⁺ adicionales y a veces del ácido.
Bajo a _w	Osmoregulación; acumulación de "solutos compatibles"; evitar pérdida de agua; mantenimiento rígido de la membrana.
Descenso de temperatura	Respuesta al choque frío; cambios en lípidos de la membrana para mantener fluidez satisfactoria.
Aumento de temperatura	Respuesta al choque caliente; cambios en lípidos de la membrana.
Presencia de biocidas	Adaptación fenotípica; reducción de permeabilidad de la membrana de la pared celular (cell-wall/membrane permeability).
Radiación UV	Supresión de dímeros de timina y reparación de DNA.
Radiación Ionizada	Reparación de rupturas de cadena simple en DNA
Homeostasis Pasiva	
Alta temperatura	Construcción de mecanismos que mantengan bajo nivel en el protoplasto de las esporas bacterianas
Altas presiones	Incertidumbre; puede incluir adaptación de células vegetativas y reducción del contenido de agua en el protoplasto de las esporas.
Ultrasonificación	Dureza estructural de la pared celular o de la espora.
Homeostasis poblacional	
Competencia	Formación de interacciones comunitarias, adición de células que muestran antagonismo; biofilms.

Tabla A2. Características de *Brochotrix thermosphacta* (Stackerbrandt & Jones, 2006).

Microorganismo	<i>Brochotrix thermosphacta</i> .
Descripción General	Anaeróbica facultativa, proteolítica, sin movilidad, ataca azúcares por fermentación, Gram (+), catalasa (+).
Interés	Comercial; responsable de la generación de malos olores en la carne empacada al vacío.
Condiciones de crecimiento	<p>Como anaerobio facultativo está bien adaptado al crecimiento en ambientes de atmósfera modificada. El éxito de los deteriorantes en productos refrigerados se debe principalmente a su naturaleza psicotrópica. Tiene un rango de crecimiento de 0° a 30° C, con un óptimo de 20° a 25° C. Las temperaturas de refrigeración favorecen selectivamente su crecimiento. Su pH de crecimiento está en un rango de 5 a 9 el cual es predominante en los productos cárnicos.</p> <p>Estos factores, junto con su capacidad de tolerar valores bajos del a_w y mantener una resistencia relativa a los agentes de curación, aumentan su habilidad para pasar por encima de mucha de otra microflora deteriorante en los alimentos. <i>B. thermosphacta</i> crece en un medio basado en triptona, requiere, cisteína, α-lipoato, nicotinato y tiamina para crecer. Puede crecer con medio con un 6.5% de NaCl y soporta hasta un máximo de 10% de NaCl.</p>
Inhibición y resistencia	<p>Es inhibida por nitritos pero el grado de inhibición es relativo del pH del medio y la temperatura de incubación, un pH bajo así como una temperatura baja y una alta concentración de nitritos incrementan el efecto inhibitorio ya que <i>B. thermosphacta</i> no tiene un sistema de reducción de nitritos. Se ha encontrado que 200 ppm y un pH de 5.5 inhiben su crecimiento. Un estudio ha demostrado la inhibición, por una combinación de NaCl, NaNO_2, temperatura y pH. También el lactato de sodio se ha usado efectivamente contra <i>B. thermosphacta</i> (reducción de 4 ciclos logarítmicos en comparación con el control, depuse de 14 días).</p> <p>Es más resistente a la radiación que la mayoría de los microorganismos de deterioro de la carne, como <i>Pseudomonas</i>, pero es afectada por radiaciones de 0.5 y 2.0 kilogray. Es inhibida por diferentes bacteriocinas, entre ellas la Nisina, pero entre la Nisina libre y el sistema calcio-alginato ligado a Nisina (Fibrimex) así como a la carne, es más efectivo este último. Polímeros Incorporados a Nisina como polietileno y óxido de polietileno también reducen el crecimiento de <i>B. thermosphacta</i> en experimentos de superficies inoculadas de carne empacada al vacío.</p>

Tabla A3. Antimicrobianos.

Benzoato de sodio		
Microorganismo	Valor pH	Concentración mínima inhibitoria en mg/mL
<i>E. coli</i>	5.2 - 5.6	0.5 -1.2
<i>Pseudomonas spp</i>	6	2.0 – 4.8
<i>L. innocua</i>	5.6	3.0
<i>B. thermosphacta</i>	5.2	10
Sorbato de potasio		
Microorganismo	Valor pH	Concentración mínima inhibitoria en mg/mL
<i>E. coli</i>	5.2 - 5.6	0.5 – 1.0
<i>Pseudomonas spp</i>	6	1.0
<i>L. innocua</i>	5.6	0.5 – 1.0
<i>B. thermosphacta</i>	5.5	0.2
Sal cura (como nitritos)		
Microorganismo	Valor pH	Concentración mínima inhibitoria en mg/mL
<i>E. coli</i>	5.2 - 5.6	2.0
<i>Pseudomonas spp</i>	6	1.0
<i>L. innocua</i>	5.6	0.1
<i>B. thermosphacta</i>	5.2 - 5.4	0.3
Lactato de sodio		
Microorganismo	Valor pH	Concentración mínima inhibitoria en mg/mL
<i>E. coli</i>	5.2 - 5.6	2.0
<i>Pseudomonas spp</i>	6	1.0
<i>L. innocua</i>	5.6	0.5
<i>B. thermosphacta</i>	5.2	10

Anexo B – Medios de Cultivo y Formulaciones.

Tabla B1. Composición de medio caldo caseína-glucosa (CCG).

Compuesto	Gramos por litro
Peptona biotriptasa	20
Glucosa	10
Extracto de levadura	5
Citrato de amonio	2
Fosfato disódico	2
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Tween 80	1 mL
pH	7.0

Tabla B2. Composición de medio caldo soya tripticaseina (TSB).

Compuesto	Gramos por litro
Cloruro de sodio	5
Dextrosa	2.5
Fosfato dipotásico	2.5
Peptona de caseína	17
Peptona de soya	3
pH	7.0

Tabla B3. Formulación del modelo cárnico.

Compuesto	%
Carne de cerdo	49.95
Grasa de cerdo (lardo)	14.98
Hielo picado	24.97
Harina de trigo	7.0
NaCl	2.5
Eritorbato de sodio	0.2
Fosfato de sodio (Mezcla comercial para salchichas)	0.4

Tabla B4. Composición de medio APT.

Compuesto	Gramos por litro
Extracto de levadura	7.5
Triptona	12.5
Dextrosa	10
Citrato de sodio	5
Clorhidrato de tiamina	0.001
NaCl	5
Fosfato de potasio di básico	5
Cloruro de manganeso	0.14
Sulfato de magnesio	0.8
Sulfato ferroso	0.04
Complejo Monoleato de sorbitan	0.2
Agar	15
pH	7.0

Tabla B5. Composición de medio STAA.

Compuesto	Gramos por litro
Peptona	20
Extracto de levadura	2
Fosfato de potasio di básico	1
Sulfato de magnesio	1
Agar	13
Sulfato de estreptomicina	0.5
Acetato de talio	0.05
Ciclohexamida	0.05
pH	7.0

Anexo C – Cálculos

Actividad del compuesto antimicrobiano:

Se utilizó una solución de bacteriocina de 500 mg/mL para la prueba y obtener los datos de la tabla 7, con los que se obtienen los resultados, de acuerdo a los siguientes cálculos.

$$\left[\frac{11.32 \mu\text{gproteína}}{\text{mL}} \right] \left[\frac{\text{ml}}{500 \text{mgbacteriocina}} \right] = \frac{0.023 \mu\text{gproteína}}{\text{mgbacteriocina}}$$

$$UA = \left[\frac{16}{1} \right] \left[\frac{1}{30 \mu\text{L}} \right] \left[\frac{1000 \mu\text{L}}{\text{mL}} \right] \left[\frac{\text{mL}}{500 \text{mgbacteriocina}} \right] = \frac{1.066 UA}{\text{mgbacteriocina}}$$

$$UE = \left[\frac{1.066 UA}{\text{mgbacteriocina}} \right] \left[\frac{1 \text{mgbacteriocina}}{0.023 \mu\text{gproteína}} \right] = \frac{46.34 UA}{\mu\text{gproteína}}$$

UA = unidades arbitrarias

UE = unidades arbitrarias específicas = UA/μg proteína

Actividad del extracto crudo de la bacteriocina = 1.066 UA / mg de bacteriocina o 46.34 UE.

Tabla 7. Cuantificación de proteína de la bacteriocina* por Bradford®

Determinación	1	2	3	Promedio
Lectura (μg/mL)	12	11	11	11.33±0.57

*La lectura se realizó a una longitud de onda de 595nm.

Tabla C1. Concentraciones fraccionales inhibitorias para *B. thermosphacta* y *E.coli* para la combinación de bacteriocina – lactato de sodio en agar TSA a_w 0.99 y pH 5.6

[mg/mL]	CFI <i>E.coli</i>	[mg/mL]	CFI <i>B.thermosphacta</i>
6.25 bacteriocina	0.5	6.25 bacteriocina	0.5
0.1 lactato	0.25	0.2 lactato	0.02
3.125 bacteriocina	0.25	3.125 bacteriocina	0.25
0.1 lactato	0.25	0.2 lactato	0.02

Tabla C2. Concentraciones fraccionales inhibitorias para *B.thermosphacta*, *E.coli* y *L.innocua* para la combinación de bacteriocina – sal cura en agar TSA a_w 0.99 y pH 5.6

[mg/mL]	CFI <i>E.coli</i>	CFI <i>B.thermosphacta</i>	CFI <i>Listeria</i>
6.25 bacteriocina	0.5	0.5	0.5
0.05 sal cura	0.25	0.25	0.25
3.125 bacteriocina	0.25	0.25	0.25
0.05 sal cura	0.25	0.25	0.25

Tabla C3. Concentraciones fraccionales inhibitorias para *B.thermosphacta*, *E.coli* y *L.innocua* para la combinación de bacteriocina – benzoato de sodio en agar TSA a_w 0.99 y pH 5.6

[mg/mL]	CFI <i>E.coli</i>	CFI <i>B.thermosphacta</i>	[mg/mL]	CFI <i>Listeria</i>
6.25 bacteriocina	0.5	0.5	6.25 bacteriocina	0.5
0.1 benzoato de sodio	0.25	0.25	0.1 benzoato de sodio	0.25
3.125 bacteriocina		0.25	3.125 bacteriocina	0.25
0.1 benzoato de sodio		0.25	0.2 benzoato de sodio	0.5

Tabla C4. Concentraciones fraccionales inhibitorias para *B.thermosphacta*, *E.coli* y *L.innocua* para la combinación de bacteriocina – sorbato de potasio en agar TSA a_w 0.99 y pH 5.6

[mg/mL]	CFI <i>E.coli</i>	[mg/mL]	CFI <i>B.thermosphacta</i>	CFI <i>Listeria</i>
6.25 bacteriocina	0.5	6.25 bacteriocina	0.5	0.5
0.2 sorbato de potasio	0.5	0.1 sorbato de potasio	0.25	0.25
3.125 bacteriocina	0.25	3.125 bacteriocina	0.25	
0.2 sorbato de potasio	0.5	0.1 sorbato de potasio	0.25	

Construcción de isobogramas

Un método para saber el tipo de interacción que siguen los antimicrobianos es el uso de isobogramas. Estos diagramas se realizan usando los datos de CMI (concentraciones mínimas inhibitorias) directamente o calculando las CFIs (Concentraciones Fraccionarias Inhibitorias). Si los dos compuestos son aditivos, el resultado es una línea recta entre los ejes X y Y. Sinergismo indica una desviación a la izquierda de la línea de aditividad, antagónico es una desviación de la curva hacia la derecha de la línea de aditividad.

El termino tablero de ajedrez se refiere a diluciones múltiples de dos antimicrobianos evaluados en concentraciones iguales por arriba y por debajo de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). Las concentraciones evaluadas por lo general se encuentran en un rango de 4-5 diluciones por debajo de la CMI, la CMI y el doble de la CMI (si se desea evaluar el antagonismo) (Eliopoulos y Moellering, 1991).

Los isobogramas son representaciones gráficas en un eje de coordenadas de concentraciones equiefectivas de dos o más antimicrobianos. En cada uno de los ejes se representa la CMI equiefectiva de cada uno de los antimicrobianos que se estudian (Da) y (Db) respectivamente. Estos dos puntos se unen mediante una línea (isobolo) que también se conoce como línea de aditividad o de no interacción. A continuación se representa el valor de

concentración de la combinación de ambos (d_a, d_b) que es equiefectiva con las dosis individuales de los antimicrobianos (Fig.1).

Cuando los agentes no interactúan (interacción cero) los puntos que representan las concentraciones isoeffectivas de la combinación están situados sobre el isobolo formando una línea recta (Berembaum, 1989).

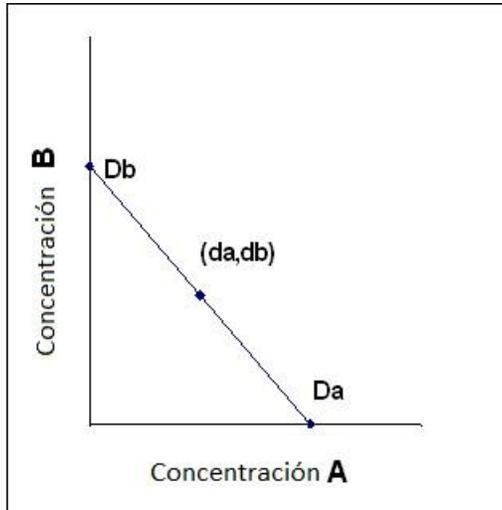


Fig 1. Isoblograma de interacción cero de una combinación de 2 sustancias A y B

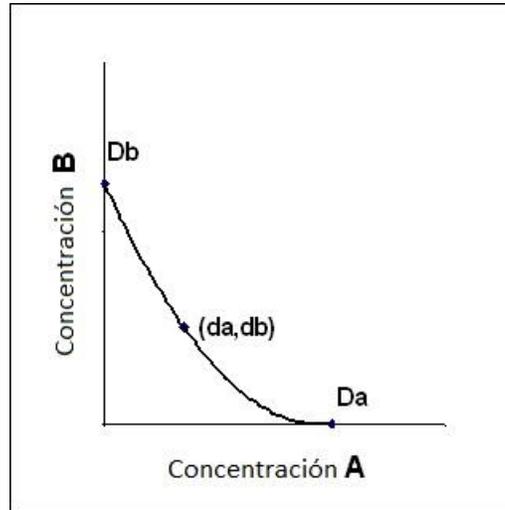


Fig 2. Isoblograma de interacción sinérgica de una combinación de dos sustancias

Cada uno de los puntos de esta línea representa una combinación de A y B en la que las sustancias se comportan de modo aditivo es decir, no se produce interacción. La ecuación que la define es la siguiente:

Ecuación 1.- $d_a/D_a + d_b/D_b = 1$

Cuando la combinación es más efectiva de lo que se espera se requieren menos cantidades de d_a o d_b para producir el mismo efecto, mientras que D_a y D_b permanecen inalteradas, con lo que la ecuación se transforma en una desigualdad y define un isoblograma cóncavo (sinergia) (Fig. 2).

Ecuación 2.- $d_a/D_a + d_b/D_b < 1$

Por otra parte, cuando los agentes en combinación son menos efectivos que lo esperado d_a y/o d_b deberían ser incrementados con el fin de obtener el mismo efecto (antagonismo). La ecuación en este caso describe un isobolo convexo (Fig. 3).

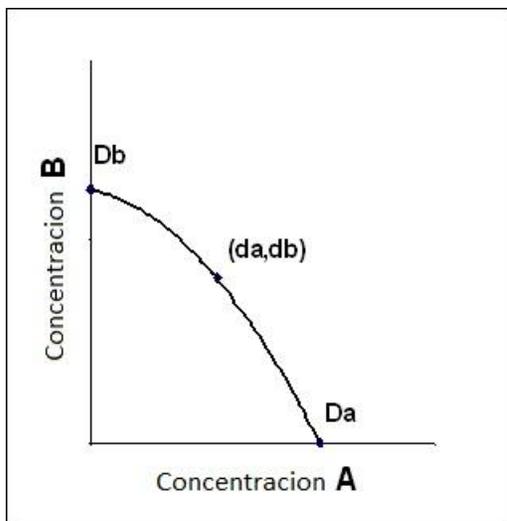


Figura 3.- Isoblograma de interacción antagonica de una combinación de dos sustancias.

Ecuación 3.- $da/Da + db/Db > 1$

La solución de las ecuaciones 1-3 se define como índice de interacción el cual evalúa la divergencia entre las dosis de dos o más sustancias que producen un efecto en combinación y aquellas dosis que sería esperado que produjeran el mismo efecto según las curvas dosis-

respuesta de los agentes individuales. Es un factor matemático que indica el grado de reducción de la dosis de la combinación, con respecto a la dosis de ambos fármacos que teóricamente es necesaria para producir el mismo efecto. Cuando el resultado de la ecuación es igual a uno no existe interacción y los efectos son aditivos. Cuando el índice de interacción es mayor que uno se produce una interacción de tipo antagonico e inversamente, cuando es menor que uno se produce sinergia.

- $da/Da + db/Db < 1$ Sinergia
- $da/Da + db/Db = 1$ Aditividad
- $da/Da + db/Db > 1$ Antagonismo

Los primeros isoblogramas fueron publicados a finales del siglo XIX y presentaban una interacción de tipo antagonico para el efecto entre atropina y fisostigmina (Fraser, 1870; 1872). No existen indicios de la siguiente publicación de isoblogramas hasta la aparición en 1927 de una serie de trabajos entre barbitúricos y analgésicos (Käer y Loewe, 1926). A pesar de un incremento en el número de publicaciones utilizando isoblogramas para establecer interacciones, tuvieron que transcurrir 20 años más para que el método se generalizase. Aunque el concepto teórico en los que estaban basados era el correcto, las consideraciones estadísticas implicadas en la interpretación de los resultados, permanecía sin especificar. Unos años más tarde, este aspecto se convirtió en el principal punto de interés, dando como resultado uno de los métodos estadísticos más utilizado en el análisis de interacciones con isoblogramas que consiste en el cálculo de las concentraciones teóricamente aditivas para cada nivel de efecto y su comparación estadística con las concentraciones que producen el mismo efecto obtenidas experimentalmente (Tallarida *et al.*, 1989, 1997).

Anexo D – Análisis estadístico.

Tabla D1. Análisis de varianza del componente L* de color.

Source		Sum of	Mean		Prob
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level
A: I3	11	83.61288	7.601171	3.42	0.000418*
S(A)	108	239.7017	2.21946		
Total (Adjusted)	119	323.3146			
Total	120				

* Term significant at alpha = 0.05

Tabla D2. Prueba de Duncan del componente L* de color.

Group	Count	Mean	Different From Groups
TBI6	10	70.372	TSN, TLBI6, TLBI3, TNBI3, TNI
TS	10	70.702	TNI
TBI3	10	71.004	
TSI	10	71.252	
TNBI6	10	71.915	
TLI	10	72.152	
TSL	10	72.325	
TSN	10	72.531	TBI6
TLBI6	10	72.545	TBI6
TLBI3	10	72.671	TBI6
TNBI3	10	72.673	TBI6
TNI	10	72.961	TBI6, TS

Tabla D3. Análisis de varianza del componente a* de color.

Source		Sum of	Mean		Prob
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level
A: I3	11	152.1935	13.83577	23.68	0.000000*
S(A)	108	63.09161	0.5841815		
Total (Adjusted)	119	215.2851			
Total	120				

* Term significant at alpha = 0.05

Tabla D4. Prueba de Duncan del componente a* de color.

Group	Count	Mean	Different From Groups
TBI3	10	3.109	TNBI3, TNBI6, TNI, TSN
TLBI6	10	3.207	TNBI3, TNBI6, TNI, TSN
TSL	10	3.328	TNBI3, TNBI6, TNI, TSN
TBI6	10	3.34	TNBI3, TNBI6, TNI, TSN
TLI	10	3.364	TNBI3, TNBI6, TNI, TSN
TSI	10	3.514	TNBI3, TNBI6, TNI, TSN
TLBI3	10	3.867	TNBI3, TNBI6, TNI, TSN
TS	10	4.042	TNBI3, TNBI6, TNI, TSN
TNBI3	10	5	TBI3, TLBI6, TSL, TBI6, TLI, TSI, TLBI3, TS, TNBI6, TNBI6, TNI, TSN
TNBI6	10	5.835	TBI3, TLBI6, TSL, TBI6, TLI, TSI, TLBI3, TS, TNBI3
TNI	10	6.022	TBI3, TLBI6, TSL, TBI6, TLI, TSI, TLBI3, TS, TNBI3
TSN	10	6.101	TBI3, TLBI6, TSL, TBI6, TLI, TSI, TLBI3, TS, TNBI3

Tabla D5. Análisis de varianza del componente b* de color.

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level
A: I3	11	216.8696	19.71542	6.71	0.000000*
S(A)	108	317.1136	2.936237		
Total (Adjusted)	119	533.9832			
Total	120				

* Term significant at alpha = 0.05

Tabla D6. Prueba de Duncan del componente b* de color.

Group	Count	Mean	Different From Groups
TSN	10	13.499	TLBI3, TLI, TS, TSL, TLBI6, TSI, TBI3 TBI6
TNI	10	13.788	TLBI3, TLI, TS, TSL, TLBI6, TSI, TBI3 TBI6
TNBI6	10	14.748	TBI3, TBI6
TNBI3	10	14.792	TLBI3, TBI3, TBI6
TLBI3	10	16.372	TSN, TNI, TNBI3
TLI	10	16.469	TSN, TNI
TS	10	16.565	TSN, TNI
TSL	10	16.807	TSN, TNI
TLBI6	10	16.833	TSN, TNI
TSI	10	16.971	TSN, TNI
TBI3	10	17.264	TSN, TNI, TNBI6, TNBI3
TBI6	10	17.718	TSN, TNI, TNBI6, TNBI3

Tabla D7. Análisis de varianza del componente Chroma de color.

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level
A: I3	11	111.5972	10.1452	4.14	0.000043*
S(A)	108	264.7097	2.451016		
Total (Adjusted)	119	376.3069			
Total	120				

* Term significant at alpha = 0.05

Tabla D8. Prueba de Duncan del componente Chroma de color.

Group	Count	Mean	Different From Groups
TSN	10	14.85682	TLI, TLBI3, TS, TSL, TLBI6, TSI, TBI3 TBI6
TNI	10	15.09317	TSI, TBI3, TBI6
TNBI3	10	15.67868	TBI6
TNBI6	10	15.88003	
TLI	10	16.81383	TSN
TLBI3	10	16.9027	TSN
TS	10	17.11585	TSN
TSL	10	17.13454	TSN
TLBI6	10	17.14567	TSN
TSI	10	17.34414	TSN, TNI
TBI3	10	17.54345	TSN, TNI
TBI6	10	18.03611	TSN, TNI, TNBI3

Tabla D9. Análisis de varianza del componente Hue de color.

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level
A: I3	11	3314.324	301.3022	21.42	0.000000*
S(A)	108	1519.269	14.06731		
Total (Adjusted)	119	4833.593			
Total	120				

* Term significant at alpha = 0.05

Tabla D10. Prueba de Duncan del componente Hue de color.

Group	Count	Mean	Different From Groups
TSN	10	65.37787	TNBI3, TS, TLBI3, TSI, TLI, TSL, TLBI6, TNBI6, TNBI3
TNI	10	66.06637	TNBI3, TS, TLBI3, TSI, TLI, TSL, TLBI6, TBI6, TBI3
TNBI6	10	68.29662	TS, TLBI3, TSI, TLI, TSL, TLBI6, TBI6, TNBI3
TNBI3	10	70.84583	TSN, TNI, TS, TLBI3, TSI, TLI, TSL, TLBI6, TBI6, TBI3
TS	10	75.85374	TSN, TNI, TNBI6, TNBI3
TLBI3	10	76.24554	TSN, TNI, TNBI6, TNBI3
TSI	10	78.17918	TSN, TNI, TNBI6, TNBI3
TLI	10	78.37596	TSN, TNI, TNBI6, TNBI3
TSL	10	78.80268	TSN, TNI, TNBI6, TNBI3
TLBI6	10	79.1167	TSN, TNI, TNBI6, TNBI3
TBI6	10	79.42352	TSN, TNI, TNBI6, TNBI3
TBI3	10	79.81319	TSN, TNI, TNBI6, TNBI3