



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**EFFECTO DE UN EXTRACTO DE SEMILLA DE CÍTRICOS  
EN LA CALIDAD SANITARIA DE REBANADAS DE  
JAMÓN DE CARNE DE CONEJO.**

# **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERA EN ALIMENTOS**

**PRESENTAN:**

**OLIVIA YANET RODRIGUEZ CARMONA**

**SILVIA IVETTE SAMPEDRO PEREZ**

**ASESORA: DRA. ADRIANA LLORENTE BOUSQUETS**

**COASESOR: M. EN P. JORGE LUIS RICO PEREZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX. 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

**DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE**



**ATN:L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Efecto de un extracto de semilla de cítricos en la calidad sanitaria de rebana-  
das de jamón de carne de conejo

Que presenta la pasante Olivia Yanet Rodríguez Carmona

Con número de cuenta: 407056804 para obtener el título de:

Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlan Izcalli, Mex. a 11 de mayo de 2011

**PRESIDENTE** Dra. Clara Ines Alvarez Manrique

**VOCAL** Dra. Adriana Llorente Bousquets

**SECRETARIO** M.C. María Guadalupe Amaya León

**1er SUPLENTE** I.A. Ana María Soto Bautista

**2º SUPLENTE** M.C. Julieta González Sánchez

*Clara Ines Alvarez Manrique*  
*Adriana Llorente Bousquets*  
*Maria Guadalupe Amaya Leon*  
*Ana Maria Soto Bautista*  
*Julieta Gonzalez Sanchez*



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN  
 PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
 Jefa del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Efecto de un extracto de semilla de cítricos en la calidad sanitaria de rebanadas de jamón de carne de conejo

Que presenta la pasante Silvia Ivette Sampedro Pérez

Con número de cuenta: 407016778 para obtener el título de:

Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlan Izcalli, Mex. a 11 de mayo de 2011

PRESIDENTE Dra. Clara Ines Alvarez Manrique

*Clara Ines Alvarez M.*

VOCAL Dra. Adriana Llorente Bousquets

*Adriana Llorente B.*

SECRETARIO M.C. María Guadalupe Amaya León

*M.C. María Guadalupe Amaya León*

1er SUPLENTE I.A. Ana María Soto Bautista

*I.A. Ana María Soto Bautista*

2º SUPLENTE M.C. Julieta González Sánchez

*M.C. Julieta González Sánchez*

Este trabajo de tesis pertenece al proyecto **PAPIME PE202010** “Taller de Procesos Tecnológicos y Control de Calidad de Productos Cárnicos”

Esta tesis forma parte de las cátedras impartidas en el Taller Multidisciplinario de Ingeniería en Alimentos: Procesos Tecnológicos de Productos Cárnicos, del plan de estudios 2004 de la carrera de Ingeniería en Alimentos.

El trabajo fue desarrollado en su totalidad, en el Laboratorio 7 de Bioconservación, ubicado en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la F.E.S. Cuautitlán.

*Silvia Ivette*

*No te rindas, por favor no cedas, aunque el frío queme, aunque el miedo muerda, aunque el sol se esconda, y se calle el viento, aún hay fuego en tu alma, aún hay vida en tus sueños. Porque la vida es tuya y tuyo también el deseo, porque cada día es un comienzo nuevo, porque esta es la hora y el mejor momento.*

**Mario Benedetti**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** que al ser la máxima casa de estudios me guió hacia la excelencia y en conjunto con la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** me formó como una profesional honorable y orgullosa de la Ingeniería en Alimentos.

A mi **papá** que más que un padre siempre fue cómplice de mis travesuras; por estar siempre conmigo; por heredarme su fortaleza para superar adversidades, crecer y ser mejor día a día; por compartirme sus ganas de vivir y disfrutar la vida con alegría.

A mi **mamá** por darme la vida y estar conmigo, como madre y amiga, en todos los momentos importantes que he tenido a través de ella; porque a su lado formé el carácter y personalidad que hoy me definen y me permiten abrir los caminos para alcanzar mis metas.

A mi hermana **Araceli** que siempre me ha apoyado y brindado su cariño; por enseñarme que la madurez no se mide a nivel intelectual, sino con el corazón; por ponerme los pies en la tierra con sus consejos y por ser un ejemplo a seguir ante todos los desafíos.

A mi hermana **Idory** por impulsar mis habilidades y destrezas, por apoyarme, quererme y respetarme; por estar a mi lado durante las etapas más difíciles de mi desarrollo y por enseñarme a ser una mujer independiente y fuerte como ella.

A **Yael** que me dio el honor de ser tía, pero más que un sobrino se convirtió en un hermanito, porque a través de sus juegos me ayudó a conservar esa niña que llevo dentro y a no perder la nobleza de mi corazón.

A **Kiran** mi sobrino, por contagiarme su energía, su sencillez y su habilidad por encontrar respuestas rápidas, sencillas y efectivas ante las situaciones de la vida; por darme la oportunidad de estar a su lado y de declararme su mamá adoptiva.

A mi cuñado **Marco** porque a través de los años se convirtió en un miembro de mi familia; porque siempre ha estado conmigo cuando lo he necesitado; por despertar mi espíritu aventurero con su compañía, por motivarme a ser más grande y por brindarme su gran afecto.

A **Diana, David y Olivia** porque la convivencia diaria hizo la estancia en la universidad la mejor de mis etapas; porque aparte de ser colegas, también son excelentes amigos que me demostraron su apoyo infinito en los buenos y malos momentos; por permitirme ser parte de su vida y poder caminar juntos para alcanzar un sueño.

A **Leo** porque aún sin ser Ingeniero en Alimentos padeciste la carrera como si fueras uno de ellos; por darle un cambio radical a mi vida y completar esa parte que me hacía falta para entender al mundo; por cuidarme, amarme tanto y por ser otro motivo para seguir viva y dar lo mejor que tengo.

## ¡¡LOS AMO!!

A **Olivia** porque me brindó la oportunidad de conocer a esa maravillosa persona que es; por compartirme su sencillez y su buen humor; por ser mi confidente y apoyo; por el desarrollo de este trabajo y la culminación de él como parte de un proyecto importante de mi vida.

A la **Dra. María Eugenia Ramírez Ortiz**, porque más que una profesora se convirtió en una amiga al compartirme sus enseñanzas y consejos, producto de su experiencia en el trabajo y en la vida; por su paciencia y guía a través de este tiempo...la quiero mucho.

A la **Dra. Adriana Llorente Bousquets** cuya invaluable dirección y generoso apoyo, hicieron posible la realización de este trabajo y el logro de una meta más a nivel profesional. Por ser una gran profesora, investigadora y ser humano, mi total estimación, admiración y respeto.

A la **Dra. Clara Inés Álvarez Manrique, M.C. María Guadalupe Amaya León, I.A. Ana María Soto Bautista y M.C. Julieta González Sánchez**, por las valiosas aportaciones que hicieron, durante su revisión, para la mejora de este trabajo.

A todas aquellas personas que coincidieron en mi camino y que de una u otra forma su influencia forma parte de mí y refleja lo que ahora soy.

*“Por mi raza hablará el espíritu”*

## **AGRADECIMIENTOS**

**Mamá.** Antes que todo, gracias por darme la vida, por cuidarme desde que estaba en tu vientre, que desde ahí me diste todo tu amor y cuidados. Gracias, por tus regaños, consejos y por creer en mí. Te agradezco por siempre estar pendiente de mi salud física y emocional. Te amo.

**Papá.** Simplemente para mí eres el mejor papá del mundo. Recuerdo cuando era pequeña y me llevabas en tus hombros, en esos momentos era la niña más feliz, ahora, el saber que estas a mi lado y me cuidas, me hacen sentir protegida. Gracias por tus desvelos y regaños oportunos. Te quiero mucho.

**Ale.** Aunque sólo nos parezcamos en el apellido jajajajaja, sabes que te quiero mucho, contigo he pasado la mayor parte de mi vida, hemos reído y llorado, pero siempre juntas. Admiro tu fortaleza y tenacidad, sigue así hermanita y serás la mejor médica.

**Abuelita Elo.** Q.E.P.D. Eres la persona que más anheló que llegara este momento, siempre me quisiste ver graduándome de la universidad, no te fue posible físicamente. Pero estoy segura, que desde el cielo has seguido mis logros académicos y personales, sabes que mi amor por ti es incondicional así como también se, que en estos momentos, estas orgullosa por este logro. Siempre estás en mi pensamiento abuelita.

**Esmeralda.** Cómplice y paño de lágrimas, pero sobre todo amiga, gracias por estar a mi lado cuando te he necesitado y cuando no, también. Has sido parte de esta aventura universitaria, te tocó escuchar de mis proyectos, exámenes, fiestas; las cuales, en su momento, fueron un tema de conversación para mí. Te quiero Esme.

**Laura.** Amiga, aprecio mucho tu sincera amistad, recuerdo un semestre, a mi parecer el más complicado de mi vida universitaria, tú me ayudaste en un proyecto, recuerdo habernos desvelado juntas para que saliera bien. Gracias por siempre ayudarme en todo momento. Te quiero amiga.

**Ileana.** Tu amistad es sinónimo de diversión, recuerdo que contigo he reído tanto hasta llegar a las lágrimas, eso es una garantía a tu lado, te quiero mucho amiga. También has estado conmigo en momentos difíciles, te quiero mucho.

**Ivette.** Amiga y compañera de tesis. Fue un placer haber compartido contigo mi vida en la FESC (personal y académicamente). Lo hemos logrado, ya está nuestra tesis, que con tanto amor, dedicación, sacrificios y desvelos hemos concluido. Valoro mucho tu amistad, sinceramente, eres una persona increíble, te quiero mucho.

**Diana.** Fue muy grato haber compartido contigo mi aprendizaje y estancia en la FESC, tenemos muchas anécdotas que me vienen a la mente y evocan momentos de felicidad. Te quiero amiga, sigue como hasta ahora, siempre adelante.



**David.** Para mí “chino cochino”, hemos compartido muchos momentos gratos, los cuales siempre recordaré. Te agradezco tus consejos, risas, enseñanzas y regaños; pero sobre todo, gracias por constantemente demostrarme que cuento contigo. Admiro tu tenacidad y garra por alcanzar tus objetivos. Te quiero mucho.

**Daniel.** Sabes que tienes un lugar especial en mi vida, ya que, a pesar de que no estudiamos en la misma universidad, desde la preparatoria hemos estado juntos. Como te lo he dicho, tienes el don de hacerme reír y enojar en un instante. Gracias por tu sinceridad y por impulsarme a ser una mejor persona cada día. Estoy orgullosa de ti. Ahora comparto contigo esta realidad, mi tesis. Te quiero mucho.

**Dra. Maru.** La FESC me ha permitido ser su alumna, pero la vida me regaló una amiga; aprecio mucho sus consejos y enseñanzas, tanto en mi vida personal como académica. Gracias por las oportunidades profesionales. La admiro y sabe que la quiero mucho.

**Mariela.** Gracias por tu amistad, eres una persona noble, en la cual siempre tuve confianza de apoyarme cuando lo necesité. Gracias por todo amiga, te quiero.

**Dalia.** Aún recuerdo el primer día en la FESC cuando nos conocimos, éramos unas completas desconocidas, ahora me alegra saber que somos amigas; hemos compartido muchas experiencias, desde momentos de euforia como lo es un concierto hasta momentos de estrés como un examen. Te quiero Dalia.

**Dra. Llorente.** Gracias por las facilidades materiales y humanas para la realización de esta tesis, e indirectamente, por ser partícipe de lograr mi más grande anhelo, ser una Ingeniera en Alimentos de la FESC.

**A ti, FES Cuautitlán.** Es un honor decir que soy universitaria, honraré tus colores, seguiré gritando con euforia y amor; el “goya” que siempre me acompañó y me hizo estremecer. Gracias FESC, por permitirme crecer y formarme como una profesionista, por brindarme la oportunidad de conocer a personas maravillosas que me acompañaron en mi vida universitaria.

**Dra. Clara Inés Álvarez Manrique, M.C. María Guadalupe Amaya León, I.A. Ana María Soto Bautista y M.C. Julieta González Sánchez,** gracias por la dedicación y tiempo brindado para hacer de este un mejor trabajo.

Finalmente, y no por eso menos importante, GRACIAS VIRGEN DE JUQUILA, porque sé que junto con mi abuelita Elo, guías mi camino y me proteges siempre. Te amo.

## ABREVIATURAS

<b>ESC</b>	<b>Extracto de Semilla de Cítricos</b>
<b>BAL</b>	<b>Bacterias ácido lácticas</b>
<b>NOM</b>	<b>Norma Oficial Mexicana</b>
<b>pH</b>	<b>Potencial de hidrógeno</b>
<b>Aw</b>	<b>Actividad de agua</b>
<b>SSA</b>	<b>Secretaría de Salud</b>
<b>SCFI</b>	<b>Secretaría de Comercio y Fomento Industrial</b>
<b>cm</b>	<b>Centímetros</b>
<b>°C</b>	<b>grados centígrados</b>
<b>h</b>	<b>Horas</b>
<b>RPM</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>kg</b>	<b>kilogramo</b>
<b>FDA</b>	<b>Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)</b>
<b>CFR</b>	<b>Código Federal de Regulaciones (Code of Federal Regulations)</b>
<b>MAP</b>	<b>Envasado bajo atmósfera modificada (modified atmosphere packaging)</b>
<b>UFC</b>	<b>Unidades formadoras de colonias</b>
<b>ml</b>	<b>Mililitros</b>
<b>mm</b>	<b>Milímetros</b>
<b>MRS</b>	<b>Man Rogosa y Sharpe</b>
<b>RVBA</b>	<b>Rojo Violeta Bilis-Lactosa</b>
<b>μL</b>	<b>Microlitros</b>
<b>L</b>	<b>Litro</b>
<b>std</b>	<b>Estándar</b>
<b>ppm</b>	<b>Partes por millón</b>
<b>ANOVA</b>	<b>Análisis de varianza</b>
<b>ROS</b>	<b>Especies de Oxígeno Reactivo (Reactive Oxygen Species)</b>

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ii
RESUMEN .....	iv
INTRODUCCIÓN .....	v
CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO .....	1
1.1 ANTECEDENTES DE LA CARNE .....	2
1.2 PROCESAMIENTO PRIMARIO DE LA CARNE .....	3
1.2.1 CARNE DE CONEJO .....	4
1.3 PRODUCTOS CÁRNICOS .....	5
1.3.1 PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS .....	5
1.3.1.1 JAMÓN O JAMÓN DE PIERNA .....	5
1.3.1.2 JAMÓN DE CARNE DE CONEJO .....	5
1.3.1.2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ELABORACIÓN DE JAMÓN DE CARNE DE CONEJO .....	5
1.4 MICROORGANISMOS IMPORTANTES EN LA MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS .....	8
1.4.1 MOHOS .....	8
1.4.1.1. CARACTERES MORFOLÓGICOS .....	8
1.4.1.2 CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN .....	9
1.4.2 LEVADURAS Y HONGOS .....	10
1.4.2.1 CARACTERES MORFOLÓGICOS .....	10
1.4.2.2 PROPIEDADES FISIOLÓGICAS .....	10
1.4.3 BACTERIAS .....	11
1.4.3.1 CARACTERES MORFOLÓGICOS .....	11
1.4.3.2 CARACTERES FISIOLÓGICOS .....	12
1.4.3.2.1 COLIFORMES Y GRUPO DE COLIFORMES FECALES .....	12
1.4.3.2.2 MESÓFILOS AEROBIOS .....	13
1.4.3.2.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS .....	13
1.5 MICROBIOLOGÍA DE LA CARNE Y DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS .....	13
1.5.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS EN LA CARNE .....	16
1.5.1.1 FACTORES INTRÍNSECOS AL ALIMENTO .....	16
1.5.1.1.1 COMPOSICIÓN DEL ALIMENTO .....	17

1.5.1.1.2	pH .....	17
1.5.1.1.3	ACTIVIDAD DE AGUA (A <sub>w</sub> ).....	17
1.5.1.1.4	TEMPERATURA DEL ALIMENTO .....	18
1.5.1.2	FACTORES EXTRÍNSECOS DE LOS ALIMENTOS.....	19
1.5.1.2.1	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO .....	19
1.5.1.2.2	ATMÓSFERA GASEOSA.....	19
1.5.1.2.3	LUZ.....	20
1.5.1.3	BIOPELÍCULAS .....	21
1.6	SUSTANCIAS USADAS PARA CONTROLAR LA CALIDAD SANITARIA DE LOS ALIMENTOS .....	21
1.6.1	ÁCIDOS ORGÁNICOS .....	22
1.6.2	NITRITOS Y NITRATOS .....	23
1.7	BIOCONSERVACIÓN .....	23
1.7.1	ANTIMICROBIANOS NATURALES .....	24
1.7.1.1	COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	25
1.7.1.2	MECANISMO DE ACCIÓN .....	25
1.7.1.3	FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	27
1.7.1.4	EXTRACTO DE SEMILLAS DE CITRICOS.....	27
1.7.2	LEGISLACIÓN NACIONAL E INTERNACIONAL.....	28
	JUSTIFICACIÓN .....	29
	HIPÓTESIS .....	30
	OBJETIVOS .....	30
	OBJETIVO GENERAL.....	30
	OBJETIVO PARTICULARES .....	30
	CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	31
2.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.1.1	PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES CON ANTIMICROBIANO (EXTRACTO DE SEMILLA DE CÍTRICOS) .....	32
2.1.2	REBANADO DE JAMÓN DE CARNE DE CONEJO .....	32
2.1.3	ENVASADO DE REBANADAS DE JAMÓN DE CARNE DE CONEJO .....	32
2.1.4	MÉTODO PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO .....	33
2.1.4.1	MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE BAL.....	33
2.1.4.2	PREPARACIÓN DE AGUA PEPTONADA .....	36
2.1.4.3	PREPARACIÓN DE AGAR PARA DETERMINAR COLIFORMES TOTALES EN PLACA .....	36
2.1.4.4	PREPARACIÓN DE AGAR PARA DETERMINAR CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.....	36

2.1.4.5	ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL .....	37
2.1.4.6	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	37
2.1.4.7	SEMBRADO EN SUPERFICIE .....	37
2.1.4.8	SEMBRADO EN PROFUNDIDAD .....	38
2.1.4.9	CONTEO DE MICROORGANISMOS .....	40
2.1.4.10	MÉTODOS RÁPIDOS PARA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, <i>E. coli</i> Y CUENTA TOTAL .....	41
2.1.4.11	EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA SUPERFICIE DE LA REBANADORA .....	42
2.1.5	MEDICIÓN DE pH .....	46
2.1.6	EVALUACIÓN DE COLOR .....	46
2.1.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	47
	CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	48
3.1	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO .....	49
3.1.1	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, MESÓFILOS AEROBIOS Y BAL EN MATERIA PRIMA (NORMA Y MÉTODOS RÁPIDOS) .....	49
3.1.2	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES EN REBANADAS DE JAMÓN DE CARNE DE CONEJO (NORMA Y MÉTODOS RÁPIDOS) ..	50
3.1.3	DETERMINACIÓN DE MESÓFILOS AEROBIOS EN REBANADAS DE JAMÓN DE CARNE DE CONEJO (NORMA Y MÉTODOS RÁPIDOS) .....	54
3.1.4	DETERMINACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS .....	56
3.1.5	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y MESÓFILOS AEROBIOS EN EQUIPO DE REBANADO (NORMA Y MÉTODOS RÁPIDOS) .....	58
3.1.6	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y MESÓFILOS AEROBIOS EN AGUA CON DETERGENTE PARA LAVADO (NORMA Y MÉTODOS RÁPIDOS) .....	60
3.2	MEDICIÓN DE pH .....	61
3.2.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE pH .....	62
3.3	EVALUACIÓN DE COLOR .....	64
3.3.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE COLOR .....	65
3.4	RESULTADOS DE LA TINCIÓN DE GRAM DE LA DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES Y MESÓFILOS AEROBIOS	67
	CONCLUSIONES .....	69
	REFERENCIAS .....	70
	ANEXOS .....	75

## ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos aislados con frecuencia en las carnes.....	14
Tabla 2. Factores intrínsecos y extrínsecos que afectan el crecimiento microbiano en carnes curadas y cocidas.....	16
Tabla 3. Valores mínimos aproximados de $A_w$ para el crecimiento de microorganismos importantes en alimentos.....	18
Tabla 4. Límites aproximados de temperatura para el crecimiento de microorganismos.....	19
Tabla 5. Clasificación de los microorganismos según sus necesidades de $O_2$ .....	20
Tabla 6. Antimicrobianos aprobados por la FDA-USDA en el CFR 21 para su uso en alimentos.....	22
Tabla 7. Compuestos volátiles típicos que se encuentran en los cítricos.....	25
Tabla 8. Posibles sitios blanco en las células microbianas.....	27
Tabla 9. Tratamientos y variables aplicadas en la experimentación.....	33
Tabla 10. Cálculo de los valores de la cuenta en placa de coliformes totales en materia prima (ensayo por duplicado).....	49
Tabla 11. Cálculo de los valores de la cuenta en placa de mesófilos aerobios en materia prima (ensayo por duplicado).....	49
Tabla 12. Cálculo de los valores de bacterias ácido lácticas en materia prima (ensayo por duplicado).....	49
Tabla 13. Muestra el número total de UFC/g obtenidas en la cuenta en placa de BAL en rebanadas de jamón envasado con vacío (ensayo por duplicado).....	57
Tabla 14. Valores de pH correspondientes a cada uno de los tratamientos, obtenidos durante las pruebas en el día 0, 1 y 7.....	61
Tabla 15. Análisis de varianza correspondiente a pH.....	62
Tabla 16. Valores promedios de colorimetría (L, a y b) en rebanadas de jamón de carne de conejo.....	64
Tabla 17. Análisis de varianza correspondiente a color.....	65

## ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de bloques ilustrado del proceso de elaboración de jamón de carne de conejo.....	7
Figura 2. Influencia de diferentes factores sobre la eficacia de la producción de bacteriocinas <i>in situ</i> para la bioconservación. ....	24
Figura 3. Mecanismo de acción, de los antimicrobianos naturales y sus componentes, en una célula bacteriana. ....	26
Figura 4. Procedimiento para el rebanado, aplicación del extracto de semillas de cítricos y envasado de las rebanadas de jamón de carne de conejo.....	34
Figura 5. Secuencia para la preparación de medio por el método de superficie.....	35
Figura 6. Sistema de anaerobiosis Gas Pack™ .....	37
Figura 7. Secuencia para determinar coliformes totales y mesófilos aerobios por el método de profundidad.....	39
Figura 8. Colonias de coliformes totales en medio RVBA.....	40
Figura 9. Colonias de mesófilos aeróbios en medio triptona extracto de levadura.....	40
Figura 10. Colonias de bacterias ácido lácticas en medio MRS.....	41
Figura 11. Desarrollo de la tinción de Gram para los microorganismos obtenidos en las pruebas microbiológicas .....	43
Figura 12. Secuencia de uso para métodos rápidos (SimPlate™).....	44
Figura 13. Procedimiento para el muestreo de la rebanadora.....	45
Figura 14. Prueba de pH en rebanadas de jamón de carne de conejo .....	46
Figura 15. Prueba de colorimetría en rebanadas de jamón de carne de conejo.....	47
Figura 16. UFC/g de Coliformes totales en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con vacío.....	50
Figura 17. UFC/g de Coliformes totales obtenidas por Simplate™ en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con vacío.....	51
Figura 18. UFC/g de Coliformes totales en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío.....	52
Figura 19. UFC/g de Coliformes totales obtenidas por Simplate™ en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío.....	53
Figura 20. Comparación de tratamientos para coliformes totales.....	53
Figura 21. UFC/g de Coliformes totales en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío.....	54

Figura 22. UFC/g de cuenta total obtenidas por Simplate <sup>TM</sup> en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío. ....	55
Figura 23. UFC/g de coliformes totales presentes en la rebanadora antes y después del lavado y desinfección. ....	58
Figura 24. UFC/g de mesófilos aerobios presentes en la rebanadora antes y después del lavado y desinfección. ....	58
Figura 25. Efecto del tiempo y concentración en el pH de rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con vacío. ....	63
Figura 26. Efecto del tiempo y concentración en el pH de rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío. ....	63
Figura 27. Efecto del tiempo y concentración en el color de rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con vacío. ....	66
Figura 28. Efecto del tiempo y concentración en el color de rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío. ....	66
Figura 29. A) Morfología colonial; B) Tinción de Gram de Coliformes totales (sin vacío). ....	68
Figura 30. A) Morfología colonial; B) Tinción de Gram de Coliformes totales (con vacío). ....	68
Figura 31. A) Morfología colonial; B) Tinción de Gram de Mesófilos Aerobios (sin vacío). ....	68



## RESUMEN

Los antimicrobianos naturales son compuestos con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos (incluyendo bacterias, virus y hongos); éstos constituyen cada vez una nueva forma de garantizar alimentos seguros, manteniendo inalterable la calidad del alimento. Sin embargo, no se conoce el efecto de un extracto de semilla de cítricos al utilizarlo dentro del envase de un embutido. Se seleccionó como modelo de estudio un embutido cárnico cuya fecha de caducidad estaba cercana a vencer. A partir de un lote de 2.555 kg de jamón de carne de conejo elaborado en el Taller de productos cárnicos de la FES Cuautitlán, se obtuvieron 48 rebanadas de 5mm de espesor y se les determinó la cantidad inicial de microorganismos coliformes totales, bacterias aerobias y ácido lácticas presentes. Durante la fase experimental, se emplearon 6 tratamientos con las rebanadas, los cuales se asignaron de la siguiente manera: el tratamiento 1 contenía 0% de ESC y envasado con vacío; el tratamiento 2 contenía 0% de ESC y envasado sin vacío; el tratamiento 3 contenía 0.01% de ESC y envasado con vacío; el tratamiento 4 contenía 0.01% de ESC y envasado sin vacío; el tratamiento 5 contenía 0.02% de ESC y envasado con vacío; y finalmente el tratamiento 6 contenía 0.02% de ESC y envasado sin vacío. Una vez envasados, todos los lotes se almacenaron en refrigeración a 4°C, se procedió a la toma de muestras y se realizaron las pruebas microbiológicas, para microorganismos coliformes totales, bacterias aerobias totales en las muestras envasadas sin vacío y bacterias ácido lácticas para las envasadas al vacío; en los días 0, 1 y 7. Así mismo, se realizaron pruebas de colorimetría con un colorímetro Minolta CR-300 y de determinación del pH con un potenciómetro OrionFiveStar. Los resultados obtenidos se analizaron en el programa estadístico (DesigExpert 8.0.4 y MiniTab 15) mediante un análisis de varianza (ANOVA), en el cual se incluyó un análisis factorial ( $p < 0.05$ ) para evaluar los cambios de UFC/g de microorganismos (coliformes totales, mesófilos aerobios y BAL), pH y color. El envasado al vacío combinado con 0.01% de antimicrobiano y almacenamiento refrigerado a 4°C, son las barreras y/o condiciones que mantuvieron la mejor calidad sanitaria de las rebanadas de jamón de carne de conejo; así mismo el uso de ESC no modificó significativamente las características del producto (pH y color).

## INTRODUCCIÓN

La carne es un producto altamente perecedero, el cual, a menos que sea correctamente procesado, empaquetado, almacenado y distribuido, puede descomponerse rápidamente debido al crecimiento de microorganismos y de este modo, constituir un riesgo a la salud del consumidor (McDonald y Sun, 1999). Astiasarán y Martínez en el 2000 establecen que la carne de conejo posee un contenido de proteínas de 20.8% (valor cercano a la de cerdo con 21.9% y pavo con 20.1%), es por ello que se puede utilizar para elaborar diversos productos, como por ejemplo el jamón cocido (NOM-213-SSA1-2002, NOM-158-SCFI-2003).

En dicho producto puede haber un crecimiento de diversos tipos de microorganismos debido a factores intrínsecos (pH, Aw, antimicrobiano y microbiota inicial) y extrínsecos (parámetros de procesamiento, almacenamiento, distribución y condiciones de mostrador y flora microbiana) (McDonald y Sun, 1999). Las bacterias aerobias y BAL (NOM-092-SSA1-1994; ICMSF, 1985) pueden estar presentes en el jamón; el recuento de estos nos permite estimar la flora total pero sin especificar la variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales. La prevalencia de microorganismos como bacterias aerobias, BAL y coliformes, en un alimento, provoca que la vida de anaquel sea corta (ICMSF, 1985); así mismo la calidad sanitaria del producto refleja las condiciones higiénicas de la materia prima y la forma en cómo fue manipulada durante la elaboración del producto (NOM-113-SSA1-1994). Es muy importante identificar los puntos de control necesarios, en la cadena de elaboración y suministro que permitirán garantizar la inocuidad de un producto alimenticio; por ejemplo la contaminación procedente de las manos de los operadores que manipulan y envasan los productos cárnicos después de procesados, deficientes prácticas de desinfección de instalaciones, el control inadecuado de las temperaturas de almacenamiento, el equipo contaminado (debido a deficiencias en la limpieza o desinfección), los utensilios para la elaboración de alimentos y la higiene en los puntos de venta (ICMSF, 1985) afectan la calidad sanitaria del producto y por ende al consumidor.

Dentro de los aspectos de tipo tecnológico, que pueden ser empleados para contrarrestar el efecto nocivo de la presencia de microorganismos (como los anteriormente indicados), puede señalarse, por ejemplo, la conservación a temperaturas bajas (refrigeración), misma que ha sido tradicionalmente aplicada para extender la vida de anaquel, pero que puede resultar insuficiente por sí sola. Si bien, la combinación de temperaturas bajas con un envasado al vacío (ausencia de aire) puede constituirse en una buena opción para retardar o detener la multiplicación de los microorganismos (Frazier, 2000). Varias investigaciones, en productos

cárnicos cocidos, han demostrado que atmósferas con ausencia de oxígeno aumentan la vida útil (Kotzekidou y Bloukas, 1996).

Por lo mencionado anteriormente, surge la necesidad de aplicar intervenciones adicionales naturales de conservación, como el uso de antimicrobianos que garanticen la inocuidad de los productos. En ese sentido, se ha encontrado, por ejemplo que el limón y la naranja dulce contienen compuestos como el linalol y el citral, los cuales presentan efectos antimicrobianos contra microorganismos de interés sanitario en alimentos, tales como *Campylobacter jejuni*, *E. coli*. O:157H:7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *S. aureus* (Fisher y Phillips, 2007). Así mismo, algunos estudios han demostrado que las bacterias Gram positivas son más sensibles a los aceites esenciales que las bacterias Gram negativas. De acuerdo con lo anterior, el objetivo de la presente investigación es el caracterizar el posible efecto benéfico del uso de extracto de semillas de cítricos (de toronja y naranja) en el control de coliformes totales, bacterias aerobias y BAL.

# **CAPÍTULO 1**

# **MARCO TEÓRICO**

## 1.1 ANTECEDENTES DE LA CARNE

La carne ha formado parte de la dieta humana desde la prehistoria y la aparición de la caza. Posteriormente, la cría de animales domésticos se convierte en una parte importante de la agricultura aunque la caza sigue teniendo importancia hoy en día en algunas sociedades.

La naturaleza perecedera de la carne, e inicialmente su alta estacionalidad llevó al desarrollo de los primeros métodos de conservación, como el secado y el curado. Más tarde, el costo y las demandas de una población creciente dieron lugar al desarrollo de productos, incluidos los embutidos y pasteles de carne, que permiten la utilización de todas las partes del animal (Varnam y Sutherland, 1995).

Antes la elaboración de productos cárnicos era exactamente un arte que se transmitía de generación en generación. Hoy, el desarrollo de nuevos productos y el mejorar los antiguos constituyen una ciencia.

En la última década, especialmente, se ha incrementado la demanda de nuevas tecnologías y nuevos productos a la industria procesadora de alimentos. Los patrones de consumo de alimentos han cambiado fuertemente en la sociedad actual. La disponibilidad de ciertos productos, los gustos del consumidor, los estilos de vida, el poder de compra, la presión de los medios de comunicación, la percepción de los consumidores sobre seguridad alimentaria – inocuidad, en relación con la presencia de contaminantes de diversa naturaleza-, son algunos de los factores que han influenciado ese cambio. Es notorio que los consumidores actuales desean alimentos que satisfagan sus percepciones de alta calidad y fácil preparación (Hui, 2006).

No sólo debe buscarse el mejorar la eficacia productiva de los alimentos, si no que si se pretende que los consuma el hombre debe conservarse su calidad (Forrest, 1979).

En consecuencia, la meta perseguida es triple: la producción *eficaz* de alimentos de gran *calidad* que sean además *aceptados* por la población a que van destinados (Forrest, 1979).

## 1.2 PROCESAMIENTO PRIMARIO DE LA CARNE

La carne se contamina por contacto con el pelo, piel, patas, contenido estomacal y entérico, fábrica y equipo de la misma, manos y ropas de los operarios, agua utilizada para el lavado de la canal y del equipo e, incluso, aire de las zonas de procesado y almacenamiento. El procesado primario de la carne consiste en el sacrificio, desollado y evisceración, refrigeración y despiece. La flora inicial viene determinada principalmente por la contaminación superficial ocurrida durante estas operaciones (ICMSF, 1983).

**Sacrificio.** La alteración bacteriana tisular profunda (“hueso hendido”) se ha atribuido a la multiplicación de bacterias intrínsecas procedentes del intestino; sin embargo, si se toman precauciones de asepsia, de tejidos de los animales sanos pueden obtenerse muchas muestras estériles, lo que indica que el número de microorganismos presentes en la masa tisular es normalmente muy pequeño, aproximadamente 1/10 a 100 por gramo. Las bacterias pueden llegar a la profundidad tisular con la corriente sanguínea, como consecuencia de la contaminación del cuchillo de degollar, pero la facilidad con que pueden obtenerse tejidos estériles de animales sacrificados en el matadero por el sistema corriente, indica que la contaminación por el sistema sanguíneo es pequeña (ICMSF, 1983).

**Preparación de la canal.** La principal y primera fuente de contaminación de la carne es la piel del animal que se está faenando y las de los animales próximos a él. Entre los microorganismos de este origen se incluye la flora normal de la piel (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, levaduras y mohos) así como entre otros de origen fecal y del suelo. La práctica de deshuesar la canal antes de que se enfríe (“deshuesado en caliente”) permite una refrigeración más rápida lo que implica una menor multiplicación bacteriana (ICMSF, 1983).

**Refrigeración.** El efecto de la refrigeración en la flora microbiana depende de varios factores; la refrigeración rápida a temperatura bajas con aire a gran velocidad y baja humedad puede reducir la carga bacteriana. En condiciones menos rigurosas puede tener lugar el crecimiento de los microorganismos psicrótrofos alterándose así la proporción de psicrótrofos/mesófilos. El tiempo que la canal permanece en la cámara de refrigeración puede tener más efecto en la población microbiana que la temperatura de refrigeración (ICMSF, 1983).

**Despiece y deshuesado.** La contaminación de la carne durante el despiece, deshuesado y envasado depende de las condiciones locales; durante estas operaciones la carne se manipula mucho, exponiéndose al aire nuevas superficies, lo que hace a la carne más sensible a la contaminación (ICMSF, 1983).

### 1.2.1 CARNE DE CONEJO

Conejo doméstico de acuerdo a la NMX-FF-105-SCFI-2005 se define como, animal doméstico (*Oryctolagus cuniculus*); es un mamífero que pertenece al orden *Lagomorphy* a la familia de los Lepóridos.

La Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO), considera que entre las principales razones por las que este cárnico se consume poco en México, destacan la falta de promoción, comercialización y diversos factores culturales.

Lo anterior se refleja en un desconocimiento de sus propiedades nutrimentales, pues la carne de conejo es adecuada para toda la familia dado su contenido de ácidos grasos poliinsaturados, proteínas, vitaminas y minerales. Astiasarán y Martínez en el 2000 establecen que la carne de conejo posee un contenido de proteínas de 20.8% (valor cercano a la de cerdo con 21.9% y pavo con 20.1%). También es superior en aporte de vitamina E (0.70 mg). Hay que recordar que esta vitamina es antioxidante y protege las membranas celulares del sistema nervioso, glóbulos rojos, células musculares y de sistema cardiovascular. Así mismo, el bajo nivel de grasas saturadas, escaso contenido de sodio y alto de potasio de la carne de conejo, la hacen apropiada para la dieta de personas con problemas cardiovasculares, hipertensión, colesterol o ácido úrico. En comparación con la carne de pollo, la de conejo tiene una proporción menor de ácidos grasos saturados y una mayor de ácidos grasos insaturados y de colesterol (Aguilar, 2005).

De acuerdo con la FAO, los conejos tienen propiedades únicas como alimento y para el comercio, por ejemplo:

- La carne es muy nutritiva, con poca grasa y colesterol, y es abundante en proteínas.
- Como los animales son herbívoros, no compiten con las personas por los alimentos, y se adaptan con facilidad a distintos medios.
- Para la crianza de conejos los costos de inversión y mano de obra son bajos, y los miembros más vulnerables de las familias pueden ocuparse de cuidarlos.
- Son muy productivos, porque tienen hasta 40 crías al año, en comparación con 0.8 del ganado vacuno y 1.4 del ovino (FAO, 1999).

## 1.3 PRODUCTOS CÁRNICOS

De acuerdo a la NOM-213-SSA1-2002 se definen como a los elaborados a partir de carne, vísceras, estructuras anatómicas, sangre o sus mezclas, provenientes de mamíferos o aves, que pueden someterse a ahumado, cocción, curación, desecación, maduración, salado, entre otros.

### 1.3.1 PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS

La NOM-213-SSA1-2002 los define como los elaborados con carne, vísceras, sangre o sus mezclas, curados o no, que son sometidos a proceso térmico. Pueden presentarse enteros, en cortes, emulsionados o troceados.

#### 1.3.1.1 JAMÓN O JAMÓN DE PIERNA

Conceptos que pueden ser utilizados indistintamente para denominar al producto alimenticio, elaborado exclusivamente con la carne de las piernas traseras del cerdo *Suisscrofadomesticus*, declarados aptos para el consumo humano por la autoridad responsable, de acuerdo a los criterios y especificaciones generales que se establecen en el cuerpo de la NOM-158-SCFI-2003.

#### 1.3.1.2 JAMÓN DE CARNE DE CONEJO

Se define como un producto alimenticio, elaborado exclusivamente con la carne de las piernas traseras y los lomos de la canal de conejo.

##### 1.3.1.2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ELABORACIÓN DE JAMÓN DE CARNE DE CONEJO

Para la elaboración de jamón de carne de conejo la materia prima principal son las piernas y los lomos de la canal de conejo. El porcentaje de pulpa extraído de la canal es de un 55 a un 60% y de esto sólo el 65% se destina a la elaboración de jamón.

##### ❖ Recepción de materia prima

Los bloques de pulpa se descongelan pasándolos de la cámara de congelación a la cámara de refrigeración por al menos 24h antes de ser procesadas; esto con el fin de reducir las mermas por descongelación. La temperatura de la pulpa no sobrepasará el rango de 2 a 4°C y el valor de pH se encontrará en 5.6 a 5.8.



#### ❖ **Acondicionamiento de la materia prima**

Los bloques serán cortados con cuchillos a manera de lonjas de unos 3cm de ancho.

#### ❖ **Tenderizado**

Las lonjas se hacen pasar por la máquina tenderizadora varias veces para favorecer la mezcla con las sales y la extracción de las proteínas solubles en sal. Este paso es crítico, ya que si no se realizó eficientemente la extracción de las fascias, será pobre la extracción de las proteínas debido a lo cerrado del músculo, aun pasándolo por la tenderizadora.

#### ❖ **Preparación de la salmuera**

Se prepara la salmuera con la mezcla de los siguientes ingredientes: cloruro sódico, nitrito y nitrato de potasio, fosfato, azúcar, glutamato monosódico y ácido ascórbico; la salmuera al ser adicionada a la carne debe tener una temperatura por debajo de los 4-5°C.

#### ❖ **Masajeo**

La absorción de la salmuera en la pulpa de la carne de conejo se acelera y mejora en gran medida por la acción mecánica. A la par de esta acción se da la extracción de la miosina, la cual favorecerá durante la cocción la acción ligante de la carne. El masajeo consiste en frotar suavemente la superficie de una carne con otra o sobre la superficie de la masajeadora, esto se realiza por al menos 24h con periodos de descanso, acción de vacío (0.8 bar) y una velocidad de 90 RPM a 4°C.

#### ❖ **Embutido**

El embutido se realiza mecánicamente en una embutidora Hollymatic con una boquilla de salida de 2.54cm.

#### ❖ **Tratamiento térmico**

El principal objetivo que se busca es el de eliminar la carga microbiana que está presente en el producto; además de modificar sus características sensoriales. El tratamiento térmico se realiza con fundas de cocimiento directo, éstas se sumergen en agua a 80°C para garantizar que el centro térmico de las piezas sea de 68°C y el tiempo de cocción va en función del peso (1h por kg).

#### ❖ **Enfriamiento**

Finalmente los jamones se enfrían con agua a 10°C durante 20 minutos; posteriormente se almacenan en refrigeración a 2°C (Pérez, 2010).

La Figura 1, muestra el diagrama de bloques con las imágenes y condiciones necesarias durante todo el proceso de elaboración del jamón de carne de conejo.



Figura 1. Diagrama de bloques ilustrado del proceso de elaboración de jamón de carne de conejo

Fuente: Pérez, 2010.

## 1.4 MICROORGANISMOS IMPORTANTES EN LA MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Los alimentos que consume el hombre, proceden básicamente de las plantas y animales o productos derivados de los mismos, resulta comprensible que dichos alimentos puedan contener microorganismos que interaccionen con ellos (Frazier, 2000). La alteración microbiana de los alimentos puede ser considerada simplemente como un intento por parte de la flora de los alimentos de llevar a cabo el que parece ser su principal papel en la naturaleza (Jay, 1996); sin embargo, simplemente desempeñando su función en la naturaleza, muchas veces pueden convertir a los alimentos en no aptos para el consumo humano. Los microorganismos pueden echar a perder un alimento porque se multiplican en él, porque utilizan nutrientes, porque producen modificaciones enzimáticas, y porque le confieren sabores desagradables mediante el desdoblamiento de determinadas sustancias o mediante la síntesis de nuevos compuestos. Con el fin de evitar esto, se reduce al mínimo el contacto entre los microorganismos y los alimentos (prevención de la contaminación) y también se elimina a los microorganismos que contienen, o por lo menos se adaptan las condiciones de su almacenamiento para evitar que en ellos se multipliquen los microorganismos (conservación).

### 1.4.1 MOHOS

El término moho se suele aplicar para designar a ciertos hongos filamentosos multicelulares cuyo crecimiento en la superficie de los alimentos se suele reconocer fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. La parte principal de su crecimiento suele tener un aspecto blanco, aunque puede tener colores distintos, color oscuro o color de humo (Frazier, 2000).

#### 1.4.1.1 CARACTERES MORFOLÓGICOS

La morfología de los mohos, es decir, su forma y su estructura, conceptuadas mediante sus observaciones macroscópicas y microscópicas, se utilizan para identificarlos y clasificarlos.

**Hifas y micelo.** El talo de los mohos está formado por una masa de filamentos ramificados y entrelazados llamados **hifas**, denominándose **micelo** al conjunto de estas hifas. Son las encargadas, ya sea de la nutrición del moho o de producir órganos reproductores. Las hifas pueden ser transparentes, aunque algunas son de color oscuro o bien tienen color de humo.

**Órganos o estructuras reproductores.** Los mohos son capaces de crecer a partir de un trozo de micelo trasplantado. Se reproducen principalmente por medio de esporas asexuales.

**Esporas asexuales.** Son de tamaño pequeño, ligeras, y resistentes a la desecación. Se diseminan fácilmente por la atmósfera para sedimentar y originar el talo de in nuevo moho en aquellos lugares en los que encuentran condiciones favorables. Los 3 principales tipos son: conidios, artrosporas u oidios y esporangiosporas.

**Esporas sexuales.** Los mohos capaces de producir esporas sexuales se clasifican según el modo con que se forman y el tipo de espora producido. Los no septados producen oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiospora (Frazier, 2000).

### 1.4.1.2 CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN

Los principales criterios para identificar y clasificar los mohos son los siguientes:

1. Hifas septadas o no septadas.
2. Micelo transparente u oscuro (color de humo)
3. Micelo coloreado o incoloro
4. Si se producen esporas sexuales y el tipo de las mismas; oosporas, zigosporas o ascosporas.
5. Tipo de esporas sexuales: esporangiosporas, conidios, o artrosporas (oidios)
6. Caracteres de la cabeza esporal
  - a. Esporangios: tamaño, color, forma y situación
  - b. Cabezas esporales que poseen conidios: conidios simples, cadenas de conidios, conidios gemantes, o acúmulos de conidios; forma y disposición de los esterigmas o fiálides; conidios unidos entre sí por una sustancia gomosa.
7. Aspecto de los esporangióforos o conidióforos: simples o ramificantes y, si son ramificados, tipo de ramificación; tamaño y forma de la columela existente en el extremo del esporangióforo; conidióforos separados o formando haces.
8. Aspecto microscópico de las esporas asexuales, sobre todo de los conidios: forma, tamaño, color; lisos o rugosos; monocelulares, bicelulares o pluricelulares.
9. Existencia de estructuras especializadas (o esporas): estolones, rizoides, células basales, apófisis, clamidosporas, esclerocios, etc.

Los principales mohos de importancia industrial son los siguientes: *Mucor*, *Zygorrhynchus*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Thamnidium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichothecium*, *Neurospora* (*Monilia*), *Sporotrichum*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Tricoderma*, *Spicopulariopsis*, *Pullularia*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Fusarium*, *Endomyces*, *Monascus*, *Sclerotinia*.

## 1.4.2 LEVADURAS Y HONGOS

Se refiere a aquellos hongos que generalmente no son filamentosos, sino unicelulares y de forma ovoide o esferoide, y que se reproducen por gemación o por fisión. Las levaduras que se encuentran en los alimentos pueden ser beneficiosas o perjudiciales (Frazier, 2000).

### 1.4.2.1 CARACTERES MORFOLÓGICOS.

**Forma y estructura.** Puede ser desde esférica a ovoide, alimonada, piriforme, cilíndrica, triangular, e incluso alargada, constituyendo un verdadero micelo o un falso micelo. También se diferencian en cuanto a su tamaño. Son partes observables de su estructura, la pared celular, el citoplasma, las vacuolas de agua, los glóbulos de grasa, y los gránulos, los cuales pueden ser metacromáticos, de albúmina o de almidón.

**Reproducción.** La mayoría se reproducen asexualmente por gemación multicelular o por gemación polar, mecanismo de reproducción mediante el cual una porción de protoplasma sobresale de la pared de la célula de la levadura y forma una protuberancia; esta protuberancia, o yema, aumenta de tamaño y finalmente se desprende como célula de levadura neoformada. Unas pocas especies de levaduras se reproducen por fisión, y una sola se reproduce mediante una combinación de los mecanismos de fisión y de gemación. La reproducción sexual de las levaduras “verdaderas” da lugar a la producción de ascosporas, desempeñando la función de asca la propia célula de levadura. Las levaduras “falsas”, las cuales no producen ascosporas ni otro tipo de esporas, pertenecen a los *Fungi Imperfecti* (Frazier, 2000).

### 1.4.2.2 PROPIEDADES FISIOLÓGICAS

La mayoría de las levaduras crecen mejor con abundante aporte de humedad disponible. No obstante, como quiera que muchas levaduras crecen mejor que la mayoría de las bacterias en sustratos que contienen elevadas concentraciones de solutos (de azúcar y sal), de ello se puede deducir que las levaduras necesitan menos humedad que la mayoría de las bacterias pero mayor que los mohos. En general, los azúcares son la fuente energética más apropiada para las levaduras, aunque las oxidativas, por ejemplo las formadoras de película, oxidan los ácidos orgánicos y el alcohol. Los nutrientes utilizados por las levaduras varían desde compuestos sencillos, como los son el amoníaco y la urea, aminoácidos y polipéptidos (Frazier, 2000).

Los principales géneros de levaduras de importancia industrial son los siguientes:

**Levaduras silvestres.** *Schizosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*.

**Falsas levaduras.** *Torulopsis*, *Candida*, *Brettanomyces*, *Kloeckera*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*.

### 1.4.3 BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan diversas formas incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos) y hélices (espirilos). Las bacterias son procariontas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, etc.), no tienen el núcleo definido y presentan orgánulos internos de locomoción. Generalmente poseen una pared celular compuesta de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles (Frazier, 2000).

#### 1.4.3.1 CARACTERES MORFOLÓGICOS

Para la identificación de las bacterias es necesario determinar la forma, tamaño, agrupación, estructura y reacciones de tinción de las existentes en el mismo. La existencia de bacterias provistas de cápsulas o rodeadas de mucílagos, puede explicar la mucosidad o viscosidad de un determinado alimento. Además, las cápsulas sirven para aumentar la resistencia de las bacterias a las condiciones desfavorables. Las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporolactobacillus* (bacilos) y *Sporosarcina* (cocos) comparten la capacidad de producir endosporas. Las endosporas se forman en un determinado sitio del interior de la célula, son muy resistentes al calor, a la luz ultravioleta y a la desecación. La esporulación suele tener lugar al final de la fase de crecimiento logarítmico, posiblemente como consecuencia del agotamiento de los nutrientes del medio, o de la acumulación en el mismo de productos resultantes del metabolismo de las células bacterianas. La formación de largas cadenas de células es típica en determinadas bacterias porque, bajo determinadas condiciones, forman agregados celulares. Resulta más difícil destruir la totalidad de las bacterias que forman parte de cadenas entrecruzadas o de agregados de tamaño considerable, que destruir células bacterianas aisladas (Frazier, 2000).

### 1.4.3.2 CARACTERES FISIOLÓGICOS

Las reacciones de O-R utilizadas por las bacterias para obtener energía de los alimentos (hidratos de carbono, otros compuestos de carbono, compuestos sencillos de carbono y de nitrógeno, etc.) originan, como productos resultantes de las mismas, ácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos, acetonas y gases.

Los géneros más importantes de bacterias presentes en los alimentos son: *Acetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Brochotrix*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Desulfotomaculum*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Gluconobacter*, *Halobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Vibrio* y *Yersinia*.

#### 1.4.3.2.1 COLIFORMES Y GRUPO DE COLIFORMES FECALES

Los coliformes son bacilos cortos no esporuladas, Gram negativos, que se han definido como bacterias aerobias o anaerobias facultativas que fermentan la lactosa con producción de gas. Los coliformes se usan como indicadores de contaminación en el agua porque se encuentran en gran número en el tracto intestinal de humanos y animales (Madigan, 2003). Las principales especies de bacterias coliformes son *Escherichiacoli*, *Klebsiellaspp* y *Enterobacteraerogenes*; no obstante, las especies que es posible que se ajusten a estos criterios, son más de veinte, encontrándose entre las mismas especies de otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* e incluso especies de *Aeromonas*. El grupo de coliformes fecales incluye a los coliformes capaces de crecer a temperatura elevada (44.5 ó 45°C). El primer objetivo de las pruebas de incubación a temperatura elevada fue la diferenciación de los coliformes de origen fecal de los que no tienen origen fecal. Las denominaciones “coliforme fecal” y “coliforme” no tienen validez taxonómica; estos términos sirven más bien para designar a grupos de bacterias capaces de crecer en condiciones experimentales específicas (Frazier, 2000).

Algunas propiedades que determinan que las bacterias coliformes sean importantes en las alteraciones que experimentan los alimentos son:

- Su capacidad para crecer en sustratos muy distintos y para utilizar como fuente de energía algunos hidratos de carbono y algunos otros compuestos orgánicos y, como fuente de nitrógeno, algunos compuestos nitrogenados bastante sencillos.
- Su capacidad para sintetizar la mayoría de las vitaminas que necesitan.
- La capacidad de las bacterias de este grupo para crecer perfectamente dentro de un intervalo de temperaturas bastante amplio, desde temperaturas inferiores a 10°C hasta una temperatura próxima a los 46°C.
- Su capacidad para producir importantes cantidades de ácido y gas a partir de azúcares.
- Su capacidad para producir sabores desagradables, definidos a veces como “a sucio”.
- La capacidad de *E. aerogenes* para producir mucosidad o viscosidad.

#### **1.4.3.2.2 MESÓFILOS AEROBIOS**

A este grupo pertenece una gran cantidad de microorganismos capaces de desarrollarse entre 20 y 37°C. Este grupo de bacterias, son indicadores del valor comercial de un alimento, de la presencia de bacterias patógenas, de las condiciones higiénicas en las que ha sido manejado el producto y predice la vida anaquel del mismo (Frazier, 2000).

#### **1.4.3.2.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

La propiedad más importante de las bacterias lácticas es su capacidad para fermentar los azúcares con producción de ácido láctico. Esta propiedad puede ser beneficiosa en la fabricación de algunos productos. Estas bacterias producen ácido rápida y normalmente en cantidades importantes, por lo que no dan oportunidad a que crezcan otros microorganismos competitivos. Las principales bacterias de este grupo pertenecen a los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Pediococcus*. En cuanto a sus exigencias de crecimiento, las bacterias ácido-lácticas necesitan aminoácidos preformados, vitaminas de grupo B, y bases púricas y pirimidínicas

### **1.5 MICROBIOLOGÍA DE LA CARNE Y DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS**

Con la excepción de la superficie externa y de los tractos digestivo y respiratorio, los tejidos animales sanos contienen pocos microorganismos; los mecanismos de defensa animal controlan con eficacia los agentes infectivos en los animales sanos vivos; sin embargo, esta defensa falla después de la muerte (ICMSF, 1983).



La superficie externa del animal (piel, pezuñas y pelo) contiene una gran cantidad y varias especies de microorganismos procedentes del suelo, agua, piensos y del estiércol, así como su propia flora intestinal; es por ello que la principal contaminación, de la carne, se debe a causas externas durante las operaciones de sangría, manipulación y preparación de la canal. Así mismo el equipo especializado, como son las picadoras, las embutidoras y empaquetadoras, y los ingredientes que se emplean para elaborar determinados productos cárnicos, por ejemplo las tripas y las especias, es posible que aporten importantes cantidades de microorganismos perjudiciales (Tabla 1).

**Tabla 1. Microorganismos aislados con frecuencia en las carnes.**

<i>Producto</i>	<i>Microorganismos aislados</i>
Carne fresca y refrigerada	<p><u>Bacterias:</u> <i>Acinetobacter, Moraxella, Pseudomonas, Aeromonas, Alcaligenes y Micrococcus</i></p> <p><u>Mohos:</u> <i>Cladosporium, Geotricum, Sporotrichum, Mucory Thamnidium</i></p> <p><u>Levaduras:</u> <i>Candida, Torulopsis, Debaryomyces, y Rhodotorula</i></p>
Carnes tratadas y curadas	<p><u>Bacterias:</u> <i>Lactobacillus</i> y otras bacterias lácticas, <i>Acinetobacter, Bacillus, Micrococcus, Serratia y Staphylococcus</i></p> <p><u>Mohos:</u> <i>Aspergillus, Penicillium, Rhizopus, y Thamnidium</i></p> <p><u>Levaduras:</u> <i>Debaryomyces, Torula, Torulopsis, Trichosporon y Candida</i></p>

**Fuente:**Frazier, 2000.

En embutidos, los microorganismos que los alteran pueden crecer en la superficie de la tripa, entre la tripa y la carne en ella contenida, o en el interior. La multiplicación de los microorganismos entre la tripa y la carne que está contiene, se encuentra favorecida por la acumulación de humedad en esta parte durante la cocción en el caso de que la tripa sea permeable al agua. El mucilago de la superficie de la carne o el existente entre ambas tripas lo originan principalmente *Micrococcus*.

La naturaleza de estos productos cárnicos y los procedimientos que se utilizan en la preparación de algunos de ellos lo hacen relativamente insensibles a la alteración por la mayoría de las bacterias. Los jamones curados cocidos experimentan un tipo de alteración diferente al tipo de alteración que experimentan los jamones frescos y ahumados. Esto debido principalmente al hecho de que las soluciones conservantes que se bombean al interior de los jamones contiene azúcares que son fermentados por la flora propia del jamón y también por

los microorganismos existentes en la solución conservante y que son bombeados al interior de este producto cárnico, como por ejemplo, *Lactobacillus*. Los azúcares son fermentados para producir alteraciones que se conocen con la denominación de “agriado” de varios tipos, dependiendo de su localización dentro del jamón; los tipos más importantes de alteración van desde proteólisis relativamente inodora a la verdadera putrefacción con sus olores extraordinariamente desagradables a mercaptanos, a sulfuro de hidrogeno, a aminas, a indol, etc, pudiendo ser producido por una gran cantidad de bacterias psicrótrofashalotolerantes. Como causa de los agriados del jamón han sido implicados un gran número de géneros bacterianos entre los cuales se incluyen *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Micrococcus* *Clostridium*(Frazier, 2000).

En la carne preparada higiénicamente el número de microorganismos patógenos es muy pequeño y su microflora está formada fundamentalmente por especies saprofitas. Los más numerosos son los bacilos Gram-negativos y los cocos; entre los saprofitos se incluyen *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Corineformes* y *Pseudomonas*, así como varias *Enterobacteriaceae*. Los micrococcos que se detectan fácilmente en las canales frescas son principalmente *Micrococcus*spp. y *Staphylococcus*spp. Hay un pequeño número de *estreptococos* fecales; las bacterias ácido lácticas, *Brochotrixthermosphactum* y varias especies de *Bacillus* se encuentran al principio en número escaso (ICMSF, 1983).

El deterioro de los alimentos puede deberse a los cambios bioquímicos propios de la carne que producen modificaciones del sabor por degradación o por síntesis de nuevos compuestos; además de la presencia de microorganismos. Las condiciones imperantes en el ambiente afectan de diversas maneras. Estas condiciones o factores se pueden clasificar en intrínsecos y extrínsecos (Gänzle y col., 1999).

Los factores intrínsecos y extrínsecos que contribuyen al desarrollo de los microorganismos y el conocimiento acerca de la naturaleza de los alimentos permiten decidir entre las diferentes estrategias de conservación. Entre ellas puede encontrarse la utilización de aditivos como los nitritos, ácidos orgánicos, empleo de atmósfera controlada, radiaciones y más recientemente altas presiones, bacteriocinas y cultivos bioconservadores (Gänzle y col, 1999).

### 1.5.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS EN LA CARNE

De acuerdo a Vittadini y Chinachoti en el 2003, la combinación e interacción de los factores intrínsecos (composición del alimento, pH, acidez, actividad de agua (Aw), potencial redox, temperatura del alimento, inhibidores naturales, microorganismos competitivos, contenido de sólidos, viscosidad y movilidad molecular) y extrínsecos (temperatura, humedad relativa, composición y proporción de la atmósfera gaseosa, intensidad de la luz, características de envasado, almacenamiento, distribución y condiciones de mostrador) determina la microbiología de la carne (Tabla 2).

**Tabla 2. Factores intrínsecos y extrínsecos que afectan el crecimiento microbiano en carnes curadas y cocidas.**

<b>INTRÍNSECOS</b>	
<b>pH</b>	Tipo y nivel de adición de carbohidratos que a su vez permiten el crecimiento de microorganismos lácticos, uso de acidulantes o de fosfatos.
<b>Aw</b>	Sal de la solución de salmuera y presencia de azúcar. Contenido de humedad inicial y final de la carne.
<b>Antimicrobianos</b>	Nitrito residual en producto final afectado por pH del producto, temperatura y tiempo de procesamiento y almacenamiento. Nivel de sal adicionada curado. Uso de ascorbato, fosfato u otros aditivos, tales como sabor humo.
<b>Microbiota inicial</b>	Tipo de carne usada. Técnica de sacrificio empleada. Instrucción y manipulación higiénica del personal. Buenas prácticas de manufactura.
<b>EXTRÍNSECOS</b>	
<b>Parámetros de procesamiento</b>	Métodos de cocción y enfriamiento. Tiempos y temperaturas alcanzados.
<b>Almacenamiento, distribución y punto de venta.</b>	Tiempo. Temperatura. Humedad relativa. Historias de empaclado y atmósfera.
<b>Flora microbiana</b>	Tipo y nivel de flora microbiana natural que permanece en el producto después del proceso. Contaminación post proceso.

Fuente: McDonald y Sun, 1999.

#### 1.5.1.1 FACTORES INTRÍNSECOS AL ALIMENTO

En seguida se presentan algunos de los más importantes parámetros en el desarrollo de microorganismos en alimentos.

### **1.5.1.1.1 COMPOSICIÓN DEL ALIMENTO**

Los microorganismos requieren de nutrientes para llevar a cabo su crecimiento y funciones adecuadamente, los cuales obtienen de los alimentos. Dichos nutrientes son agua, azúcares, grasas, proteínas, vitaminas, factores de crecimiento y minerales. El agua se requiere para llevar a cabo todas sus funciones metabólicas al ser el componente principal de la célula microbiana.

Como fuente de energía, los microorganismos pueden utilizar a los azúcares, ésteres, alcoholes, péptidos, aminoácidos, ácidos orgánicos y sus sales. Las grasas son también usadas como fuente de energía, pero estos componentes son degradados solo por un pequeño número de microorganismos (Ray y Daeschel, 1992).

La fuente primaria de nitrógeno utilizada por los microorganismos son los compuestos solubles, como los aminoácidos. En general, estos compuestos simples son utilizados primero, antes de atacar compuestos más complejos como proteínas de alto peso molecular (Gould, 2000).

### **1.5.1.1.2 pH**

El pH de un alimento es uno de los principales factores que determinan la sobrevivencia y el crecimiento de los microorganismos durante su procesamiento, almacenaje y distribución (Baumgart, 1990). Girard (1991) encontró que el intervalo de pH para carne de res después de rigor mortis es de 5.1 a 6.2, con un promedio de 5.6, mientras que los intervalos para cordero y cerdo, son de 5.4 a 6.7, y de 5.3 a 6.9 respectivamente.

Se ha demostrado que existe una relación altamente significativa entre el pH y el crecimiento de microorganismos, dándose esta relación en dos sentidos. El crecimiento de microorganismos se ve afectado por el pH prevalente en el medio ambiente; o bien, que la variación en el pH es debida al crecimiento de microorganismos capaces de alcalinizar o acidificar el medio por la producción de metabolitos (Rivera, 2005).

### **1.5.1.1.3 ACTIVIDAD DE AGUA ( $A_w$ )**

La  $A_w$ , también llamado coeficiente de actividad del agua, constituye el agua no ligada aprovechable por los microorganismos y representa un factor muy importante para su proliferación en los alimentos. La mayoría de las bacterias saprofitas no crecen en

Aw inferiores a 0.91, mientras que los mohos pueden crecer en Aw de 0.80; para el caso de las levaduras, éstas requieren de Aw entre 0.88 (Frazier, 2000). Con respecto a bacterias contaminantes de alimentos, *Staphylococcus aureus* puede presentar crecimiento en Aw de 0.86, mientras que *Clostridium botulinum* no puede crecer en Aw inferiores a 0.94. A estos conceptos se pueden citar algunas excepciones, como que, el valor mínimo de Aw reportado para bacterias halófilas es de 0.75, mientras que mohos xerófilos y levaduras osmófilas tienen reportado un crecimiento en valores de Aw de 0.65 y 0.61 respectivamente (Blom, 1997).

Los valores mínimos reportados para el crecimiento de algunos microorganismos en alimentos son presentados en la Tabla 3. El efecto general al reducir la Aw por debajo del nivel óptimo es que se alarga la fase de latencia y se disminuye la velocidad de crecimiento y la población total de microorganismos. Este efecto puede ser esperado como resultado de influencias adversas de la disminución de agua en todas las actividades metabólicas dado que todas las reacciones químicas de la célula requieren de un medio acuoso (Clavero, 1996).

**Tabla 3. Valores mínimos aproximados de Aw para el crecimiento de microorganismos importantes en alimentos.**

ORGANISMO	Aw	ORGANISMO	Aw
<b>GRUPOS</b>		<b>GRUPOS</b>	
Bacterias	0.91	Bacterias halófilas	0.75
Levaduras	0.88	Hongos xerófilos	0.65
Hongos	0.80	Levaduras osmófilas	0.61
<b>ORGANISMOS ESPECÍFICOS</b>			
ORGANISMOS ESPECÍFICOS	Aw	ORGANISMOS ESPECÍFICOS	Aw
<i>Clostridium botulinum, tipo E</i>	0.97	<i>Candida scottii</i>	0.92
<i>Pseudomonas spp.</i>	0.97	<i>Trichosporon pullulans</i>	0.91
<i>Acinetobacter spp.</i>	0.96	<i>Candida zeylanoides</i>	0.90
<i>Escherichia coli</i>	0.96	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.86
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.95	<i>Alternaria citri</i>	0.84
<i>Bacillus subtilis</i>	0.95	<i>Penicillium patulum</i>	0.81
<i>Clostridium botulinum</i> tipos A y B	0.94	<i>Aspergillus glaucus</i>	0.70
<i>Candida utilis</i>	0.94	<i>Aspergillus conicus</i>	0.70
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.94	<i>Aspergillus echinulatus</i>	0.64
<i>Mucor spinosus</i>	0.93	<i>Xeromyces bisporus</i>	0.61

Fuente: Jay, 1996.

#### 1.5.1.1.4 TEMPERATURA DEL ALIMENTO

Los microambientes en los productos alimentarios cambian constantemente debido a las reacciones catalizadas por sistemas de enzimas, las cuales producen calor, consumen oxígeno y liberan dióxido de carbono y otros gases. Todos estos cambios ocasionan variaciones en la

temperatura que, a su vez, afectan el crecimiento y desarrollo de los microorganismos (MacDonald y Sun, 1999).

### 1.5.1.2 FACTORES EXTRÍNSECOS DE LOS ALIMENTOS

Los factores extrínsecos de los alimentos son propiedades del ambiente de almacenamiento, que afectan tanto a los alimentos como a sus microorganismos, puesto que determinan cuál de los presentes en un alimento es la especie dominante y que tipo de alteración genera. Los más importantes son temperatura de almacenamiento, humedad relativa, composición y proporción de la atmósfera gaseosa e intensidad y longitud de onda de luz (Jay, 1996).

#### 1.5.1.2.1 TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que influyen en el crecimiento y sobrevivencia de los microorganismos. Así, encontramos que para cada microorganismo hay una temperatura mínima y una máxima, por debajo o por encima de las cuales resulta difícil el crecimiento, así como una temperatura óptima en la que se da el crecimiento más rápido. En lo referente a microorganismos toxicogénicos, también se produce un efecto directo sobre la posibilidad de que éstos produzcan su toxina o no de acuerdo a la temperatura prevalente en el alimento. Dependiendo del intervalo de temperatura de crecimiento se pueden distinguir cuatro grupos fisiológicos fundamentales de microorganismos (Tabla 4) (Rivera, 2005).

**Tabla 4. Límites aproximados de temperatura para el crecimiento de microorganismos.**

GRUPO	TEMPERATURA °C		
	MÍNIMA	ÓPTIMA	MÁXIMA
Psicrótrofos	-5 a 5	25 a 30	30 a 35
Psicrófilos	-5 a 5	12- 15	15 a 20
Mesófilos	5 a 15	30 a 45	35 a 47
Termófilos	40 a 45	55 a 75	60 a 90

Fuente: ICMSF, 1983

#### 1.5.1.2.2 ATMÓSFERA GASEOSA

El crecimiento de los microorganismos sobre los sustratos cárnicos puede ser alterado mediante la modificación de la composición de los gases (oxígeno y dióxido de carbono) presentes en la atmósfera que rodea al alimento.

a) Efecto del oxígeno

El oxígeno es tóxico para todo tipo de vida si la presión parcial es suficientemente alta. Dicha toxicidad se puede dar por: inactivación de ciertas enzimas, incremento en la generación de peróxido de hidrógeno, oxidación de los lípidos de la membrana y producción *in vivo* de radicales superóxido. La presión parcial de oxígeno en el aire, generalmente es tóxica para microorganismos anaerobios ya que no tienen sistemas eficientes para eliminar los radicales generados a partir del oxígeno (Tabla 5) (Molins, 1993).

**Tabla 5. Clasificación de los microorganismos según sus necesidades de O<sub>2</sub>.**

CLASIFICACIÓN	NECESIDADES DE O <sub>2</sub>	EJEMPLO
Aerobios Estrictos	Crece sólo en presencia de oxígeno	<i>Bacillus, Pseudomonas, Micrococcus, Flavobacterium</i> y Mohos
Anaerobios Estrictos	Crece solamente en ausencia de oxígeno	<i>Clostridium</i> spp.
Anaerobios Facultativos	Capaces de crecer en ausencia o presencia de oxígeno	<i>Staphylococcus, Streptococcus, Bacillus, Enterobacterias</i>
Microaerófilos	Crece en medios con una tensión de oxígeno menor que la del aire	<i>Lactobacillus Streptococcus</i>

**Fuente:** López y Pantoja, 1995.

### 1.5.1.2.3 LUZ

Es uno de los factores de importancia, que incide en el crecimiento de microorganismos. La penetración de la radiación ultravioleta es poca en los alimentos líquidos, e insignificante en los alimentos sólidos, su principal aprovechamiento reside en la destrucción de microorganismos suspendidos en el aire o que se encuentren sobre las superficies. Sin embargo, los gérmenes pueden ser también resistentes si se encuentran cubiertos por capas de sustancias protectoras (biopelículas), tales como aerosoles o sobre superficies húmedas o de alimentos grasosos (López y Pantoja 1995).

La radiación ultravioleta es inadecuada para ser utilizada en ciertos alimentos ricos en grasa, especialmente en grasas insaturadas puesto que acelera la formación de olores a rancio debido a su fuerte acción catalítica sobre la oxidación de los lípidos. Es más eficaz en las cámaras de refrigeración para tratar carne de ovino o de res, pero no para la carne de cerdo. Además tiene efecto sobre el color de la carne, ocasionando oscurecimiento de la misma (ICMSF, 1983 y Molins, 1993).

### 1.5.1.3 BIOPELÍCULAS

Las biopelículas son microcolonias de bacterias adheridas o fijadas a la superficie y protegidas por una capa de azúcares denominada exopolisacáridos, la cual es producida por las mismas bacterias.

La bacteria cuya actividad química y física es independiente de las células vecinas es referida como “planctónica” y tiene la habilidad de sujetarse por sí sola a cualquier superficie de forma irregular, tejidos de cuerpos suaves o duros y superficies lisas.

Una característica común de la biocapa bacteriana es que está muy bien fija sobre la superficie, y para eliminarla no basta con presión de agua y restregado, es necesario penetrar la capa de azúcares para poder eliminarla. Después de un periodo de tiempo (horas o días), la estructura interna de la biocapa crece o se define como una o más microcolonias (puras o mixtas), formando y construyendo canales de fluidos, para proveer nutrientes y oxígeno al interior y remover desperdicios microbiológicos hacia el exterior (Salgar, 2004).

A no ser que el equipo (picadoras, tenderizadoras, cortadoras, embutidoras, empaquetadoras, etc.) que entra en contacto con los alimentos sea adecuadamente limpiado y desinfectado, puede constituir una importante fuente de contaminación de los alimentos con microorganismos. Los microorganismos no sólo pueden persistir en la superficie del equipo, sino que también puede aumentar su número cuando el tratamiento ha sido deficiente. Davidson en 2005 mencionó que la limitación de nutrientes, las tasas de red y las tasas de reducción del crecimiento puede modificar la sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos de origen natural.

## 1.6 SUSTANCIAS USADAS PARA CONTROLAR LA CALIDAD SANITARIA DE LOS ALIMENTOS

Las sustancias aprobadas, como antimicrobianos, de uso alimentario, son denominados como “conservadores” y los conservadores químicos son definidos por el Código Federal de Regulaciones del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en el Título 21 [apartado 101.22(a)(5)] como: “cualquier químico que, cuando se agrega al alimento, tiende a prevenir o retardar su deterioro, pero no incluye sal común, azúcares, vinagre, especias o aceites extraídos de especias, sustancias adicionadas al alimento por su exposición directa al humo de leña, o a las sustancias químicas aplicadas por sus propiedades insecticidas o herbicidas ” (FDA, 2010).



La FDA define en la fracción [21CFR 170.3(o)(2)], como agentes antimicrobianos a “Sustancias usadas para conservar alimentos impidiendo el crecimiento de microorganismos y en consecuencia deterioro, incluyendo fungistáticos, mohos e inhibidores de enlaces” (FDA, 2010).

La Tabla 6 presenta una clasificación de algunos antimicrobianos aprobados en alimentos:

**Tabla 6. Antimicrobianos aprobados por la FDA-USDA en el CFR 21 para su uso en alimentos.**

Componente	Objetivo microbiano	Aplicaciones primarias en alimentos
Ácido acético, acetato, diacetato y ácido dehidroacético	Levaduras y bacterias	Productos de panificación, condimentos, productos lácteos, aceites/grasas, carne y salsas.
Acido benzoico y benzoatos	Levaduras	Bebidas, productos de frutas y margarina.
Dimetildicarbonato	Levaduras	Bebidas
Acido láctico y lactato	Bacterias	Carne y alimentos fermentados.
Lactoferrina	Bacterias	Carne
Lisozima	<i>Clostridium botulinum</i>	Queso, carnes cocidas y productos de cerdo.
Nisina	<i>Clostridium botulinum</i> y otras bacterias	Queso, carne cocidas y productos de cerdo
Sulfitos	Levaduras y mohos	Frutas, productos de fruta, productos de papa y vinos.

Fuente: Davidson, 2005

Los conservadores químicos más utilizados en la elaboración de jamón son los ácidos orgánicos y los nitratos y nitritos.

### 1.6.1 ÁCIDOS ORGÁNICOS

La adición de ácidos en los alimentos puede acortar los tiempos de esterilización durante el tratamiento térmico, debido a la baja resistencia térmica de los microorganismos en los alimentos ácidos. El efecto inhibitorio de los ácidos ha sido comparado en función al pH, concentración, longitud de cadena, tipo y grado de ramificación para inhibir o matar una gran variedad de microorganismos (Davidson, 2005).

Los microorganismos y, en especial, las bacterias lácticas, producen una gama de sustancias antimicrobianas cuyo valor ecológico es el de controlar a los competidores del ambiente (Badui, 2006). El ácido láctico y sus sales se han utilizado ampliamente en la industria de la carne para aumentar el sabor y en la medida la vida útil del producto.

El ácido acético y sus sales como el acetato de calcio, acetato de sodio, diacetato de calcio y diacetato de sodio son considerados como sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS-por sus siglas en inglés). Según el Código Federal de Regulaciones (CFR) de Estados Unidos el diacetato de sodio puede ser utilizado como un agente antimicrobiano, agente que aporte características de sabor o como un agente de control de pH; los niveles máximos para su uso en productos cárnicos es de 0.1% (FDA, 2010).

### 1.6.2 NITRITOS Y NITRATOS

En la elaboración de embutidos cárnicos se emplean las sales de curación, constituidas por nitrito y nitrato de sodio o de potasio, cloruro de sodio, ácido ascórbico, fosfatos, azúcar y otros. Los nitritos y nitratos actúan en dos sentidos: desarrollan el color característico de las carnes curadas e inhiben el *Clostridiumbotullinum*. Además, dadas sus propiedades antioxidantes, contribuyen a estabilizar el sabor (Badui, 2006).

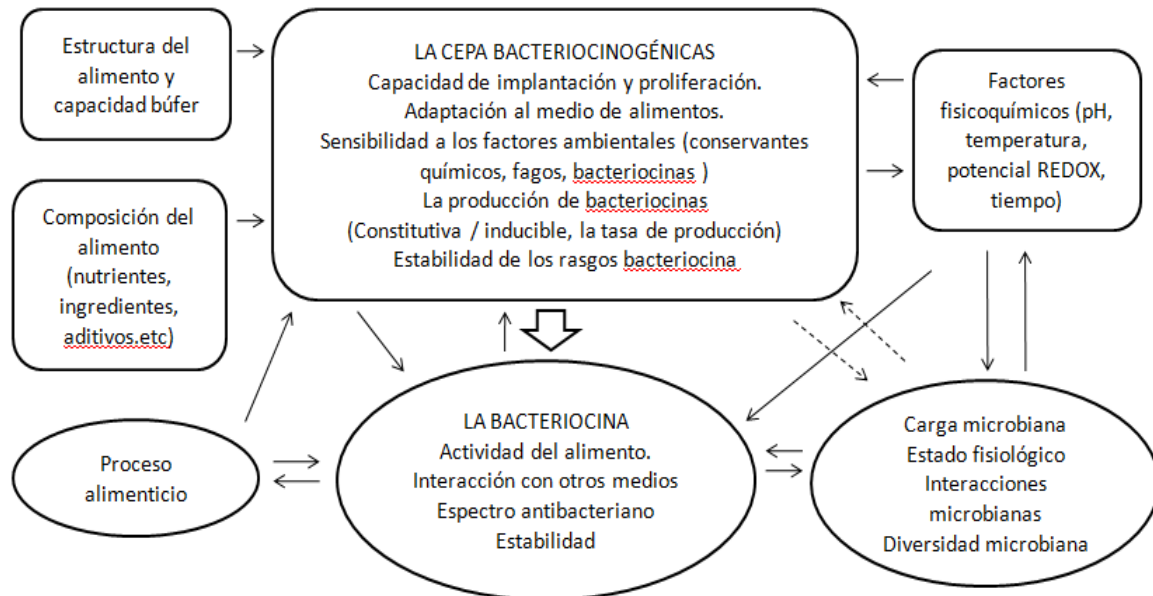
## 1.7 BIOCONSERVACIÓN

El uso empírico de los microorganismos y/o de sus productos naturales para la conservación de los alimentos se le conoce como bioconservación.

En bioconservación, el período de conservación se extiende y la seguridad se incrementa, mediante el uso de la microflora natural o controlada, principalmente a partir de las bacterias del ácido lácticas (BAL) y/o sus productos antimicrobianos como ácido láctico, bacteriocinas y otros (Aymerich, 2008).

Las BAL pueden ejercer su antagonismo a través de la competencia por los nutrientes y/o la producción de varias sustancias antimicrobianas, tales como los ácidos orgánicos (láctico y acético), dióxido de carbono, el peróxido de hidrógeno, el etanol diacetil y bacteriocinas. Pueden ser una alternativa a los aditivos químicos, a la refrigeración y al envasado bajo atmósfera modificada (MAP-ModifiedAtmospherePackaging), y actuar como obstáculos adicionales para la conservación de los alimentos (Aymerich, 2008).

La Figura 2 muestra un esquema en donde se representan las principales relaciones entre los factores que intervienen en la bioconservación de productos alimenticios.



**Figura 2. Influencia de diferentes factores sobre la eficacia de la producción de bacteriocinas *in situ* para la bioconservación.**

**Fuente:** Gálvez, 2007.

### 1.7.1 ANTIMICROBIANOS NATURALES

Los antimicrobianos naturales son compuestos con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos, incluyendo bacterias, virus y hongos; o causar su muerte. Los objetivos principales de los antimicrobianos son los microorganismos que producen una intoxicación alimentaria (agentes infecciosos y los productores de toxinas) y los microorganismos de deterioro, cuyos productos finales del metabolismo o enzimas causan malos olores, malos sabores, problemas en la textura y pérdida de color (Davidson, 2005).

Los antimicrobianos en general tienen diferentes umbrales de concentración para la inhibición o inactivación. Estos límites dependen de los objetivos de la acción específica de la sustancia antimicrobiana, incluyendo la pared celular, membrana de la célula, las enzimas metabólicas, la síntesis de proteínas y los sistemas genéticos (Lataoui y Tantaoui-elaraki, 1994). Los mecanismos exactos u objetivos de los antimicrobianos de alimentos a menudo no son conocidos o bien definidos. Es difícil identificar un objetivo cuando algunas reacciones de interacción toman lugar simultáneamente. Por ejemplo, la alteración de los compuestos de la membrana podría causar fugas de contenido celular, la interferencia con el transporte activo o enzimas metabólicas, o la disipación de la energía celular en forma de ATP (Davidson, 2005).

Hoy en día los antimicrobianos naturales constituyen una nueva forma de garantizar alimentos seguros, manteniendo inalterable la calidad del alimento.

### 1.7.1.1 COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los componentes de los aceites esenciales son importantes por sus características cualitativas y cuantitativas, ya que éstas determinan las características de los aceites, que a su vez, podrían tener un efecto sobre su potencial antimicrobiano (Dugo y col., 2000). Los aceites esenciales de cítricos contienen entre un 85 y 99% de compuestos volátiles y del 1 al 15% de componentes no volátiles. Los componentes volátiles son una mezcla de monoterpenos (limoneno) e cadenas hidrocarbonadas de sesquiterpenos así como sus derivados oxigenados incluyendo: aldehídos (cital), cetonas, ácidos, alcoholes (linalol) y ésteres, ver Tabla 7 (Borgmann y col., 2004; Smith y col., 2001; Flamini y col., 2007).

**Tabla 7. Compuestos volátiles típicos que se encuentran en los cítricos.**

Compuestos volátiles	Naranja dulce (%)	Limón (%)	Bergamot (%)
Metanol	0.37	0.20	0.35
Isopropanol	0.91	0.12	0.28
$\alpha$ -pineno	6.37	0.27	1.39
Acetato de butilo	0.00	1.47	4.97
3-Heptanona	0.00	0.34	0.94
Limoneno	88.21	78.84	72.88
Linalol	0.02	0.02	10.23
Cital	3.00	0.10	0.70

(Adaptado de Moufida y Marzouk, 2003)

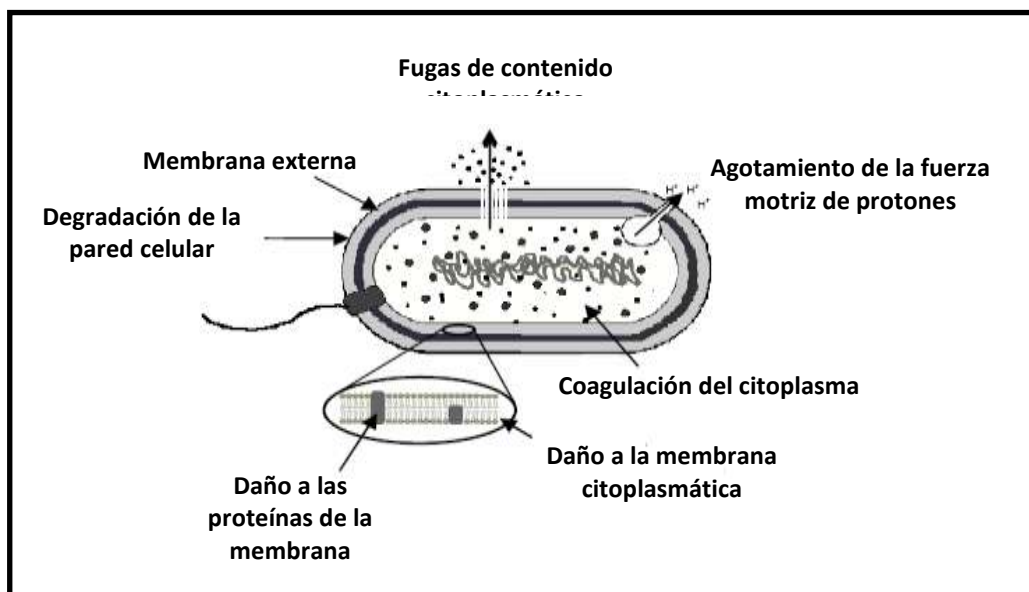
### 1.7.1.2 MECANISMO DE ACCIÓN

Los aceites esenciales pueden actuar como prooxidantes afectando el interior de la membrana celular y otros organelos como la mitocondria (Bakkali, 2007). En general, la actividad citotóxica de los aceites esenciales se debe básicamente a la presencia de los fenoles, aldehídos y alcoholes (Bruni y col., 2003; Sacchetti y col., 2005).

En las eucariotas, las mitocondrias producen aniones superóxido y peróxido de hidrógeno que reaccionan con su contenido de hierro para generar intermediarios reactivos como el radical hidroxilo que es altamente dañino para el ADN mitocondrial. El ADN mitocondrial dañado inhibe la expresión de proteínas de transporte de electrones que conducen a la acumulación de ROS (Van Houten y col., 2006). En este sentido, el mecanismo de reacción de los aceites esenciales pueden ser previstas: los aceites esenciales, penetran a través de la pared celular y la membrana citoplasmática interrumpiendo y permeabilizándolos, y sobre todo, daña las membranas mitocondriales. La mitocondria, por los cambios en el flujo de electrones a través

de la cadena de transporte de electrones, producen radicales libres que oxidan y dañan los lípidos, las proteínas y el ADN. Por otra parte, algunos componentes fenólicos de los aceites esenciales se oxidan por el contacto con la producción de ROS radicales fenoxilo muy reactivo que se suman a los ROS liberado por las mitocondrias. Estos tipos de reacciones de radicales, están condicionadas y mejoradas por la presencia de iones de células de metales de transición como el  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ó  $Mn^{+2}$  (Stadler y col., 1995; Cao y col., 1997; Sakihama y col., 2002; Jiménez del Río y Vélez-Pardo, 2004; Azmi y col., 2006).

Teniendo en cuenta el gran número de diferentes grupos de compuestos químicos, lo más probable es que su actividad antibacteriana no es atribuible a un mecanismo específico sino a la acción en varios objetivos específicos en la célula bacteriana y a la naturaleza del agente químico; por ejemplo: la degradación de la pared celular, el daño a la membrana citoplasmática, el daño a proteínas de la membrana, filtración de contenido de la celda, la coagulación del citoplasma y el agotamiento de la fuerza motriz de protones como se ilustra en la Figura 3.



**Figura 3. Mecanismo de acción, de los antimicrobianos naturales y sus componentes, en una célula bacteriana.**

**Fuente:** Raybaudi-Massilia, 2007.

En cocos Gram positivos, los sitios potenciales de destino incluyen la pared celular, membrana citoplasmática, las proteínas funcionales y estructurales, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Los mismos posibles sitios objetivo se producen en las bacterias Gram-negativas, excepto en la membrana externa que sustituye a la pared celular (Demetzos y Perdetzoglou, 2001).

La Tabla 8 ejemplifica algunos de los sitios en los que los antimicrobianos influyen directamente de acuerdo al tipo de microorganismo presente.

**Tabla 8. Posibles sitios blanco en las células microbianas.**

TIPO DE MICROORGANISMO	SITIO BLANCO
Cocos	CW, CM, proteínas, enzimas, ADN, RNA
Bacterias gram-positivo	OM, IM, proteínas, enzimas, ADN, RNA
Micobacterias	CW, CM, proteínas, enzimas, ADN, RNA
<i>Bacillus spp.</i> y <i>Clostridium spp.</i>	OSC,ISC, corteza, membrana de esporas
Mohos	CW, CM, proteínas, enzimas, ADN, RNA
Levaduras	CW, CM, proteínas, enzimas, ADN, RNA
NOTA: CW, pared celular; CM, membrana citoplasmática; ADN, ácido desoxirribonucleico; RNA, ácido ribonucleico; OM, membrana exterior; IM, membrana interna; OSC, capa externa de la espora; ISC, capa interna de la espora.	

**Fuente:** Davidson, 2005.

### 1.7.1.3 FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La acción conservante de los antimicrobianos depende del tipo, género, especie y la cepa del microorganismo en prueba. La eficiencia de un antimicrobiano depende también en gran medida de factores ambientales tales como el pH, la actividad de agua (Aw), la temperatura, la atmósfera, la carga microbiana inicial y la acidez del sustrato de alimentos (Gould, 1989; Davidson, 2005). Muchos de estos factores ambientales pueden ser considerados de forma individual ó combinando; el uso de algunos de estos tratamientos ha sido la base del concepto de barrera, que consiste en el uso de más de un tratamiento en una secuencia lógica para proporcionar productos frescos de calidad, como la comida (Carramiñana y col., 2008).

### 1.7.1.4 EXTRACTO DE SEMILLAS DE CÍTRICOS

Los extractos y aceites esenciales se obtienen de material vegetal (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, corteza, hermas, madera, frutos y raíces) que puede obtenerse por fermentación, extracción o destilación, siendo este método más adelante el más comúnmente usado para la producción comercial de los aceites, que están constituidos por una mezcla de compuestos que incluyen terpenos, alcoholes, cetonas, fenoles, ácidos, aldehídos y ésteres (Nychas, 1995 y Burt, 2004). El uso de antimicrobianos que garanticen la inocuidad de los productos ha ido en aumento; en ese sentido, los extractos de semillas de cítricos se han empezado a utilizar y se ha encontrado, por ejemplo, que el limón y la naranja dulce contienen compuestos como el linalol (monoterpeno) y el citral (aldehído aromático), los cuales presentan efectos antimicrobianos contra microorganismos de interés sanitario en alimentos, tales como

*Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157H:7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *S. aureus* (Fisher y Phillips, 2007; Busatta y col., 2008). Davidson en 2005 demostró que las bacterias Gram-positivas son más sensibles a los aceites esenciales que las bacterias Gram-negativas.

### **1.7.2 LEGISLACIÓN NACIONAL E INTERNACIONAL**

Partiendo de que el antimicrobiano es un extracto de semillas de toronja y naranja; la Food and Drug Administration (FDA) en el título 21: Food and Drugs parte 182- sustancias generalmente reconocidas como seguras 182.20. Los aceites esenciales, oleorresinas (libre de solvente) y extractos naturales (incluyendo destilados); se clasifican como seguros a la naranja y la toronja, por lo tanto, el antimicrobiano se puede considerar dentro de los aditivos GRAS.

En cuanto a la normatividad nacional, no se encontró reglamentación mexicana específica acerca del uso de extractos de semilla de cítricos como antimicrobiano, en productos cárnicos ni en envases para alimentos.

## JUSTIFICACIÓN

A pesar de las cualidades nutritivas de la carne de conejo, en México su consumo anual es cuando mucho de 100 gramos por persona, cantidad muy inferior a países como Francia, España, Portugal y Bélgica, en los que el consumo anual per cápita es superior a tres kilogramos o en Italia, en donde es mayor de cinco kilogramos.

No obstante, en el mercado actual, hay una tendencia por consumir productos “listos para comer”; sin embargo, no existe una gran variedad de productos elaborados con carne de conejo, por lo que en el presente trabajo se estudia en una alternativa de consumo, como lo es el jamón de carne de conejo.

En otro orden de ideas, las enfermedades originadas por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos o sustancias tóxicas, denominadas genéricamente como Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), son actualmente unos de los riesgos sanitarios más frecuentes que enfrenta la población, debido a que estas enfermedades se adquieren por el consumo de alimentos y/o agua.

Por lo tanto, la presencia de estos microorganismos en los alimentos conduce a estudiar alternativas de origen natural tales como extractos y aceites vegetales para evaluar su efecto antimicrobiano en la inhibición y/o eliminación de éstos, reflejándose en la calidad sanitaria y por ende en la vida útil del alimento.

Desde hace años, el uso de estos compuestos ha empezado a crecer en el mercado europeo, especialmente en combinación con otras técnicas modernas de control, como el análisis de riesgos y control de puntos críticos.

De acuerdo con lo anterior, la elaboración del presente trabajo se efectuó con la finalidad de evaluar el efecto que tiene la aplicación de un antimicrobiano natural (extracto de cítricos) y el tipo de envasado, en la calidad (color) y la calidad sanitaria (Coliformes totales, Bacterias Ácido Lácticas y Mesófilos aerobios); así como, el difundir un producto con alto valor nutrimental; que dicho sea de paso, éste se elabora en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.



## HIPÓTESIS

Si el extracto de semillas de cítricos posee efecto sobre la calidad sanitaria y comercial en rebanadas de jamón de carne de conejo, con y sin envase al vacío, al ser agregado este a dichos derivados de la carne, se espera que haya una reducción de las UFC/g de microorganismos coliformes totales, bacterias aerobias totales y bacterias ácido lácticas; así como una acidificación y un cambio favorable del color, durante el almacenamiento en refrigeración de dicho producto.

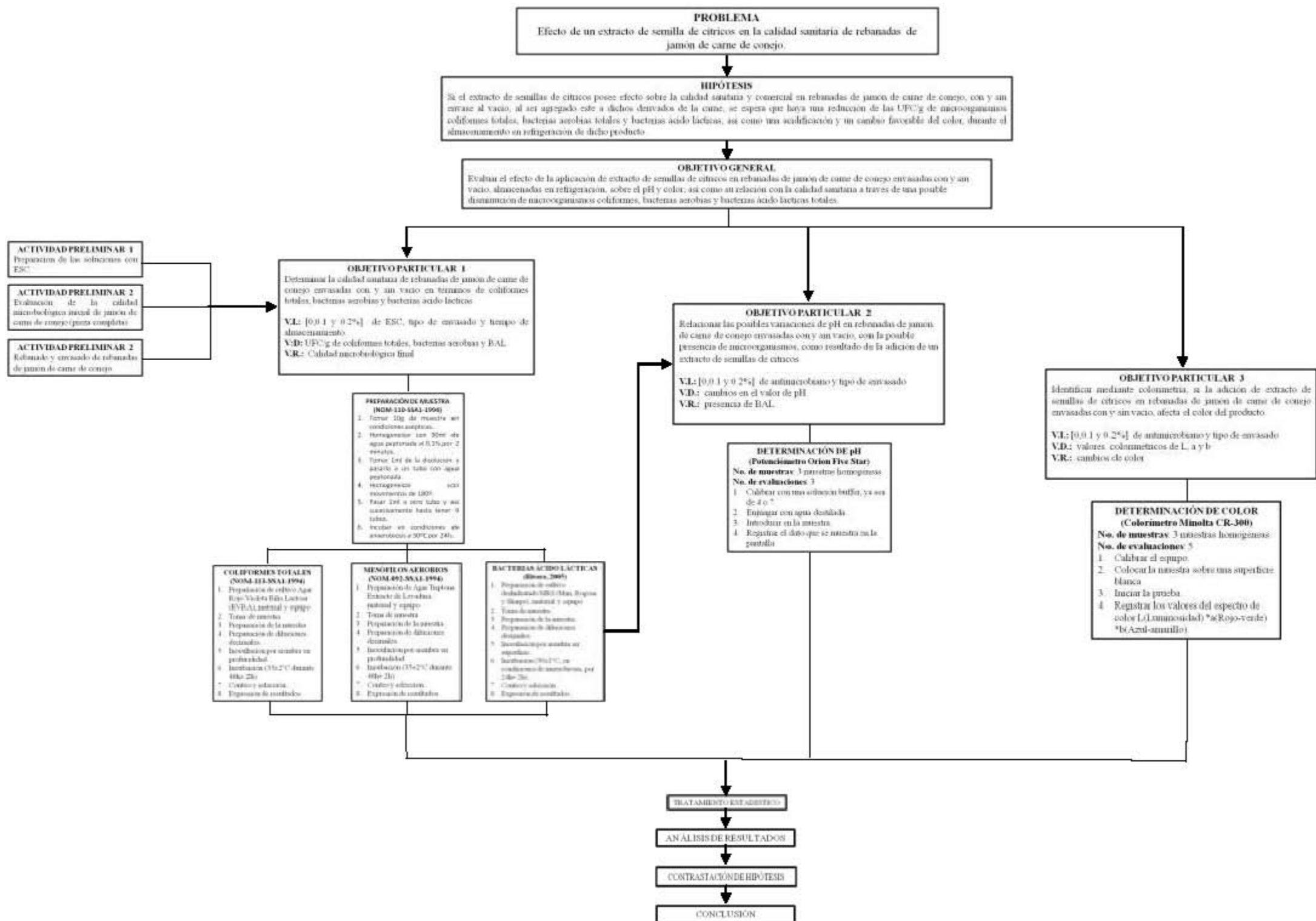
## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de extracto de semillas de cítricos en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con y sin vacío, almacenadas en refrigeración, sobre el pH y color; así como su relación con la calidad sanitaria a través de una posible disminución de microorganismos coliformes, bacterias aerobias y bacterias ácido lácticas totales.

### Objetivo particulares

1. Determinar la calidad sanitaria de rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con y sin vacío en términos de coliformes totales, bacterias aerobias y bacterias ácido lácticas.
2. Relacionar las posibles variaciones de pH en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con y sin vacío, con la posible presencia de microorganismos, como resultado de la adición de un extracto de semillas de cítricos.
3. Identificar mediante colorimetría, si la adición de extracto de semillas de cítricos en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con y sin vacío, afecta el color del producto.



# **CAPÍTULO 2**

# **METODOLOGÍA**

# **EXPERIMENTAL**

## **2.1 MATERIALES Y MÉTODOS**

En el siguiente capítulo se establecen las condiciones de trabajo, las variables involucradas, las pruebas efectuadas y el análisis estadístico utilizado durante el desarrollo de la etapa experimental.

### **2.1.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES CON ANTIMICROBIANO (EXTRACTO DE SEMILLA DE CÍTRICOS)**

Se prepararon dos soluciones con antimicrobiano de 100ml c/u, para ello se agregó ESC comercial (de toronja y naranja), con propiedades antimicrobianas, al 0.01% ó 0.02% respectivamente, en agua destilada estéril y se agitó hasta que se disolviera completamente el polvo. Las soluciones ya preparadas se vertieron en un recipiente estéril con aspersor.

### **2.1.2 REBANADO DE JAMÓN DE CARNE DE CONEJO**

Para esta actividad se utilizó una pieza de jamón de carne de conejo de 2.555 kg, elaborada en el Taller de productos cárnicos de la FES Cuautitlán, cuya fecha de caducidad se encontraba en el límite establecido; esto con la finalidad de observar si la aplicación de antimicrobiano puede prolongar su vida de anaquel y/o mantener la calidad sanitaria; ya que en ese periodo es más susceptible al crecimiento microbiano.

Previó al uso de la rebanadora, ésta se lavó y desinfecto siguiendo una secuencia de 4 pasos: (1) enjuague con suficiente agua, (2) lavado con detergente para retirar el exceso de suciedad, (3) enjuague con abundante agua, (4) aplicación de desinfectante (cloro, 200 ppm).

A la pieza completa de jamón se le retiró la funda y se rebanó toda en piezas de 0.5 cm de espesor.

### **2.1.3 ENVASADO DE REBANADAS DE JAMÓN DE CARNE DE CONEJO**

Dentro de los envases (Ziploc™ y Cryovac™), se asperjó 1ml de la solución con antimicrobiano correspondiente a 0.01% ó 0.02 % y se introdujeron las rebanadas. El envase ziploc se cerró con el cierre dentado que posee; mientras que, el de Cryovac™, se selló herméticamente con vacío (Envasadora Mod. A300/16). Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C durante 7 días (Figura 4).

Cabe mencionar que un tercio del total de las rebanadas se colocó dentro de los envases sin solución antimicrobiana, consideradas como testigo (concentración 0%).

La Tabla 9 contiene la relación de todos los tratamientos utilizados en las rebanadas de jamón de carne de conejo.

**Tabla 9. Tratamientos y variables aplicadas en la experimentación.**

	Concentración de ESC	Tipo de envasado
<b>Tratamiento 1</b>	0%	con vacío
<b>Tratamiento 2</b>	0%	sin vacío
<b>Tratamiento 3</b>	0.01%	con vacío
<b>Tratamiento 4</b>	0.01%	sin vacío
<b>Tratamiento 5</b>	0.02%	con vacío
<b>Tratamiento 6</b>	0.02%	sin vacío

#### 2.1.4 MÉTODO PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

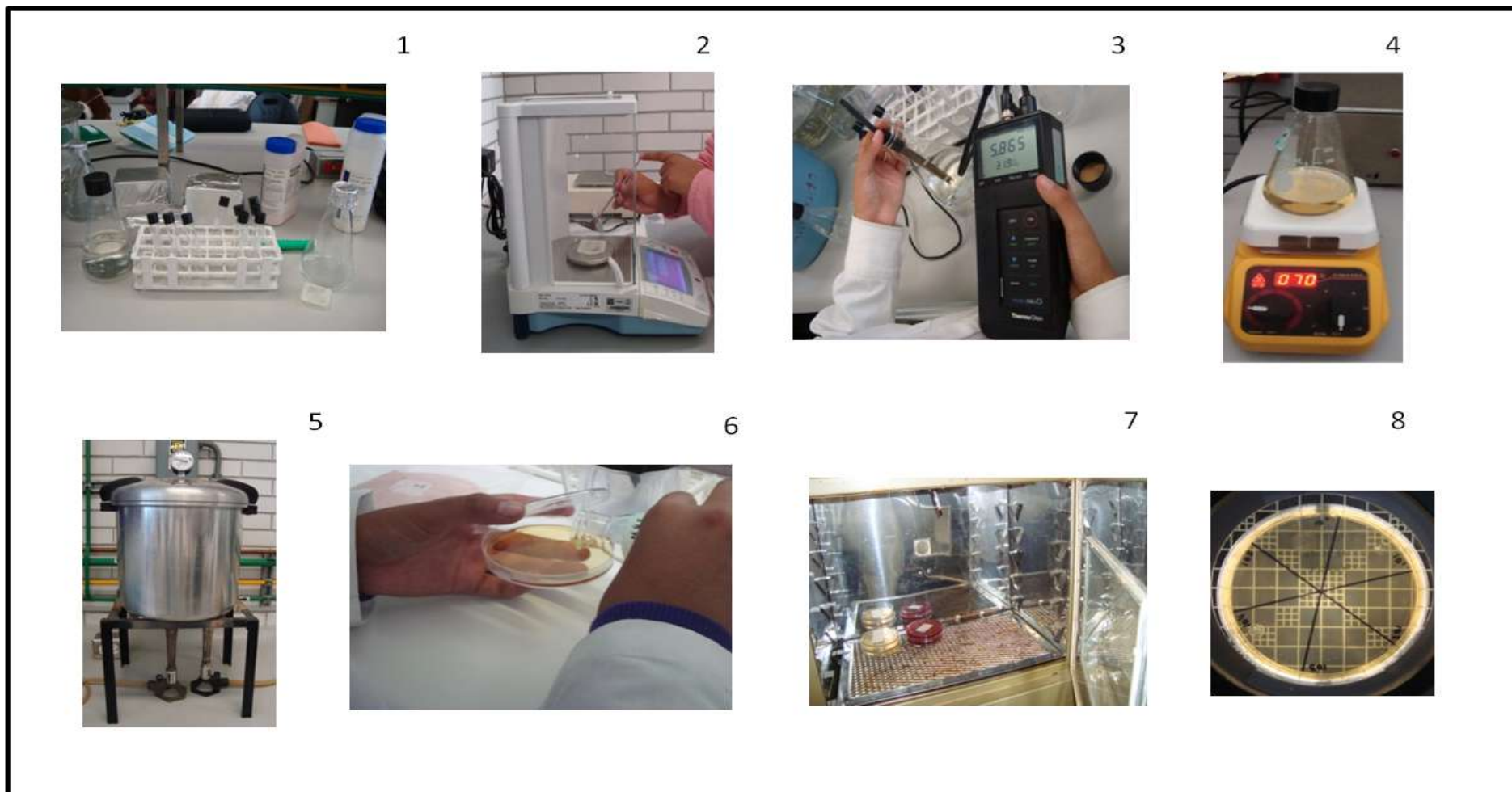
En seguida se describen los métodos para el análisis microbiológico de las rebanadas de jamón de carne de conejo, equipos y utensilios empleados durante la experimentación; todo ello en base a la NOM-092-SSA1-1994.-Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa; NOM-110-SSA1-1994.-Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico; NOM-113-SSA1-1994.-Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa; y Rivera, 2005.

##### 2.1.4.1 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE BAL

La preparación del medio para la determinación de BAL se realizó, de acuerdo al método establecido por Rivera en 2005 de la siguiente manera: en un matraz Erlenmeyer de 500ml se agregaron 160ml de agua destilada y 11.2g de cultivo deshidratado MRS (Man, Rogosa y Sharpe); se dejó en reposo durante 10 minutos. El matraz Erlenmeyer se calentó y se agitó hasta obtener un medio translúcido. El agar se esterilizó, en autoclave, a una temperatura de  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Una vez esterilizado, el agar, se enfrió hasta  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  (en campana de flujo laminar); después en 14 cajas Petri de plástico estériles (por cada tratamiento) previamente identificadas, se vertió de 15 a 20ml de medio y se dejaron reposar para que solidificaran. Las cajas Petri con cultivo gelificado se invirtieron y se incubaron a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2\text{h}$  para una prueba de esterilidad (Figura 5)



Figura 4. Procedimiento para el rebanado, aplicación del extracto de semillas de cítricos y envasado de las rebanadas de jamón de carne de conejo.



**Figura 5. Secuencia para la preparación de medio por el método de superficie.**

#### **2.1.4.2 PREPARACIÓN DE AGUA PEPTONADA**

La preparación del agua peptonada se hizo de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994. En un matraz Erlenmeyer se agregaron 150ml de agua destilada, 0.15g de peptona y 1.275g de cloruro de sodio; se mezcló con un agitador hasta que se disolvieron completamente los polvos y la solución quedara homogénea. Se midió el pH (potenciómetro ThermoOrion 290) y se estandarizó con hidróxido de sodio 0.1N a un valor de 7.0; en tubos de ensaye de 16 x 150mm con tapón de rosca, se vertieron 9ml de agua peptonada en cada uno, hasta completar cinco diluciones decimales; a cada uno se le colocó una etiqueta con la descripción correspondiente de lo que contenía.

#### **2.1.4.3 PREPARACIÓN DE AGAR PARA DETERMINAR COLIFORMES TOTALES EN PLACA**

La preparación del agar rojo-violeta-bilis-lactosa (RVBA) se realizó en base al procedimiento establecido en la NOM-113-SSA1-1994. En un matraz Erlenmeyer se agregaron 160ml de agua destilada y 6.64g de cultivo deshidratado RVBA; se mezcló el medio de cultivo deshidratado con el agua, se dejó en reposo por algunos minutos y se ajustó el pH con hidróxido de sodio 0.1N hasta 7.4 (de acuerdo a instrucciones del fabricante). Se calentó con agitación constante hasta tener un medio translúcido y se dejó hervir durante 2 minutos. Se esterilizó en autoclave a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Se enfrió a  $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  en baño de agua y se mantuvo a ésta temperatura hasta antes de su uso.

#### **2.1.4.4 PREPARACIÓN DE AGAR PARA DETERMINAR CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA**

Conforme a la NOM-092-SSA1-1994.-Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, se preparó el agar para cuenta estándar. Se suspendieron, en un matraz Erlenmeyer con 160ml de agua destilada, 0.4g de extracto de levadura, 0.8g de bacto triptona, 0.16g de dextrosa anhidra y 2.4g de agar bacteriológico; se dejó en reposo por algunos minutos. Se calentó con agitación constante hasta tener un medio translúcido y se dejó hervir durante 2 minutos. Se esterilizó en autoclave a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Se ajustó el pH a  $7 \pm 0.2$  a  $25^\circ\text{C}$ . Debido a que el medio de cultivo se utilizaría inmediatamente, se mantuvo en baño de agua a  $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .



#### 2.1.4.5 ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL

En autoclave se colocaron los matraces Erlenmeyer con agar y agua peptonada, los tubos de ensaye, la probeta graduada, 2 cajas de puntas para micropipetas de 1ml y 20 $\mu$ L cada una (previamente envueltas en papel), 1 frasco de puntas de plástico de 10ml y 1 matraz Erlenmeyer de 250ml lleno de agua destilada. Se cerró la autoclave y se esterilizó el material a una temperatura de  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 minutos.

#### 2.1.4.6 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En un recipiente de plástico previamente lavado y desinfectado, se colocó una solución de cloro a 200ppm (ver ANEXO I); se lavaron cuchillos, vasos y tapas de la licuadora y se sumergieron durante 20 minutos en la solución de cloro. Después, dentro de la campana de flujo laminar y con material estéril, se tomaron 10g de jamón de carne de conejo, se colocaron dentro del vaso de licuadora estéril y se agregaron 90ml de agua peptonada; esto se licuó de 1 a 2 minutos hasta obtener una suspensión completa y homogénea, permitiendo que las partículas grandes se sedimentaran.

#### 2.1.4.7 SEMBRADO EN SUPERFICIE

Se utilizaron las cajas Petri con medio MRS, que ya habían pasado la prueba de esterilidad. Estas cajas se dividieron en 3 secciones (en la base) y a cada parte se marcó con la dilución correspondiente; se colocaron 20 $\mu$ L de cada dilución decimal y se dejaron reposar unos minutos. Posteriormente las cajas se invirtieron y se incubaron en condiciones de anaerobiosis (Gas-Pack™) a 32°C por 48h (Rivera, 2005) (Figura 6).

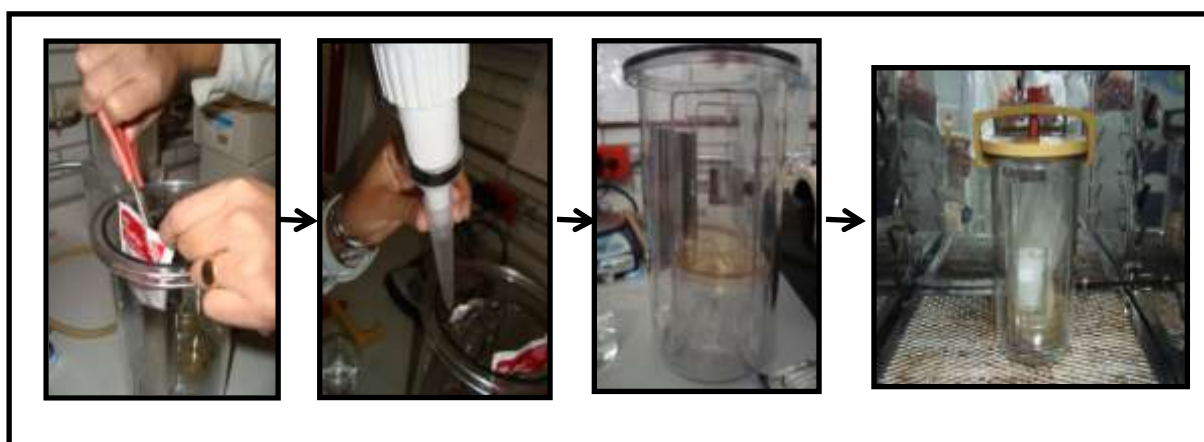


Figura 6. Sistema de anaerobiosis Gas Pack™

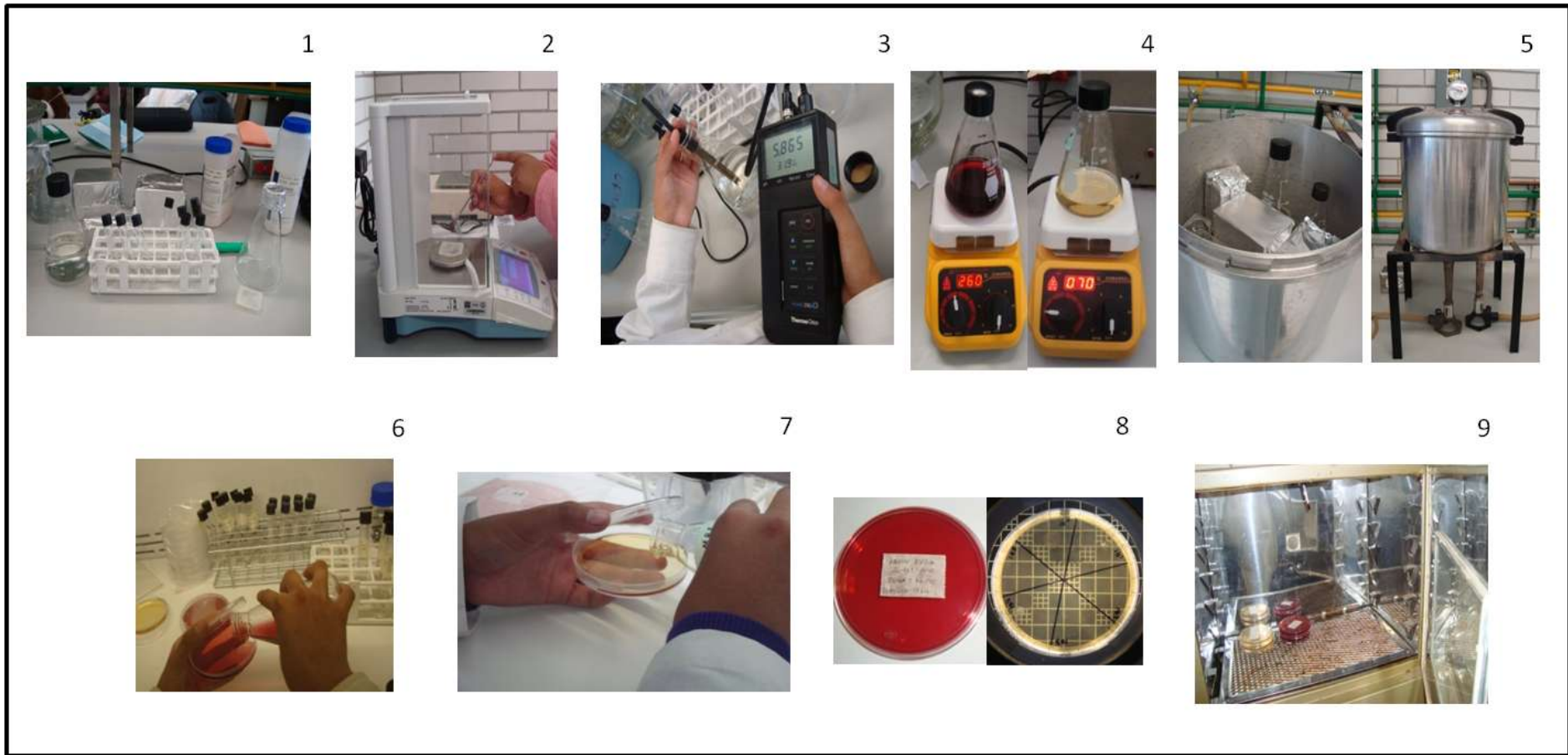
#### 2.1.4.8 SEMBRADO EN PROFUNDIDAD

Una vez sedimentadas las partículas grandes de la suspensión homogénea de la muestra, se prepararon cinco diluciones decimales; es decir, se transfirió 1ml de la dilución primaria a un tubo de ensaye que contenían 9ml de diluyente estéril (agua peptonada).

Las cajas estériles se marcaron con los datos pertinentes y se distribuyeron en la mesa de trabajo (debajo de la campana de flujo laminar) de manera que la inoculación, la adición de medio de cultivo y homogenización se pudiera realizar de forma cómoda y libre.

En las cajas Petri se colocó 1ml de cada dilución hasta completar cinco diluciones decimales; se vertieron de 10 a 15 ml de medio (RVBA para coliformes totales y Triptona-Extracto de levadura para cuenta estándar) a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ . El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el tiempo en que se vertió el medio de cultivo no excedió 20 minutos. Posteriormente, sobre una superficie lisa y horizontal, se mezcló el inóculo con el medio, sin mojar la cubierta de las cajas, hasta lograr una completa incorporación; en seguida, las cajas se dejaron solidificar. Sólo en el caso de medio RVBA (coliformes totales), se vertieron aproximadamente otros 4ml del medio a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  y nuevamente se dejó solidificar (NOM-110-SSA1-1994).

Es importante mencionar que se incluyó una caja sin inóculo por cada medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad. Las cajas se invirtieron y se incubaron a  $35^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2\text{h}$  para RVBA y  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $48 \pm 2\text{h}$  para agar Triptona-Extracto de levadura (cuenta estándar). Todo lo anterior se efectuó por duplicado.

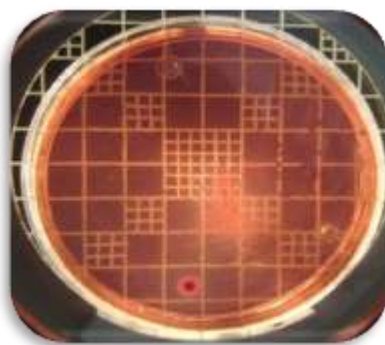


**Figura 7. Secuencia para determinar coliformes totales y mesófilos aerobios por el método de profundidad.**

### 2.1.4.9 CONTEO DE MICROORGANISMOS

Para el conteo de los microorganismos se utilizó un contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

En el caso de coliformes totales se consideraron las colonias de color rojo oscuro (típicas) que estaban rodeadas de un halo de precipitación de color rojo claro o rosa (**Figura 8**). Durante el conteo, primero se separaron las placas que contenían entre 15 y 150 colonias características; se calculó el número de microorganismos, por mililitro o por gramo de producto y se multiplicó el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente. Las placas que tenían menos de 15 colonias, se reportaron con el número obtenido seguido de la dilución correspondiente (NOM-092-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994).



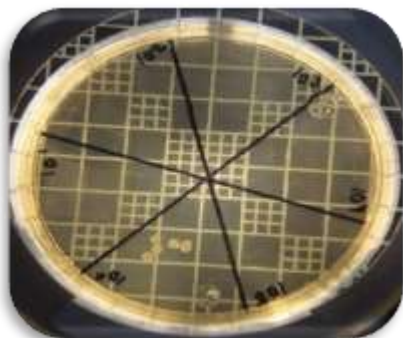
**Figura 8. Colonias de coliformes totales en medio RVBA.**

El conteo de mesófilos aerobios, se determinó separando las placas que contenían entre 25 y 250 colonias características ver **Figura 9**; se calculó el número de microorganismos, por mililitro o por gramo de producto y se multiplicó el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente. Las placas que tenían menos de 25 colonias, se reportaron con el número obtenido seguido de la dilución correspondiente (NOM-092-SSA1-1994).



**Figura 9. Colonias de mesófilos aeróbios en medio tripton extracto de levadura.**

Las colonias que se deben tomar en cuenta para el conteo de bacterias ácido lácticas son como las mostradas en la Figura 10, con un color entre amarillo claro y blanco; se separaron las placas que tenían presencia de éstas colonias, para posteriormente contar y de acuerdo a la dilución correspondiente, obtener las UFC/g.



**Figura 10. Colonias de bacterias ácido lácticas en medio MRS.**

De las cajas Petri que presentaron un crecimiento de microorganismos coliformes totales y mesófilos aerobios, se eligieron aquellas cuyas colonias eran las de mayor tamaño, para realizar una tinción de Gram. Se fijó a la llama las bacterias extendidas en un portaobjetos limpio; se tiñó con una solución de colorante básico cristal violeta dejando actuar durante 2 minutos y se enjuagó con agua; en seguida con un tratamiento con solución de Lugol (yodo/ioduro de potasio) se aplicó una gota y se dejó actuar durante 1 minuto; posteriormente se aplicó un tratamiento con alcohol-cetona y se enjuagó inmediatamente con agua y con una coloración de contraste Safranina durante 1 minuto (Figura 11). Los portaobjetos se dejaron secar y se observaron con un Microscopio (Olympus CX31) para identificar la morfología (forma y tinción de Gram) de los microorganismos presentes al final de la experimentación.

#### **2.1.4.10 MÉTODOS RÁPIDOS PARA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, *E. coli* Y CUENTA TOTAL**

En el tubo que contiene reactivo se vertieron 9ml de agua destilada estéril y se agitó suavemente; en seguida se agregó muestra de las diluciones correspondientes para determinar coliformes totales y *E. coli*(primera dilución); así como para cuenta total (tercera dilución); y se agitó de nuevo en forma suave para no generar burbujas. El contenido del tubo se vertió sobre el centro de la charola SimPlate™ y está se giró de un lado a otro para llenar todos los pocillos. Una vez llena la charola y libre de burbujas, ésta se inclinó a 90°, con el algodón hacia abajo, para retirar el exceso de líquido por absorción. Las charolas se invirtieron boca

abajo y se apilaron una sobre otra, dentro de la incubadora, a una temperatura de  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24-28h (**Figura 12**).

Todo lo anteriormente mencionado se repitió para cada uno de los tratamientos aplicados en las rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con y sin vacío, durante los días 0, 1 y 7.

Cabe mencionar que, para el caso de coliformes totales y *E.coli* se realizó la prueba con la primera dilución; ya que de acuerdo a la NOM-093-SSA1-1994 el límite máximo permitido es  $<10\text{UFC/g}$ ; mientras que, para cuenta total (mesófilos aerobios) se permite un máximo de 60 000 UFC/g en base a la NOM- 213- SSA1-2002. Por ello se decidió usar la tercera dilución. La secuencia de cálculo para obtener las UFC/g es el siguiente:

1. Contar los pozos positivos de la placa (pozos teñidos de color rosa).
2. Ir a la Anexo XIII, y; de acuerdo al número de pozos positivos, leer la población que corresponde.
3. Multiplicar la población por el número de dilución, y se obtienen las UFC/g de la muestra.

#### **2.1.4.11 EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA SUPERFICIE DE LA REBANADORA**

Con la finalidad de identificar si el equipo presentaba importantes cantidades de microorganismos perjudiciales, se realizó un análisis microbiológico a la superficie de la rebanadora. En dos tubos de ensaye con tapa se agregaron, a cada uno, 9 ml de agua peptonada y se insertó un hisopo; se esterilizaron los tubos en autoclave a una temperatura de  $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Antes de lavar y desinfectar la cuchilla de la rebanadora, con uno de los hisopos se frotó una superficie que abarcó de 24-30cm y se guardó en el tubo de ensaye. En seguida se lavó y desinfectó la rebanadora, con el otro hisopo se muestreó la superficie, de la misma forma, ver **Figura 13**. Se hizo una determinación de coliformes totales ( $35^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm 2\text{h}$ ) y de bacterias aerobias ( $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por  $48\pm 2\text{h}$ ) por cuenta en placa cómo se explicó anteriormente (Norma y métodos rápidos).





Figura 11. Desarrollo de la tinción de Gram para los microorganismos obtenidos en las pruebas microbiológicas.

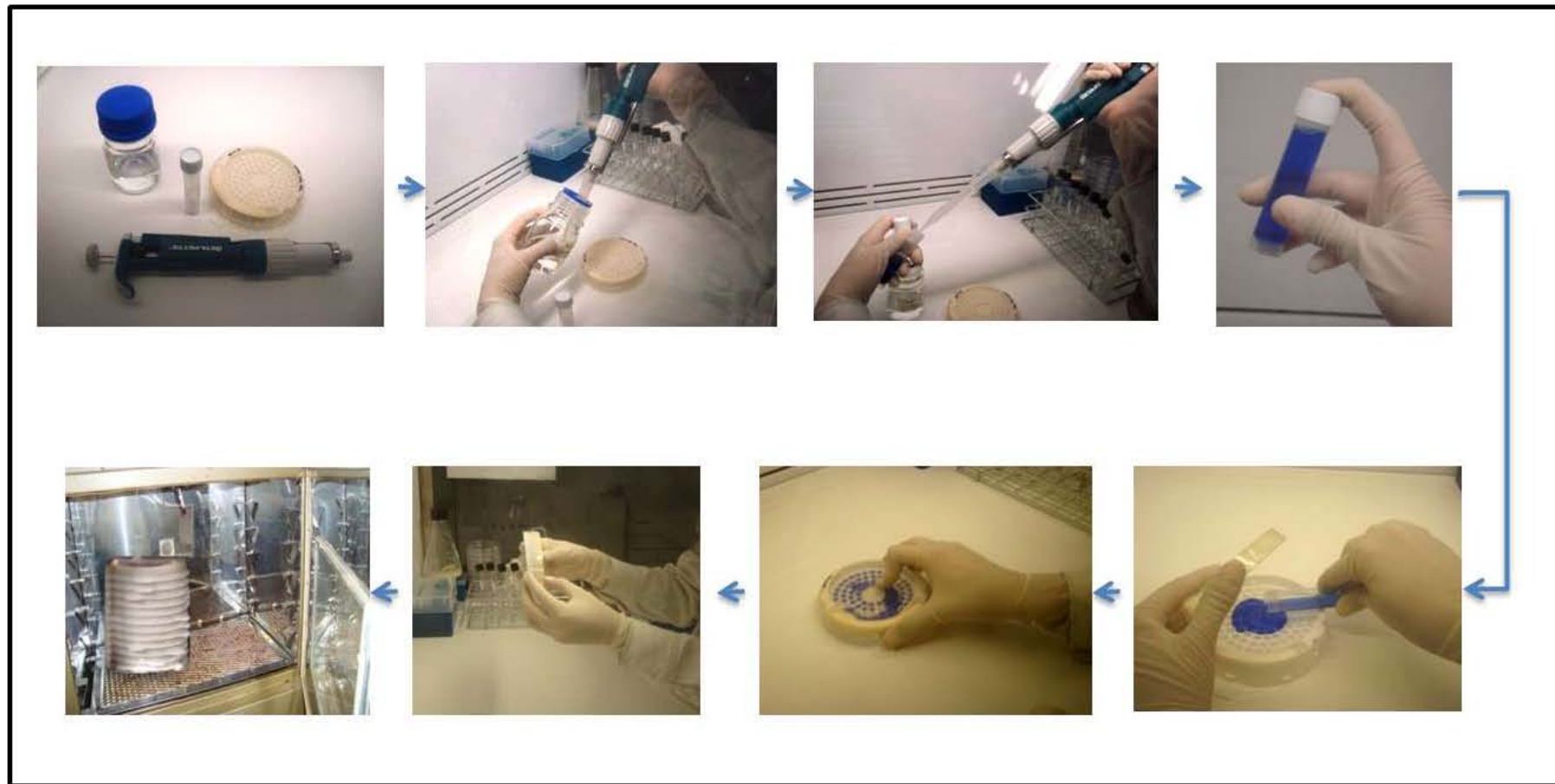


Figura 12. Secuencia de uso para métodos rápidos (SimPlate™)



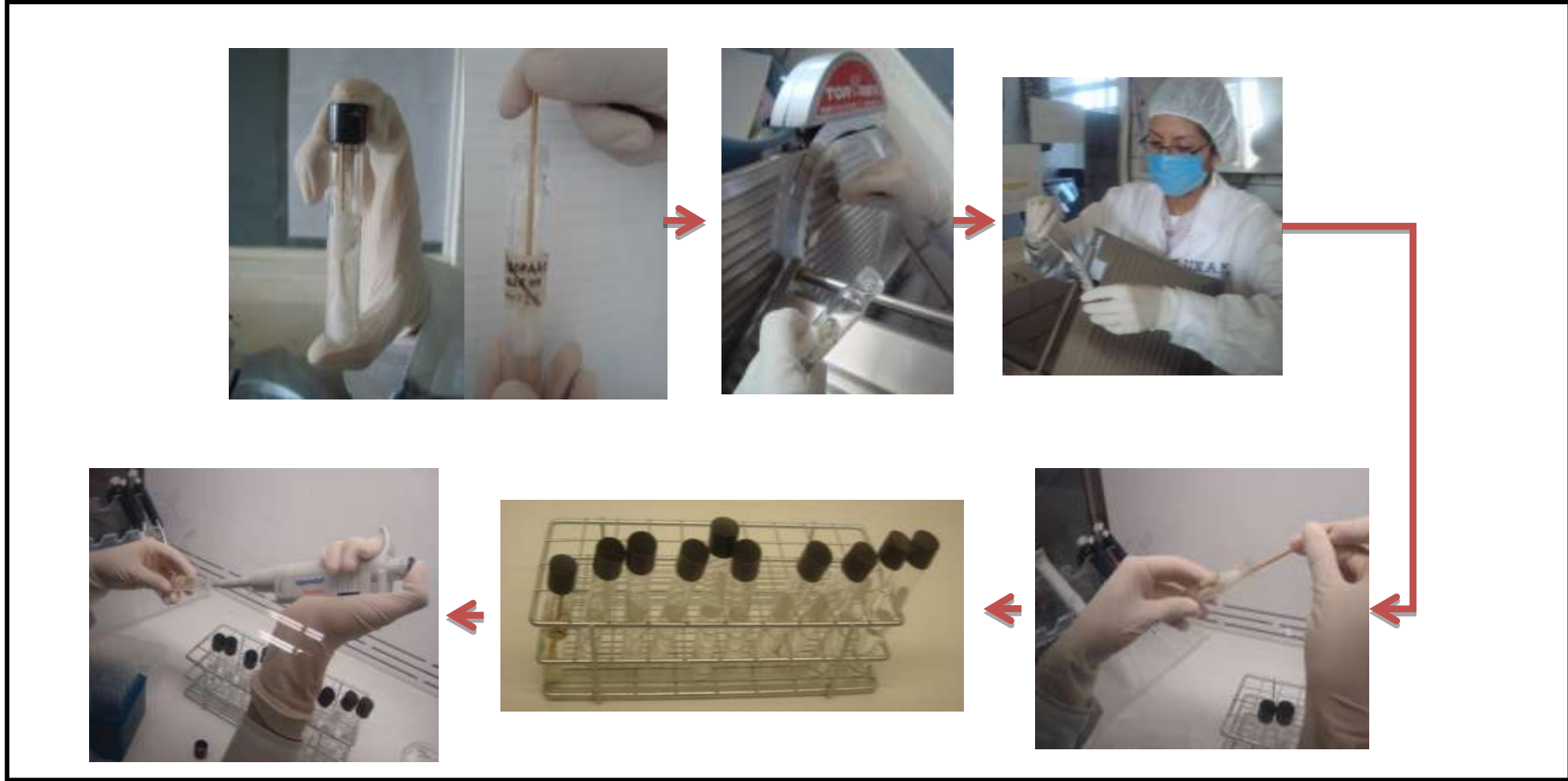


Figura 13. Procedimiento para el muestreo de la rebanadora

### 2.1.5 MEDICIÓN DE pH

La determinación de pH se realizó con un potenciómetro de punción OrionFiveStar, ver **Figura 144**. Primero se montó el potenciómetro colocando el electrodo de punción a la base y ésta última se conectó a la toma de corriente. Al electrodo se le retiró el tapón que contiene la solución calibradora y se enjuagó con agua destilada; se insertó en la muestra de las rebanadas de jamón (sin envase) tratando de no tocar la superficie sobre la cual se encuentra la muestra, una vez estabilizado el valor en la pantalla, se tomó nota del valor. El electrodo se retiró y se enjuagó de nuevo, con agua destilada, para una nueva lectura. Se efectuaron 3 repeticiones por tratamiento para tener un mayor nivel de confianza. Esto se llevó a cabo para todos los tratamientos (0, 0.01 y 0.02% de antimicrobiano con y sin vacío) los días 0, 1 y 7.



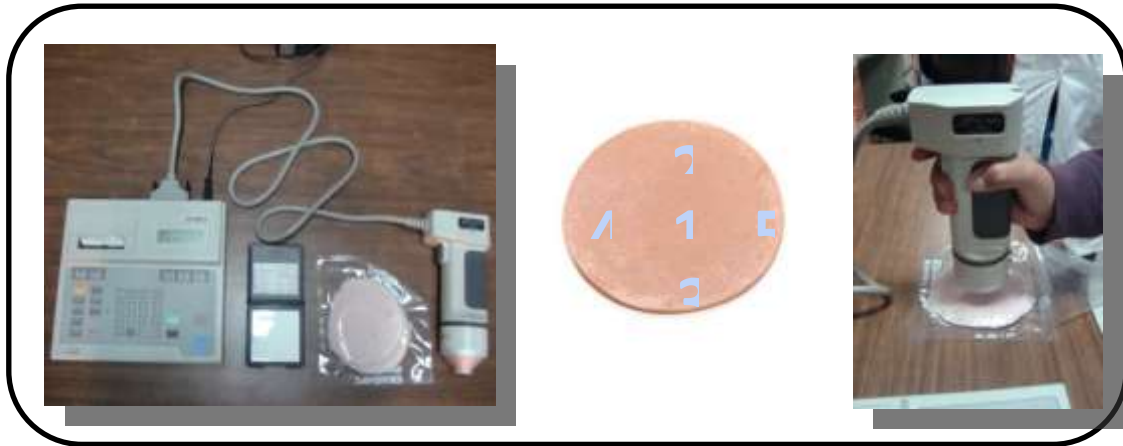
**Figura 14. Prueba de pH en rebanadas de jamón de carne de conejo.**

### 2.1.6 EVALUACIÓN DE COLOR

Se utilizó un colorímetro Minolta CR-300, el cual, para poder iniciar la prueba, se calibró con valores específicos de:  $y=92.5$   $x=0.3134$   $y'=0.3193$ ; enseguida se eligieron los parámetros a evaluar, en este caso se seleccionan L (luminosidad) a (cromaticidad) y b (azul-amarillo). Una vez calibrado el equipo y seleccionados los parámetros se procede a retirar el envase de la rebanada de jamón; debido a que el jamón no posee un color homogéneo se tomaron 5 puntos para hacer la prueba. Se colocó el colorímetro en la superficie de la rebanada en cada uno de los puntos indicados (**Figura 155**), se realizó la prueba y se anotó el valor marcado. La diferencia de color ( $\Delta E$ ) para cada muestra fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$\text{COLOR}=\Delta E=\sqrt{(\Delta L^2+\Delta a^2+\Delta b^2)}$$

La prueba de colorimetría se llevó a cabo en todos los tratamientos en los días marcados (1 y 7).



**Figura 15. Prueba de colorimetría en rebanadas de jamón de carne de conejo.**

### **2.1.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados obtenidos se analizaron en el programa estadístico (DesigExpert 8.0.4 y MiniTab 15) mediante un análisis de varianza (ANOVA), en el cual se incluyó un análisis factorial ( $p < 0.05$ ) para evaluar los cambios de UFC/g de microorganismos (coliformes totales, mesófilos aerobios y BAL), pH y color.

# **CAPÍTULO 3**

# **RESULTADOS Y**

# **DISCUSIÓN**

### 3.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se presentan las gráficas con las UFC/g obtenidas en los análisis microbiológicos realizados por norma y métodos rápidos, en la pieza de jamón de carne de conejo y en las rebanadas, para el conteo de coliformes totales, mesófilos aerobios y bacterias ácido lácticas presentes. Los valores correspondientes a los resultados se encuentran en el apartado de Anexos.

#### 3.1.1 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, MESÓFILOS AEROBIOS Y BAL EN MATERIA PRIMA (NORMA Y MÉTODOS RÁPIDOS)

En las Tablas 10-12 se exponen los resultados obtenidos en el análisis microbiológico de la pieza de jamón antes de retirarle, por completo, la funda y ser rebanada.

**Tabla 10. Cálculo de los valores de la cuenta en placa de coliformes totales en materia prima (ensayo por duplicado)**

Muestra	Dilución			UFC/g
	1:10	1:100	1:1000	
Materia Prima	0	0	0	<10
	0	0	0	

**Tabla 11. Cálculo de los valores de la cuenta en placa de mesófilos aerobios en materia prima (ensayo por duplicado).**

Muestra	Dilución			UFC/g
	1:10	1:100	1:1000	
Materia Prima	0	0	0	<10
	0	0	0	

**Tabla 12. Cálculo de los valores de bacterias ácido lácticas en materia prima (ensayo por duplicado).**

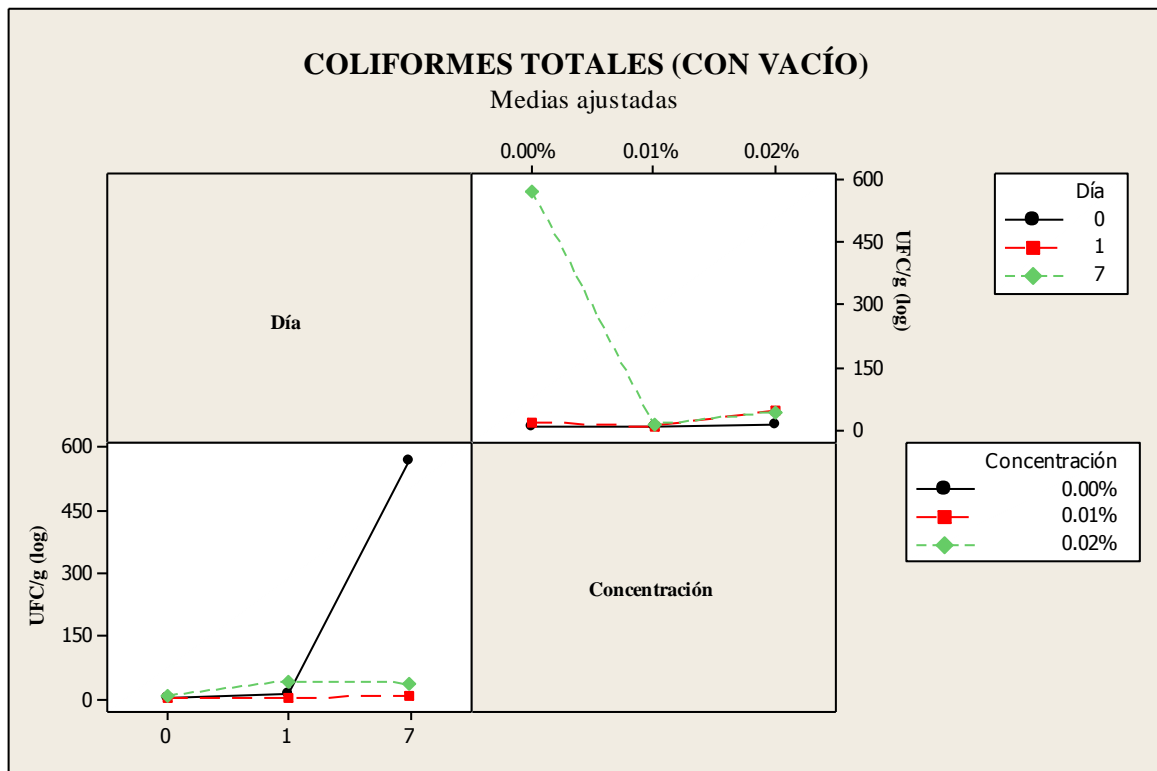
Muestra	Dilución			UFC/g
	1:10	1:100	1:1000	
Materia Prima	0	0	0	<10
	0	0	0	

Los resultados de las 3 tablas (10-12), reflejan que la pieza de jamón no tiene presencia de coliformes totales, mesófilos aerobios y BAL, esto indica que la calidad sanitaria del jamón de carne de conejo, empleado en este proyecto para evaluar algunas condiciones de barreras y su impacto en la vida útil, fue elaborado mediante Buenas Prácticas de Manufactura; ya que no hubo crecimiento de microorganismos al realizarle cuenta total en placa. Es muy

importante que la elaboración de productos cárnicos se lleve a cabo bajo condiciones higiénicas. Denis y col. en 2006 establece que un bajo número de coliformes es un indicador propio de la higiene y buenas prácticas de manufactura. La ausencia de BAL indica que la materia prima no presenta alteraciones de tipo físicas ni químicas (usualmente generadas por este tipo de microorganismos); así mismo, al tratarse de una pieza de jamón cocida y no madurada, no se suscitó una fermentación de ácido láctico. (Fuente y Barboza, 2010).

### 3.1.2 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES EN REBANADAS DE JAMÓN DE CARNE DE CONEJO (NORMA Y MÉTODOS RÁPIDOS)

La Figura 16 muestra las gráficas de interacciones, referentes a la variación de la población de coliformes totales, en las rebanadas de jamón de carne de conejo con los diferentes tratamientos y envasadas con vacío. Cabe mencionar que después del rebanado todos los tratamientos presentaron 10 UFC/g.

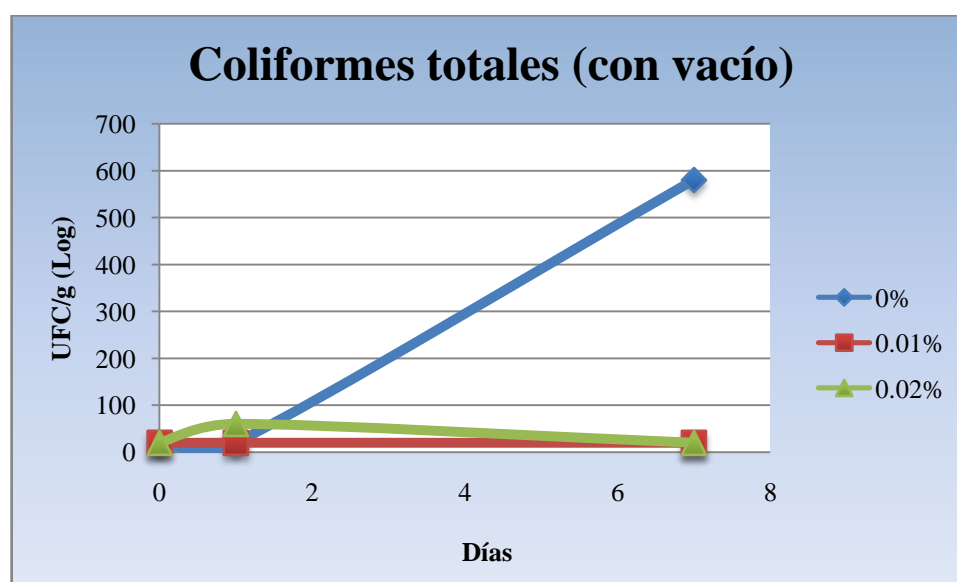


**Figura 16. UFC/g de Coliformes totales en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con vacío.**

Se observa en la gráfica que el tratamiento 1 (0% de antimicrobiano) del día 0 al 1 tuvo un crecimiento de 10 UFC/g y del día 1 al 7 se incrementó hasta alcanzar un máximo de 600 UFC/g. El tratamiento 5 (0.02%) provocó un aumento de 40 UFC/g (del día 0 al 1) y una

disminución de 10 UFC/g (del día 1 al 7). Por otra parte, el tratamiento 3 (0.01%) se mantuvo constante en 10 UFC/g durante los 7 días; este valor fue menor comparado con los otros 2 tratamientos (Anexo II). De acuerdo al análisis factorial ( $p < 0.05$ ) sí hay una diferencia significativa provocada por la variación de las condiciones usadas (concentración de antimicrobiano y tiempo de contacto); es decir, el cambio de concentración, de día o ambos tiene un efecto directo en el crecimiento de coliformes totales (Anexo III tabla de ANOVA). La combinación de una concentración de 0.01% de antimicrobiano y un periodo de contacto de 7 días, permite que éste desarrolle efectivamente su capacidad para actuar sobre la pared celular de los microorganismos presentes en el producto y de esta forma se genere una restricción en el desarrollo de UFC/g.

Por otro lado, en la Figura 17 se muestran los datos obtenidos por el método rápido Simplate™ en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con vacío.

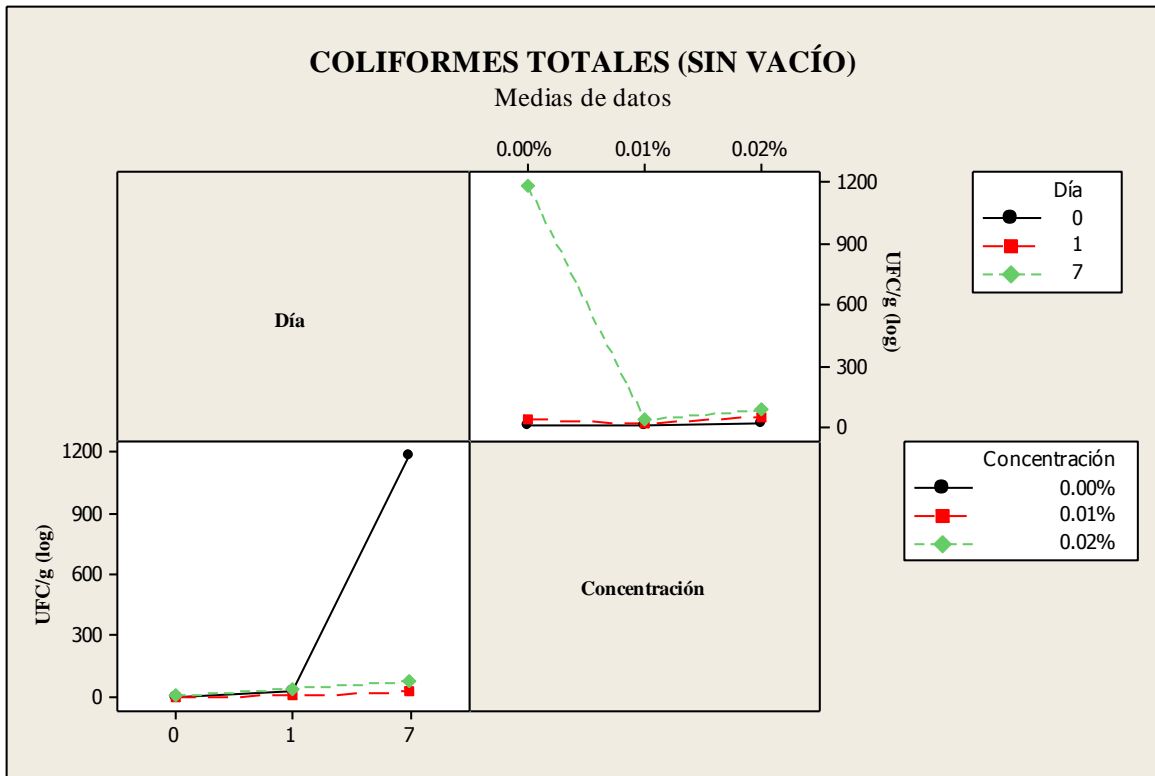


**Figura 17. UFC/g de Coliformes totales obtenidas por Simplate™ en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con vacío.**

La tendencia mostrada en la gráfica anterior es la misma que la proyectada en obtenida por el método de Norma (Anexo IV); así mismo, la diferencia en el número de UFC/g entre un método y otro es mínima, debido a esto las pruebas rápidas son una alternativa viable de uso. De manera íntegra, se confirma que, el contacto durante 7 días del antimicrobiano a una concentración de 0.01% es la combinación que limita el crecimiento de los microorganismos.

La Figura 18 muestra las gráficas de interacciones, referentes a la variación de la población de coliformes totales, en las rebanadas de jamón de carne de conejo con los diferentes

tratamientos y envasadas sin vacío. Es importante mencionar que después del rebanado todos los tratamientos presentaron 10UFC/g.

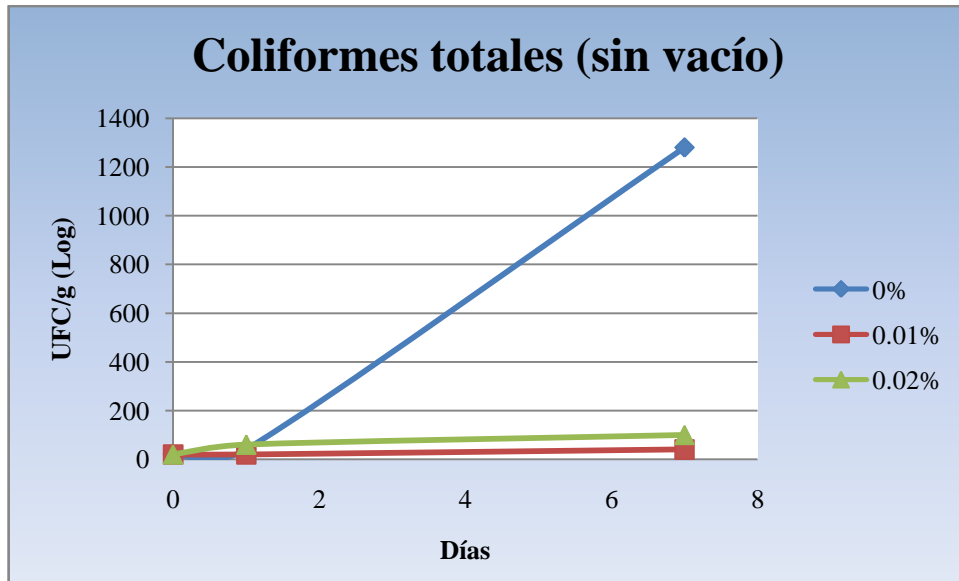


**Figura 18. UFC/g de Coliformes totales en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío.**

En la Figura 18 se puede observar que el tratamiento 2 (0% de extracto de semillas de cítricos) del día 0 al 1 presentó crecimiento de coliformes totales de 10 a 40 UFC/g y del día 1 al 7, se incrementó hasta alcanzar un máximo de 1200 UFC/g. Por otra parte, el tratamiento 4 (0.01%) no tuvo un aumento de coliformes totales del día 0 al 1, pero aumentó 20UFC/g hasta el día 7. En cuanto al tratamiento 6 (0.02%) del día 0 al 1, aumentó de 10 hasta 50 UFC/g y del día 1 al 7, aumentó hasta 80 UFC/g (Anexo V). Una vez realizado en análisis factorial se establece con una  $p < 0.05$  (anexo VI) que existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, del día 0 al 7; ya que, el cambio de concentración de antimicrobiano, el tiempo de contacto y la combinación de ambos producen el aumento o disminución de las UFC/g totales de los microorganismos. Se deduce que la concentración adecuada de antimicrobiano, para el envasado sin vacío, fue de 0.01%.

En la Figura 19 se presentan los datos graficados la gráfica elaborada con los valores obtenidos por el método rápido para rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío.

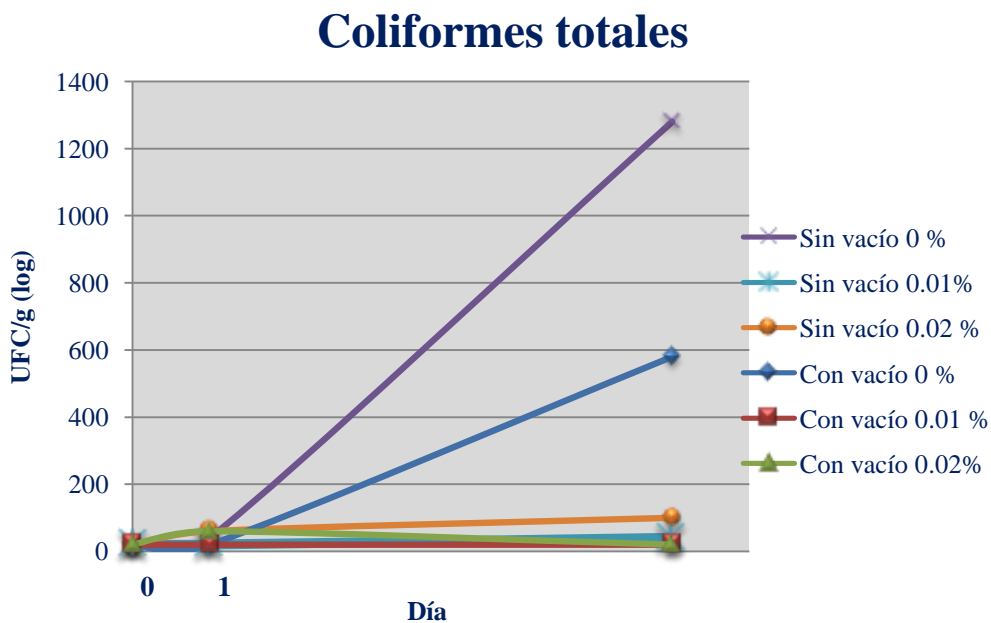




**Figura 19.** UFC/g de Coliformes totales obtenidas por Simplate™ en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío.

Se observa en la gráfica anterior que los valores de UFC/g fueron muy cercanos a los resultados del método de Norma y se observa que la tendencia de crecimiento es la misma. Por otra parte se corrobora que, el mejor tratamiento para el envasado con vacío es el 4 (Anexo VII).

Ahora bien, la Figura 20 muestra una comparación entre los 2 tipos de envasado y las diferentes concentraciones de ESC.

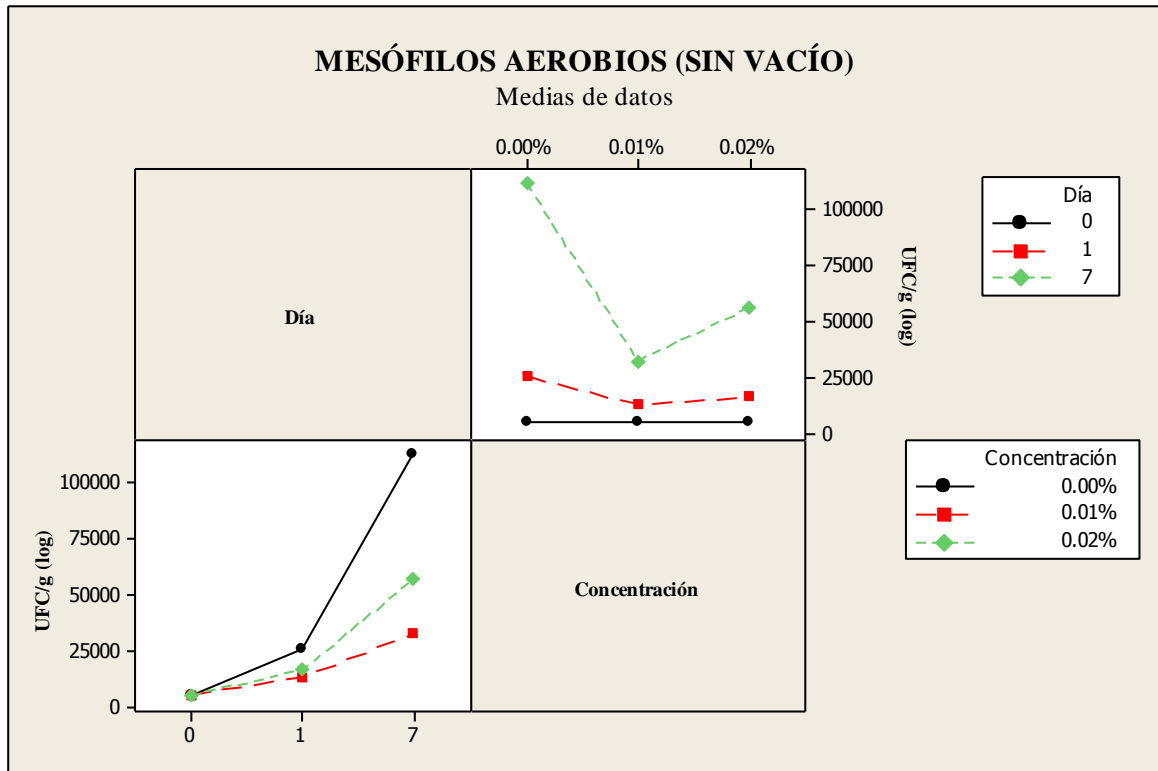


**Figura 20.** Comparación de tratamientos para coliformes totales.

Las barreras utilizadas (adición de ESC, tipo de envasado y refrigeración), en las rebanadas de jamón de carne de conejo, permitieron el control en el desarrollo de coliformes totales y mesófilos aerobios; ya que al inicio las cuentas de coliformes fueron de 10 UFC/g de jamón y los lotes preparados con rebanadas de jamón envasados sin vacío y sin ESC tuvieron un crecimiento de 3 logaritmos, mientras que, con el envasado al vacío se tienen 2 logaritmos. La adición de ESC, tuvo un efecto importante en los lotes experimentales, llegando a reducir entre 2 y 3 log. La combinación del envasado con vacío más la adición de ESC a 0.01%, logró un mayor control, dado que mantuvo 1 log de coliformes totales es decir, el crecimiento se limitó o inhibió durante los 7 días de almacenamiento.

### 3.1.3 DETERMINACIÓN DE MESÓFILOS AEROBIOS EN REBANADAS DE JAMÓN DE CARNE DE CONEJO (NORMA Y MÉTODOS RÁPIDOS)

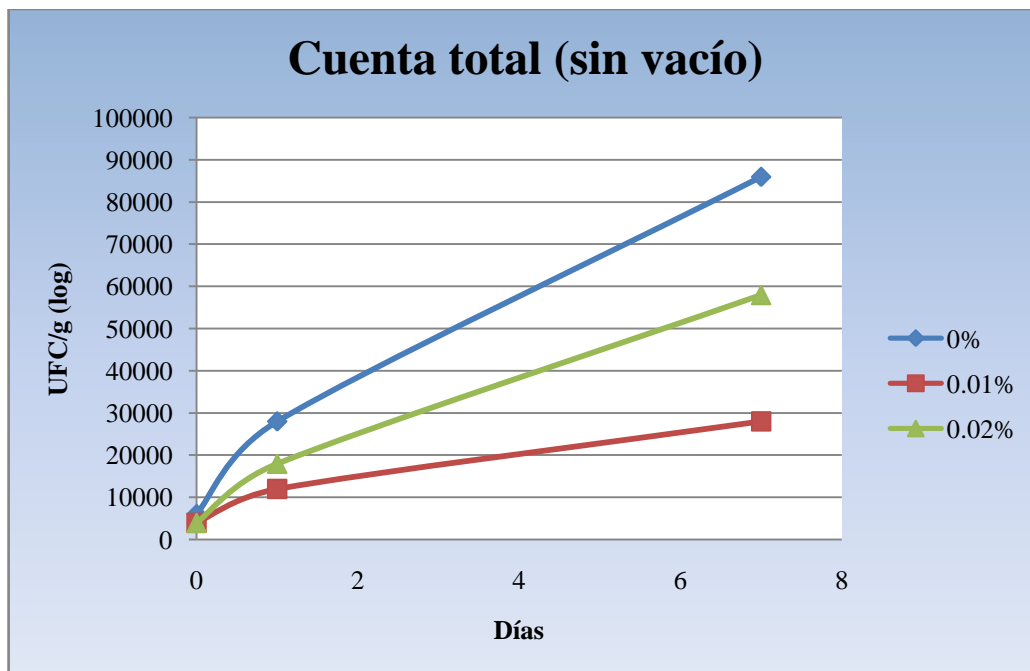
La gráfica siguiente muestra la interacción entre el tiempo y la concentración de antimicrobiano con respecto a la variación de la población de mesófilos aerobios totales, en las rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío. Es importante mencionar que después del rebanado todos los tratamientos (2, 4 y 6) presentaron 5000 UFC/g.



**Figura 21. UFC/g de Coliformes totales en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío.**

En la Figura 21 se puede apreciar que los tratamientos tuvieron la misma tendencia pero en diferentes proporciones; el tratamiento 2 (0% de extracto de semillas de cítricos) tiene un incremento del día 0 al 1 de 21,000 UFC/g y del día 1 al 7 alcanzó un crecimiento de 90,000 UFC/g. La adición de 0.01% de extracto de semillas de cítricos (tratamiento 4) provocó un aumento de 8,000 UFC/g del día 0 al 1 y hasta el día 7 se tuvieron 30,000 UFC/g presentes. El tratamiento 6 (0.02%) del día 0 al 1, aumentó de 5,000 hasta 17,000 UFC/g y del día 1 al 7, presentó otro aumento de la población de mesófilos aerobios hasta 60,000 UFC/g (anexo VIII). A pesar de que la aerobiosis tienen un efecto favorable sobre el crecimiento de mesófilos aerobios, estadísticamente (tabla de ANOVA con una  $p < 0.05$ ) se demuestra que los factores tiempo y concentración de antimicrobiano tienen un alto impacto en la inhibición de la cantidad de UFC/g (anexo IX). A pesar de que en las 3 concentraciones adicionadas de ESC se tienen 3 log, con la concentración de 0.01% se cumple con el límite máximo permitido en la norma (NOM-213-SSA1-2002).

En la Gráfica siguiente (Figura 22) se presentan los valores obtenidos por el método rápido para cuenta total.



**Figura 22. UFC/g de cuenta total obtenidas por Simplate™ en rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío.**

Al igual que para los coliformes totales, la cuenta de mesófilos aerobios por Simplate™, siguió la misma tendencia que el método de Norma; hay una mínima diferencia entre un método y otro (anexo X).

La adición de extractos de semillas de cítricos, permite que sus componentes (linalol y citral) actúen, como lo describen Stadler y col., 1995; Cao y col., 1997; Sakihama y col., 2002; Jiménez del Río y Vélez-Pardo, 2004; Azmi y col., 2006, como un prooxidante de la mitocondria. Estos autores han demostrado que las sustancias prooxidantes penetran a través de la pared celular y la membrana citoplasmática, provocando de esta forma un daño a las membranas mitocondriales por la interrupción y permeabilización generada. La mitocondria, por los cambios en el flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones, producen radicales libres que oxidan y dañan los lípidos, la síntesis de proteínas y de ADN.

Davidson en 2005 demostró que este tipo de ESC's tiene un mayor efecto en las bacterias Gram positivas que en las Gram negativas; debido a esto los géneros más susceptibles al ataque pudieron ser *Micrococcus*, *Lactobacillus* y *Bacillus*. En cuanto al tipo de envasado, Summo y col. (2006) demostraron que la ausencia de oxígeno inhibe el desarrollo de bacterias aerobias como *Moxarella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium*, en las rebanadas de jamón envasadas con vacío se logró extraer el aire que rodeaba al producto, consiguiendo así una atmósfera libre de oxígeno.

La última barrera para la conservación del jamón rebanado, fue el almacenamiento en refrigeración (4°C); con esto se detuvo el crecimiento de microorganismos mesófilos, correspondientes posiblemente a los géneros *Proteus*, *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae* y *E.coli*. Lambert y col. en 2001, estudiaron y comprobaron que la mejor técnica de conservación para preservar las características originales del producto inicial, tanto como sea posible, es la refrigeración; la cual a su vez incrementa la vida de anaquel de los productos cárnicos.

#### **3.1.4 DETERMINACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

En las diferentes concentraciones de ESC no hubo presencia de BAL tanto en las rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con vacío; la ausencia de oxígeno contribuyó a que estos microorganismos no crecieran y produjeran cantidades de ácido láctico que cambiara las características del producto; ya que estos microorganismos representan la causa principal de deterioro en productos cárnicos provocando acidez, decoloración, producción de gas,

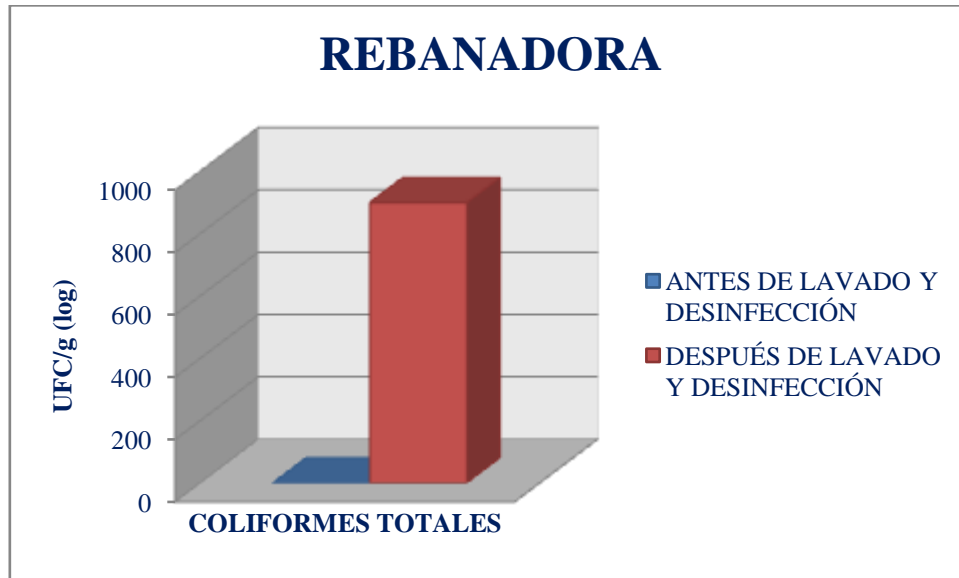
formación de baba y cambios de pH (Chenoll y col., 2007). Ni la concentración ni el tiempo tuvieron un efecto significativo (Tabla 13).

**Tabla 13. Muestra el número total de UFC/g obtenidas en la cuenta en placa de BAL en rebanadas de jamón envasado con vacío (ensayo por duplicado).**

Día	Concentración	UFC/g
0	0%	<10
	0.01%	<10
	0.02%	<10
1	0%	<10
	0.01%	<10
	0.02%	<10
7	0%	<10
	0.01%	<10
	0.02%	<10

**3.1.5 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y MESÓFILOS AEROBIOS EN EQUIPO DE REBANADO (NORMA Y MÉTODOS RÁPIDOS)**

Las siguientes gráficas (figura 23 y 24) muestran los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos, realizados en la superficie de la rebanadora antes y después del lavado y desinfección.



**Figura 23. UFC/g de coliformes totales presentes en la rebanadora antes y después del lavado y desinfección.**

Después del lavado y desinfección aumentó el número de coliformes totales de 10 a 900 UFC/g.



**Figura 24. UFC/g de mesófilos aerobios presentes en la rebanadora antes y después del lavado y desinfección.**

Las UFC/g de mesófilos aerobios incrementó de 10,000 a 50,000 UFC/g.

Durante el desarrollo de los lotes experimentales de esta investigación, el deficiente lavado y desinfección de superficies y equipos efectuado, propició una contaminación cruzada, que pudo haberse generado al utilizar diferentes herramientas como el recipiente que contenía el jabón líquido y la fibra, debido a que eran de uso general y para diferentes actividades, la inconveniencia de esto fue corroborado al realizar un hisopado de superficie de la rebanadora antes y después del lavado, encontrándose títulos mayores en orden de 4 logaritmos, después de utilizar dichos instrumentos.

La diseminación de la contaminación presente de las áreas sucias a las limpias, la repetición de la actividad de lavado de manera inapropiada y la falta de desinfección, pueden ser las responsables del desarrollo de bacterias residuales en la superficie de la rebanadora; ya que después del rebanado hubo presencia de coliformes totales y mesófilos aerobios, lo cual indica que esta operación es un punto crítico de control y afecta directamente la calidad sanitaria del producto final (rebanadas de jamón de carne de conejo). Marth en 1998 recomendó que los equipos de procesamiento de alimentos deben ser diseñados y estructurados para que sean: 1) inertes al producto; 2) con superficies de contacto lisas y no porosas; 3) de fácil limpieza y desinfección; 4) con un compartimiento accesible de drenado; 5) que tengan cubierta para prevenir contaminación externa; y 6) que las superficies que no están en contacto con el producto también sean de fácil limpieza para evitar contaminación cruzada.

Otro factor que puede intervenir en la contaminación del equipo y producto en proceso, puede ser el ambiente circundante. Este también puede ser un punto crítico de control, dado que en las áreas contiguas al edificio de elaboración de productos cárnicos se encuentran los corrales.

Mediante el método SimPlate™ también se hicieron análisis microbiológicos (cuenta total, coliformes totales y *E. coli*) en la superficie del equipo; estos también reflejaron un aumento después del lavado y sanitización; por lo que se establece que es necesario cuidar el proceso de elaboración y establecer los puntos críticos.

### **3.1.6 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y MESÓFILOS AEROBIOS EN AGUA CON DETERGENTE PARA LAVADO (NORMA Y MÉTODOS RÁPIDOS)**

Los análisis microbiológicos, realizados al agua con detergente para lavado, muestran que efectivamente existe presencia de coliformes totales (20 UFC/ml) y mesófilos aerobios (10 UFC/ml); los niveles de mesófilos aerobios se encuentran dentro de lo permitido por la norma NOM-127-SSA1-1994 (100 UFC/g); mientras que el número de coliformes totales sobrepasan los niveles (<2 UFC/100ml); esto tuvo un efecto negativo en la limpieza del equipo de rebanado; ya que lo contaminó. En cuanto a los métodos rápidos, para la prueba de coliformes totales se tienen 18 UFC/g, mientras que, para cuenta total se tienen 12 UFC/g, entonces, los valores obtenidos con el método rápido son cercanos a los que se obtienen por el método tradicional, pero, con la ventaja de que, como su nombre lo dice, se tienen los resultados en menor tiempo.



### 3.2 MEDICIÓN DE pH

La tabla 14 muestra los valores de pH obtenidos durante la experimentación.

**Tabla 14. Valores de pH correspondientes a cada uno de los tratamientos, obtenidos durante las pruebas en el día 0, 1 y 7.**

Día	Concentración	Tipo de envasado	REPETICIÓN			PROMEDIO	D.S	C.V.
			1	2	3			
0	<b>MATERIA PRIMA</b>	Jamón entero en funda	6.16	6.19	6.18	<b>6.18</b>	<b>0.015</b>	<b>0.002</b>
0	0%	Sin vacío	6.17	6.19	6.19	<b>6.18</b>	<b>0.012</b>	<b>0.002</b>
		Con vacío	6.15	6.2	6.16	<b>6.17</b>	<b>0.026</b>	<b>0.004</b>
	0.01%	Sin vacío	6.14	6.21	6.18	<b>6.18</b>	<b>0.035</b>	<b>0.006</b>
		Con vacío	6.16	6.17	6.16	<b>6.16</b>	<b>0.006</b>	<b>0.001</b>
	0.02%	Sin vacío	6.13	6.21	6.18	<b>6.17</b>	<b>0.040</b>	<b>0.007</b>
		Con vacío	6.2	6.18	6.2	<b>6.19</b>	<b>0.012</b>	<b>0.002</b>
1	0%	Sin vacío	6.19	6.17	6.18	<b>6.18</b>	<b>0.010</b>	<b>0.002</b>
		Con vacío	6.11	6.14	6.15	<b>6.13</b>	<b>0.021</b>	<b>0.003</b>
	0.01%	Sin vacío	6.17	6.19	6.16	<b>6.17</b>	<b>0.015</b>	<b>0.002</b>
		Con vacío	6.12	6.16	6.16	<b>6.15</b>	<b>0.023</b>	<b>0.004</b>
	0.02%	Sin vacío	6.19	6.18	6.19	<b>6.19</b>	<b>0.006</b>	<b>0.001</b>
		Con vacío	6.12	6.14	6.13	<b>6.13</b>	<b>0.010</b>	<b>0.002</b>
7	0%	Sin vacío	6.12	6.18	6.15	<b>6.15</b>	<b>0.030</b>	<b>0.005</b>
		Con vacío	6.18	6.17	6.17	<b>6.17</b>	<b>0.006</b>	<b>0.001</b>
	0.01%	Sin vacío	6.19	6.14	6.16	<b>6.16</b>	<b>0.025</b>	<b>0.004</b>
		Con vacío	6.23	6.23	6.23	<b>6.23</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
	0.02%	Sin vacío	6.26	6.23	6.24	<b>6.24</b>	<b>0.015</b>	<b>0.002</b>
		Con vacío	6.14	6.2	6.18	<b>6.17</b>	<b>0.031</b>	<b>0.005</b>





### 3.2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE pH

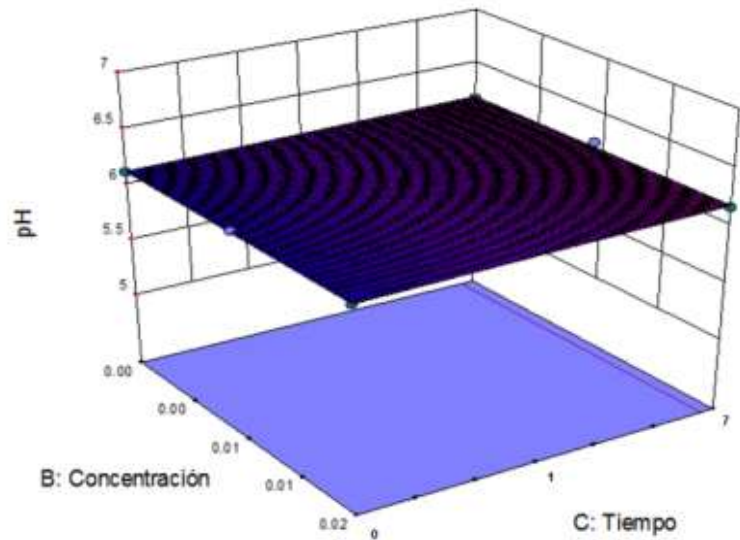
La Tabla 15 muestra los datos de ANOVA obtenido en el análisis estadístico factorial, realizado mediante el programa Desing-Expert, con respecto a los factores Tipo de envase, concentración y tiempo.

**Tabla 15. Análisis de varianza correspondiente a pH.**





	Suma de cuadrados	df	Medios cuadrados	F	Prob> F	
<b>Modelo</b>	0.009391667	7	0.001341667	1.47706422	0.3709	<b>no significativo en valores "Prob&gt; F" mayores a 0.1000</b>
<b>A-Tipo de envase</b>	0.002074242	1	0.002074242	2.28356964	0.2053	
<b>B-Concentración</b>	0.00125	1	0.00125	1.37614679	0.3058	
<b>C-Tiempo</b>	0.003206061	1	0.003206061	3.52960801	0.1335	
<b>AB</b>	0.00125	1	0.00125	1.37614679	0.3058	
<b>AC</b>	0.000490909	1	0.000490909	0.54045038	0.5030	
<b>BC</b>	0.0008	1	0.0008	0.88073394	0.4011	
<b>ABC</b>	0.0008	1	0.0008	0.88073394	0.4011	
<b>Suma de cuadrados</b>	0.003633333	4	0.000908333			
<b>Cor Total</b>	0.013025	11				
<b>Desviación Estándar</b>	0.030138569		R <sup>2</sup>	0.72104926		
<b>Promedio</b>	6.1725					
<b>C.V. %</b>	0.488271671					
<b>PRESS</b>	0.04905					

Ahora bien, se presenta el grafico 3D el cual representa la influencia del tiempo y la concentración de extracto de semillas de cítricos en la respuesta pH, en rebanadas de jamón de carne de conejo, envasadas con vacío (Figura 25) y sin vacío (Figura 26).

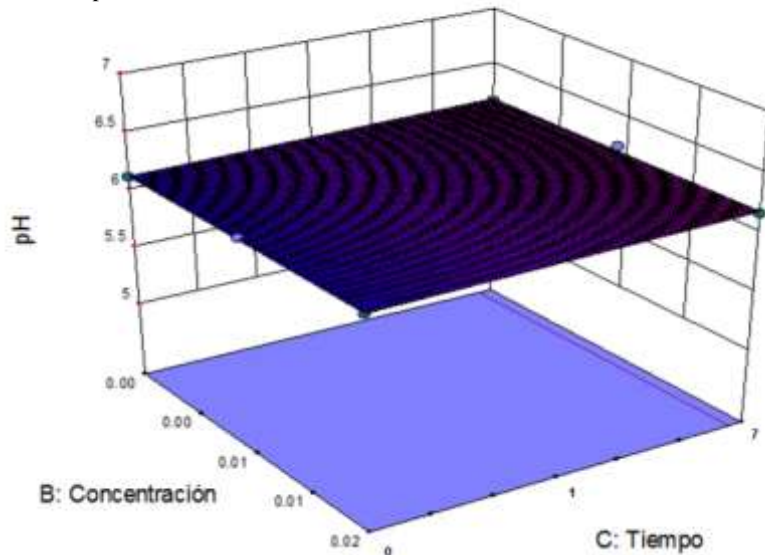
-  Diseño con puntos por encima del valor predicho
  -  Diseño con puntos por debajo del valor predicho
  -  6.24
  -  6.13
- X1= B = Concentración  
 X2 = C = Tiempo  
 Factor Actual  
 A: Tipo de envase = con vacío



**Figura 25. Efecto del tiempo y concentración en el pH de rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con vacío.**

-  Diseño con puntos por encima del valor predicho
-  Diseño con puntos por debajo del valor predicho
-  6.24
-  6.1

X1= B = Concentración  
 X2 = C = Tiempo  
 Factor Actual  
 A: Tipo de envase = con vacío



**Figura 26. Efecto del tiempo y concentración en el pH de rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío.**

Como se puede apreciar en las Figuras 25 y 26, los valores de pH, en las rebanadas de jamón de carne de conejo, oscilan entre 6.1 y 6.2, lo cual indica que no existe una diferencia significativa; esto se corrobora estadísticamente a partir del análisis de varianza (ANOVA), donde con un valor de “Prob>F” mayor a 0.1000 se dice que el modelo no es significativo, es decir, los factores tipo de envase, concentración y tiempo, no tienen un efecto significativo en el valor de pH. Kreyenschmidt (2010) realizó estudios sobre la vida de anaquel en rebanadas de jamón de carne de cerdo y encontró que existe una relación directa entre el pH y la presencia de BAL; debido a esto, él estableció que la disminución en el valor de pH es un indicador del crecimiento de la población de BAL.

Los valores de pH, de los distintos lotes, tuvieron fluctuaciones que no fueron significativas a lo largo de los 7 días de almacenamiento en refrigeración, las BAL son microaerofílicas y son capaces de crecer a bajas tensiones de oxígeno; sin embargo, al utilizar los protocolos para el cultivo de bacterias lácticas demostraron su ausencia.

### 3.3 EVALUACIÓN DE COLOR

En la Tabla 16 se presentan los resultados de los parámetros evaluados, en la prueba de color para cada tratamiento.

**Tabla 16. Valores promedios de colorimetría (L, a y b) en rebanadas de jamón de carne de conejo.**

Día	Concentración	Tipo de envasado	REPETICIÓN			ΔE
			L	a	b	
0	<b>MATERIA PRIMA</b>	Jamón entero en funda	69.76	7.76	4.52	
0	0%	Sin vacío	70.11	7.59	4.31	0.44
		Con vacío	72.14	7.51	4.55	2.39
	0.01%	Sin vacío	71.32	7.8	4.63	1.56
		Con vacío	69.9	7.72	4.76	0.28
	0.02%	Sin vacío	70.2	7.67	4.47	0.45
		Con vacío	70.43	7.74	4.36	0.68
1	0%	Sin vacío	73.33	7.61	4.29	3.58
		Con vacío	71.86	8.07	4.71	2.12
	0.01%	Sin vacío	73.31	7.67	4.82	3.56
		Con vacío	71.76	8.43	4.62	2.10
	0.02%	Sin vacío	73.06	7.78	4.33	3.31
		Con vacío	73.20	7.73	4.60	3.44
7	0%	Sin vacío	98.96	-0.32	1.53	30.44
		Con vacío	99.48	0.05	1.92	30.81
	0.01%	Sin vacío	99.31	-0.62	1.26	30.88
		Con vacío	98.29	0.16	1.81	29.65
	0.02%	Sin vacío	99.74	-0.70	1.85	31.26
		Con vacío	97.89	0.59	1.94	29.14



### 3.3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE COLOR

La tabla 17 muestra los datos de ANOVA obtenidos en el análisis estadístico factorial, realizado mediante el programa Desing-Expert, con respecto a los factores Tipo de envase, concentración y tiempo.

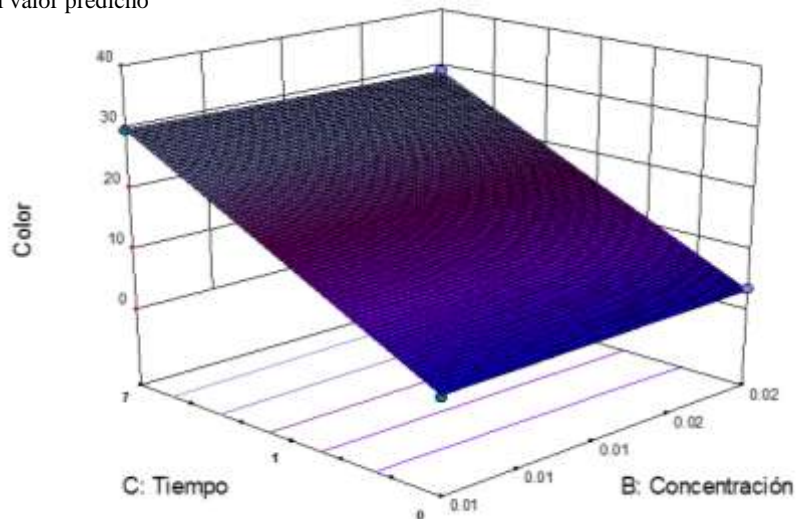
**Tabla 17. Análisis de varianza correspondiente a color.**

	Suma de cuadrados	Df	Medios cuadrados	F	Prob> F	
<b>Modelo</b>	2248.662792	7	321.2375417	3310.87392	< 0.0001	<b>Significativo en valores "Prob&gt; F" menores a 0.0500</b>
<b>A-Tipo de envase</b>	2.517456061	1	2.517456061	25.946468	0.0070	
<b>B-Concentración</b>	0.005	1	0.005	0.05153311	0.8315	
<b>C-Tiempo</b>	1603.236123	1	1603.236123	16523.9487	< 0.0001	
<b>AB</b>	0.10125	1	0.10125	1.04354548	0.3648	
<b>AC</b>	0.640151515	1	0.640151515	6.59779969	0.0621	
<b>BC</b>	0.45125	1	0.45125	4.65086318	0.0973	
<b>ABC</b>	2.0808	1	2.0808	21.4460191	0.0098	
<b>Suma de cuadrados</b>	0.3881	4	0.097025			
<b>Cor Total</b>	2249.050892	11				
<b>Desviación Estándar</b>	0.311488363		R <sup>2</sup>	0.99982744		
<b>Promedio</b>	16.69083333					
<b>C.V. %</b>	1.86622415					
<b>PRESS</b>	5.23935					



A continuación, se presenta el gráfico 3D correspondiente al efecto del tiempo y concentración de extracto de semilla de cítricos en el color de rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con vacío (Figura 27) y sin vacío (Figura 28).

-  Diseño con puntos por encima del valor predicho
-  Diseño con puntos por debajo del valor predicho

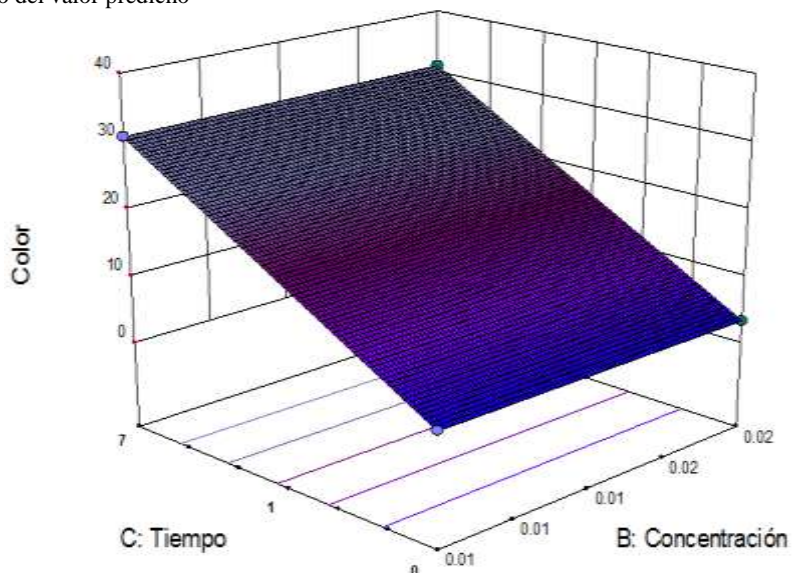
31.26  
 2.1  
 X1= B = Concentración  
 X2 = C = Tiempo  
 Factor Actual  
 A: Tipo de envase = con vacío



**Figura 27. Efecto del tiempo y concentración en el color de rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas con vacío.**

-  Diseño con puntos por encima del valor predicho
-  Diseño con puntos por debajo del valor predicho

31.26  
 2.1  
 X1= B = Concentración  
 X2 = C = Tiempo  
 Factor Actual  
 A: Tipo de envase = sin vacío



**Figura 28. Efecto del tiempo y concentración en el color de rebanadas de jamón de carne de conejo envasadas sin vacío.**

Como podemos apreciar en los gráficos (Figura 27 y 28), estadísticamente (Tabla 17) el factor que tiene una mayor influencia en el cambio de color es el tiempo (valor de "Prob> F" menor a 0.0500 en el ANOVA) y no la concentración de ESC o el tipo de envasado (con o sin

vacío); Hui en 2006, afirmó que una desventaja importante del uso del envasado al vacío es que, algunas veces queda una mínima cantidad de oxígeno presente, la cual permite una formación de metamioglobina residual y decolora el producto. No obstante, el envase utilizado en la experimentación posee una tecnología (multicapa) la cual aísla al producto del ambiente y libera el escaso oxígeno que haya quedado atrapado; es por esto que los cambios de color, durante el almacenamiento, se pueden atribuir a la fotosensibilidad del producto.

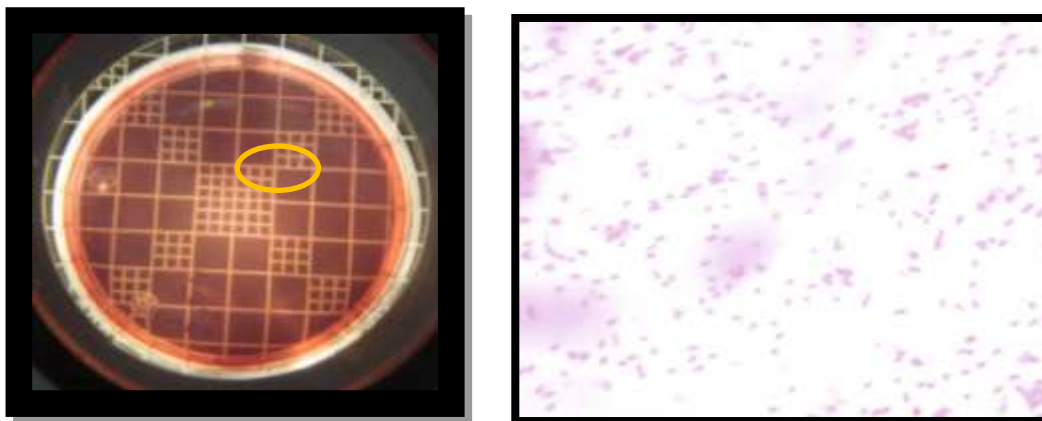
Sin ser el objetivo, el producto fue acomodado de tal forma que permaneció expuesto a la luz eléctrica y /o solar y del día 0 al 7 hay una absorción relativamente pequeña por la mioglobina desnaturalizada, provocando que con el tiempo el diferencial de color fuese mayor en el jamón y éste presentara una apariencia pálida.

### **3.4 RESULTADOS DE LA TINCIÓN DE GRAM DE LA DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES Y MESÓFILOS AEROBIOS**

En seguida, se muestra la imagen correspondiente a coliformes totales y mesófilos aerobios (Figura 29-31) obtenida a partir de una tinción de Gram y observada en un Microscopio (Olympus CX31) para identificar la morfología y los posibles microorganismos, presentes en las muestras con concentración 0% de ESC envasadas con y sin vacío.

De acuerdo a las imágenes obtenidas, como resultado de la prueba de tinción, cuando se utilizó medio de cultivo agar rojo violeta bilis lactosa, incubadas durante  $24 \pm 2$  h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , con muestra de jamón de carne de conejo envasada con (Figura 29) o sin (Figura 30) vacío, se aislaron colonias, que al observarse al microscopio presentaron características del mismo género (coliformes), siendo éstas, con morfología de bacilos Gram negativos. Mientras que, la muestra de rebanada de jamón de carne de conejo envasada sin vacío, empleando medio de cultivo agar tripton extracto de levadura o agar para cuenta estándar, incubadas durante  $48 \pm 2$  h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , se aislaron colonias que al observarse al microscopio presentaron características con morfología de cocos Gram positivos, ver Figura 31.

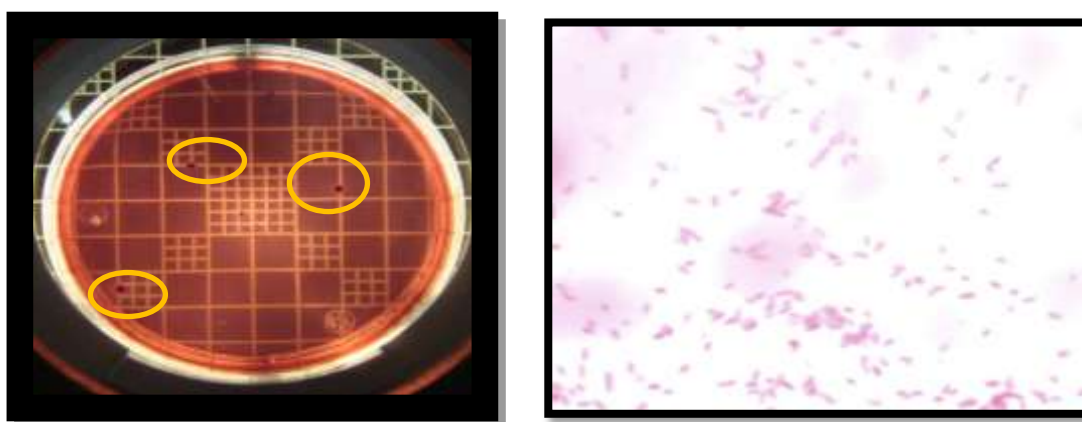




A)

B)

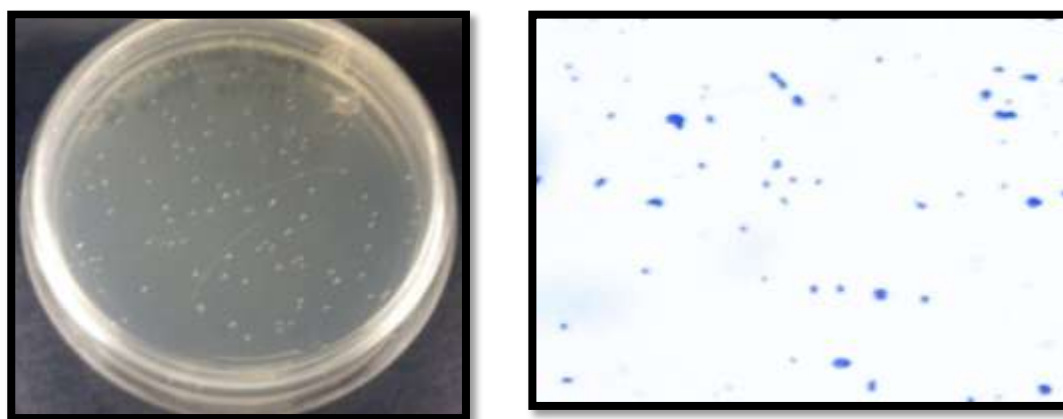
**Figura 29. A) Morfología colonial; B) Tinción de Gram de Coliformes totales (sin vacío).**



A)

B)

**Figura 30. A) Morfología colonial; B) Tinción de Gram de Coliformes totales (con vacío).**



A)

B)

**Figura 31. A) Morfología colonial; B) Tinción de Gram de Mesófilos Aerobios (sin vacío).**



## CONCLUSIONES

1. El rebanado del jamón resultó ser un punto crítico de control; ya que en el producto terminado (pieza completa de jamón) se cumplió con límites permitidos por normas y después del rebanado aumentaron las UFC/g de coliformes totales y mesófilos aerobios.
2. El envasado al vacío combinado con 0.01% de antimicrobiano y almacenamiento refrigerado a 4°C, son las barreras y/o condiciones que mantuvieron la mejor calidad sanitaria de las rebanadas de jamón de carne de conejo.
3. El uso de Extracto de Semilla de Cítricos permitió mantener estables las características del producto (pH y color).
4. Los resultados de mesófilos aerobios y coliformes totales obtenidos mediante los métodos rápidos y los métodos tradicionales, tuvieron los mismos órdenes de magnitud.
5. El uso de métodos rápidos por su fácil y rápida preparación y obtención de resultados, facilita la interpretación y toma de decisiones para control de la calidad microbiana de productos alimenticios.

**REFERENCIAS**

- Aguilar, A. 2005. El siglo de Torreón. Consultado el 6 de Septiembre de 2010. Disponible en <http://www.elsiglodetorreon.com.mx/noticia/184722.consumo-muy-nutritiva-carne-de-conejo.html>
- Astiasarán, I. y Martínez, A., 2000. Alimentos. Composición y propiedades. 2ª ed. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España.
- Aymerich, P. P. 2008. Decontamination technologies for meat products. *Meat science*, 78, 114-129.
- Azmi, A.S., Bhat, S.H., Hanif, S., Hadi, S.M., 2006. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett.* 580, 533–538.
- Badui, S. 2006. Química de los alimentos. México: Pearson Education.
- Bakkali ,F., Averbeck, S. , Averbeck , D., Idaomar ,M. 2007. Biological effects of essential oils – A review. *Food and chemical toxicology*, 46, 446-475.
- Baumgart, J. 1990. Microbiological investigation of foodstuffs. 2ªed. Hamburgo, Alemania.
- Blom, H, *et. al.* 1997. A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology.*, 38, 103-109.
- Borgmann, S., Niklas, D. M., Klare, I., Zabel, L. T., Buchenau, P., Autenrieth, I. B., et al. 2004. Two episodes of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207(4), 386-389.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., 2003. Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocoteaquixos* (Lam.) Kosterm.(Lauraceae) flower calices. *Food Chem.* 85, 415–421.
- Busatta, C., Vidal, R.S., Popiolski, A.S., Mossi, A.J., Dariva, C., Rodrigues, M.R., Corazza, F.C., Corazza, M.L., Vladimir Oliveira, J., Cansian, R.L., 2008. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiol.* 25 (1), 207–211.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure–activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 749–760.
- Carramiñana, J.J., Rota, C., Burillo, J., Herrera, A., 2008. Antibacterial efficiency of Spanish Saturejamontana essential oil against *Listeria monocytogenes* among natural flora in minced pork. *J. Food Prot.* 71 (3), 502–508.

- Chenoll E. *et. al.* 2007. Lactic acid bacteria associated with vacuum-packaged cooked-meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology*. 102, 498-508.
- Clavero, M y Bevehat, L. 1996. Survival of E.coli in broth and processed salami as influenced by pH, water activity and temperature and suitability of media for its recovery. *Appl. Environ.Microbiol.* 62, 2735-2749.
- Davidson, P. M. 2005. Antimicrobials in food. United States of America: Taylor & francis.
- Demetzos, C., &Perdetzoglou, D. K. 2001. Composition and antimicrobial studies of the oils of *Origanumcalcaratum*Juss.and *O. scabrum*Boiss. etHeldr. From Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 460–462.
- Denis, C, *et. al.* 2006. Heat resistance of coliform species isolated from cooked ham, snail flesh, and ‘bouche’es a` la reine’. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 160–164.
- Dugo, P., Mondello, L., Dugo, L., Stancanelli, R., &Dugo, G. 2000. LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(1), 147-154.
- FAO. 1999
- FDA. 2010. Food and Drug Administration. Consultado el 10 de Septiembre de 2010. Disponible en <http://cfr.vlex.com/vid/170-3-definitions-19706720>
- FDA. 2010. Food and Drug Administration. Consultado el 10 de Septiembre de 2010. Disponible en <http://cfr.vlex.com/vid/spices-flavorings-colorings-preservatives-19705627>.
- Fisher, K & Phillips, C. 2007. Antimicrobial screening of various fruit seed extracts. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 156-164.
- Flamini, G., Tebano, M., &Cioni, P. 2007. Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of *Citrus limon*. *AnalyticaChimica Acta*, 589, 120-124.
- Forrest, J. C. 1979. *Fundamentos de ciencia de la carne*. Zaragoza: Acribia.
- Frazier, W. W. 2000. *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza, España: Acribia.
- Fuente, N y Barboza, J. 2010. Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Ciencias de la Salud*.20, 43.52.
- Gálvez, A. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* , 120, 51-70.
- Gänzle, M. G., Weber, S., & Hammes, W. P. 1999. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity. *International Journal of Food Microbiology* , 46, 207-217.
- Girard, J. P. 1991. *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*.España: Acribia.

Gould, G. W. 2000. Strategies for food preservation. *The microbiological safety and quality of food*. Vol 1. Aspen publisher, Inc. Gaithersburs, Maryland. pp 19-31.

Hui, Y. H. 2006. Ciencia y tecnología de carnes. México: Limusa.

ICMSF. 1983. Ecología microbiana de los alimentos. Zaragoza, España: Acribia.

Jay, J. 1996. Modern Food Microbiology. New York: Chapman and Hall.

Jimenez Del Rio, M., Velez-Pardo, C., 2004. Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: an in vitro model for neurodegeneration. *Arch. Med. Res.* 35, 185–193.

Juliano, C., Mattana, A., &Usai, M. 2000. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus herba-barona*Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research*, 12, 516–522.

Kotzekidou, P. 1996. Effect of Protective Cultures and Packaging Film Permeability on Shelf-life of Sliced Vacuum-packed Cooked Ham. *Meat Science*, 42, 333-345.

Kreyenschmidt, J. 2010. Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 510–520.

Lataoui, N., &Tantaoui-Elaraki, A. 1994. Individual and combined antibacterial activity of the main components of three thyme essentials oils. *Revista Italiana EPPOS*, 13, 13–19.

López, P.J. y Pantoja, C. D. 1995. Memorias del 1er curso-taller Análisis de Riesgo en Alimentos, FES-C, UNAM.

Madigan, M. 2003. Biología de los microorganismos. España: Prentice Hall.

Marcos, B. 2007. Use of antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 152-158.

McDonald, K., & Sun, D.-W. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 1-27.

Molins, A. R. 1993. Microbiología cárnica. *Lácteos y Cárnicos Mexicanos*. 8,4.

NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

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

NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

NOM-158-SCFI-2003, Jamón-Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba.

NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.

Pérez, A. M. 2010. Desarrollo de productos cárnicos como alternativa para el procesamiento de la carne de conejo producida en la FES-Cuautitlán. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Ray, B., & Daeschel, M. 1992. Food Biopreservatives of Microbial Origin. CRC Press, Florida, USA.

Rivera, J. 2005. Evaluación del efecto de bioconservación en Salamis al adicionar *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como cultivo iniciador. Tesis Maestría en Microbiología, FESC-UNAM, México.

Ray, B y Bhunia, A. 2007. Fundamental food microbiology. 4<sup>th</sup>. ed.

Raybaudi-Massilia, R.M 2007. Uso de sustancias antimicrobianas naturales en combinación con compuestos estabilizadores de la calidad para controlar microorganismos patógenos y extender la vida útil de frutas frescas cortadas. Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad de Lleida, Lleida, España.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. Food Chem. 91, 621–632.

Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H., 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. Toxicology 177, 67– 80.

Salgar, R. 2004. Biopelículas o Biofilms en la industria Alimentaria. Mundo Alimentario. 22, 30-31.

Smith, D. C., Forland, S., Bachanos, E., Matejka, M., & Barrett, V. 2001. Qualitative analysis of citrus fruits extracts by GC/MS: An undergraduate experiment. Chemical Educator, 6, 28-31.

Stadler, R.H., Markovic, J., Turesky, R.J., 1995. In vitro anti- and prooxidative effects of natural polyphenols. Biol. Trace Elem. Res. 47,299–305.

Van Houten, B., Woshner, V., Santos, J.H., 2006. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. DNA Repair 5, 145–152.

Varnam, A. H., & Sutherland, J. P. 1995. Carne y productos cárnicos. Tecnología química y microbiología. Zaragoza: Acribia.

Vasilopoulos, C. 2010. Interactions between bacterial isolates from modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham in view of the development of a bioprotective culture. *Food Microbiology*. 30, 1-9.

Vittadini, E., & Chinachoti, P. 2003. Effect of physico-chemical and molecular mobility parameters on *Staphylococcus aureus* growth. *International Journal Food Science*, 38, 841-847.

# ANEXOS

**I. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN CON CLORO**

El producto utilizado contiene 5% de cloro libre y en función a este valor se realizaron los cálculos, para tener una solución a 200ppm, de la siguiente forma:

Si 1L contiene 50mL Cl libre

Es decir; 1000mL-50mL

Entonces 1ml contiene = 0.05ml de cloro; esto es igual a 50ppm.

Para 200ppm se necesitan x (mL)

$$200\text{ppm}=4\text{ml}$$

**1L de agua con 4ml de cloro=solución a 200ppm**

**II. CÁLCULO DE LOS VALORES DE LA CUENTA EN PLACA DE COLIFORMES TOTALES EN REBANADAS DE JAMÓN ENVASADO CON VACÍO (ENSAYO POR DUPLICADO).**

Día	Concentración	Dilución			UFC/g
		1:10	1:100	1:1000	
0	0%	1	0	0	10a
		0	0	0	
	0.01%	0	0	0	10a
		1	0	0	
	0.02%	1	0	0	10a
		1	0	0	
1	0%	1	0	0	20a
		2	0	0	
	0.01%	1	0	0	10a
		0	0	0	
	0.02%	5	0	0	50a
		4	0	0	
7	0%	56	0	0	600a
		58	0	0	
	0.01%	1	0	0	10a
		1	0	0	
	0.02%	3	0	0	40a
		5	0	0	

a: valor estimado



**III. ANOVA PARA COLIFORMES TOTALES CON VACÍO**

- **Modelo lineal general: UFC/g vs. Día, Concentración**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Día	fijo	3	0, 1, 7
Concentración	fijo	3	0.00, 0.01, 0.02

- **Análisis de varianza para UFC/g, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Día	2	148900	148900	74450	1030.85	0.000
Concentración	2	127900	127900	63950	885.46	0.000
Día*Concentración	4	270800	270800	67700	937.38	0.000
Error	9	650	650	72		
Total	17	548250				

S = 8.49837 R-cuad. = 99.88% R-cuad.(ajustado) = 99.78%

- **Medias de cuadrado mínimo para UFC/g**

	Día	Media del Error	
		Media	Estándar
	0	6.667	3.469
	1	21.667	3.469
	7	206.667	3.469
Concentración			
	0.00	196.667	3.469
	0.01	6.667	3.469
	0.02	31.667	3.469
Día*Concentración			
	0	0.00	5.00
	0	0.01	5.00
	0	0.02	10.00
	1	0.00	15.00
	1	0.01	5.00
	1	0.02	45.00
	7	0.00	570.00
	7	0.01	10.00
	7	0.02	40.00

**IV. CÁLCULO DE LOS VALORES DE LA CUENTA EN PLACA DE COLIFORMES TOTALES EN REBANADAS DE JAMÓN ENVASADO SIN VACÍO (ENSAYO POR DUPLICADO).**

Día	Concentración	Dilución			UFC/g
		1:10	1:100	1:1000	
0	0%	1	0	0	10a
		0	0	0	
	0.01%	0	0	0	10a
		1	0	0	
	0.02%	1	0	0	10a
		1	0	0	
1	0%	3	0	0	40a
		4	0	0	
	0.01%	1	0	0	10a
		1	0	0	
	0.02%	5	0	0	50a
		4	0	0	
7	0%	110	0	0	1200
		126	0	0	
	0.01%	3	0	0	30a
		3	0	0	
	0.02%	7	0	0	80a
		9	0	0	

a: valor estimado

**V. ANOVA PARA COLIFORMES TOTALES SIN VACÍO**

- **Modelo lineal general: UFC/g vs. Día, Concentración**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Día	fijo	3	0, 1, 7
Concentración	fijo	3	0.00, 0.01, 0.02

- **Análisis de varianza para UFC/g, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Día	2	679511	679511	339756	231.65	0.000
Concentración	2	570211	570211	285106	194.39	0.000
Día*Concentración	4	1121122	1121122	280281	191.10	0.000
Error	9	13200	13200	1467		
Total	17	2384044				

S = 38.2971 R-cuad. = 99.45% R-cuad.(ajustado) = 98.95%

• **Medias de cuadrado mínimo para UFC/g**

Día	Media del Error		
	Media	Estándar	
0	6.67	15.63	
1	30.00	15.63	
7	430.00	15.63	
Concentración			
0.00	406.67	15.63	
0.01	15.00	15.63	
0.02	45.00	15.63	
Día*Concentración			
0	0.00	5.00	27.08
0	0.01	5.00	27.08
0	0.02	10.00	27.08
1	0.00	35.00	27.08
1	0.01	10.00	27.08
1	0.02	45.00	27.08
7	0.00	1180.00	27.08
7	0.01	30.00	27.08
7	0.02	80.00	27.08

**VI. CÁLCULO DE LOS VALORES DE LA CUENTA EN SIMPLATE™ DE COLIFORMES TOTALES Y *E.coli* EN REBANADAS DE JAMÓN ENVASADO SIN VACÍO (ENSAYO POR DUPLICADO).**

Día	Concentración	Dilución 1:1000	POBLACIÓN	UFC/g
0	0%	1	2	20
		1		
	0.01%	0	2	20
		1		
	0.02%	0	2	20
		1		
1	0%	2	4	40
		1		
	0.01%	1	2	20
		1		
	0.02%	3	6	60
		2		
7	0%	44	128	1280
		45		
	0.01%	2	4	40
		2		
	0.02%	4	10	100
		5		

**VII. CÁLCULO DE LOS VALORES DE LA CUENTA EN PLACA DE MESÓFILOS AEROBIOS EN REBANADAS DE JAMÓN ENVASADO SIN VACÍO (ENSAYO POR DUPLICADO).**

Día	Concentración	Dilución			UFC/g
		1:10	1:100	1:1000	
0	0%	50	3	0	5000
		42	2	0	
	0.01%	48	1	0	5000
		51	2	0	
	0.02%	49	3	0	5000
		46	0	0	
1	0%	>250	23	3	26000
		>250	22	3	
	0.01%	104	14	0	13000
		117	22	0	
	0.02%	126	38	0	17000
		130	39	0	
7	0%	77	3	1	90000
		103	4	0	
	0.01%	31	8	1	30000
		20	5	0	
	0.02%	60	1	1	60000
		49	2	0	

**VIII. ANOVA PARA MESÓFILOS AEROBIOS SIN VACÍO**

- **Modelo lineal general: UFC/g vs. Día, Concentración**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Día	fijo	3	0, 1, 7
Concentración	fijo	3	0.00, 0.01, 0.02

- **Análisis de varianza para UFC/g, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Día	2	128073	128073	640365	27.47	0.000
Concentración	2	296896	296896	148448	6.37	0.019
Día*Concentración	4	385239	385239	963099	4.13	0.036
Error	9	20983	20983	2331		
Total	17	2172704				

S = 15269.3 R-cuad. = 90.34% R-cuad.(ajustado) = 81.76%

• **Medias de cuadrado mínimo para UFC/g**

Día	Media del Error		
	Media	Estándar	
0	4950	6234	
1	18250	6234	
7	67000	6234	
Concentración			
0.00	47450	15.63	
0.01	16817	15.63	
0.02	25933	15.63	
Día*Concentración			
0	0.00	4850	10797
0	0.01	5100	10797
0	0.02	4900	10797
1	0.00	25500	10797
1	0.01	12850	10797
1	0.02	16400	10797
7	0.00	112000	10797
7	0.01	32500	10797
7	0.02	56500	10797

**IX. CÁLCULO DE LOS VALORES DE LA CUENTA TOTAL POR SIMPLATE™ EN REBANADAS DE JAMÓN ENVASADO SIN VACÍO (ENSAYO POR DUPLICADO).**

Día	Concentración	Dilución 1:1000	POBLACIÓN	UFC/g
0	0%	3	6	6000
		2		
	0.01%	2	4	4000
		2		
	0.02%	2	4	4000
		1		
1	0%	13	28	28000
		12		
	0.01%	6	12	12000
		5		
	0.02%	8	18	18000
		9		
7	0%	34	86	86 000
		32		
	0.01%	13	28	28 000
		12		
	0.02%	25	58	58000
		24		

**X. CÁLCULO DE LOS VALORES DE LA CUENTA EN PLACA DE COLIFORMES TOTALES EN AGUA DE LAVADO (ENSAYO POR DUPLICADO).**

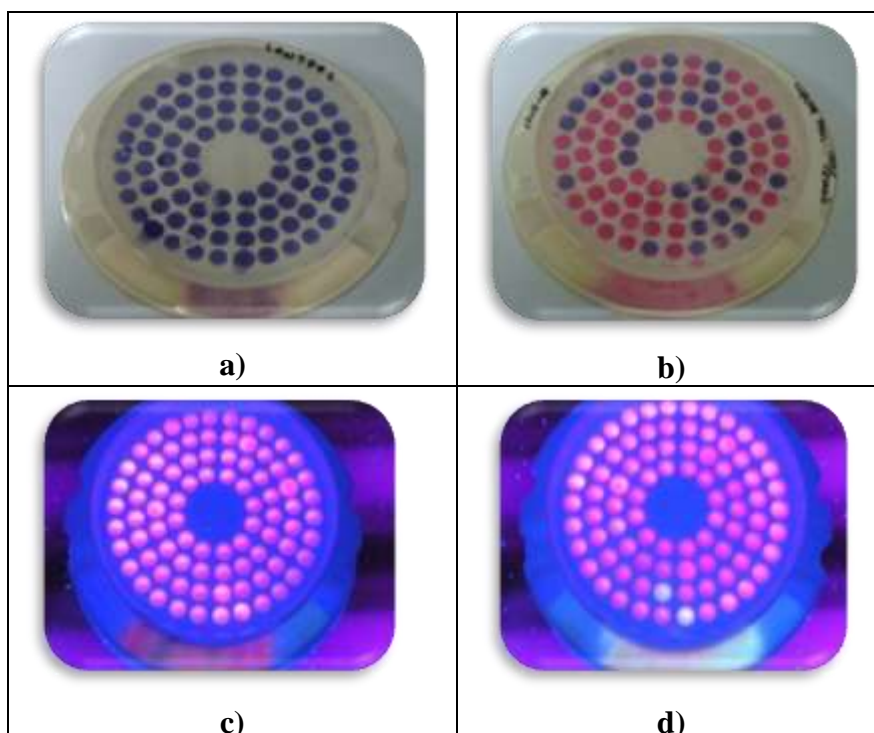
Dilución					UFC/ml
110	1100	11000	110000	1100000	
1	0	0	0	0	20a
2	0	0	0	0	

**XI. CÁLCULO DE LOS VALORES DE LA CUENTA EN PLACA DE MESÓFILOS AEROBIOS EN AGUA DE LAVADO (ENSAYO POR DUPLICADO).**

Dilución					UFC/ml
110	1100	11000	110000	1100000	
1	0	0	0	0	10a
1	0	0	0	0	

**XII. TABLA DE CONVERSIÓN SIMPLATE™ PARA CÁLCULO DE UFC/g.**

En las siguientes imágenes se ejemplifica el cambio de color y/o fluorescencia requeridos, en las charolas, para cuantificar e interpretar la presencia de los microorganismos.



**a) Placa control; b) Placa con pozos positivos (para coliformes totales y cuenta total); c) Fluorescencia control; d) Fluorescencia (de amarillo a verde-azulado) para *E. coli*.**

**(POZOS POSITIVOS=POBLACIÓN)**

1 = 2	29 = 70	57 = 190
2 = 4	30 = 74	58 = 196
3 = 6	31 = 76	59 = 202
4 = 8	32 = 80	60 = 208
5 = 10	33 = 84	61 = 216
6 = 12	34 = 86	62 = 224
7 = 14	35 = 90	63 = 232
8 = 16	36 = 94	64 = 240
9 = 18	37 = 96	65 = 248
10 = 22	38 = 100	66 = 256
11 = 24	39 = 104	67 = 266
12 = 26	40 = 108	68 = 276
13 = 28	41 = 112	69 = 288
14 = 30	42 = 116	70 = 298
15 = 32	43 = 120	71 = 312
16 = 36	44 = 124	72 = 324
17 = 38	45 = 128	73 = 338
18 = 40	46 = 132	74 = 354
19 = 42	47 = 136	75 = 372
20 = 46	48 = 142	76 = 392
21 = 48	49 = 146	77 = 414
22 = 50	50 = 150	78 = 440
23 = 54	51 = 156	79 = 470
24 = 56	52 = 160	80 = 508
25 = 58	53 = 166	81 = 556
26 = 62	54 = 172	82 = 624
27 = 64	55 = 178	83 = 738
28 = 68	56 = 184	84 = >738