

ANEXO N° 04

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN



INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

**“CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA NO TÉRMICA DE
LISTERIA MONOCYTOGENES EN LA CARNE MOLIDA
PRECOCINADA UTILIZANDO EL MODELO PREDICTIVO DE
BARANYI Y ROBERTS DEL COMBASE”**

AUTOR: EDGAR ZÁRATE SARAPURA

**(PERIODO DE EJECUCIÓN: 01 de mayo de 2021 al 30 de abril
de 2022)**

(Resolución de aprobación N° 323-2021-R)

Callao, 2021

PERÚ

A handwritten signature in blue ink, appearing to be the initials "AD".

17

DEDICATORIA

El presente trabajo es dedicado a mi esposa, a mis hijos y nietos, quienes han sido parte fundamental para desarrollar este proyecto, ellos son quienes me dan su tiempo, comprensión y aliento para seguir entendiendo la complejidad de la naturaleza y ser los principales protagonistas de este “sueño alcanzado”.



AGRADECIMIENTO

Gracias a la universidad y a los colegas docentes, muy amigables al cederme el uso de sus laboratorios a su cargo quienes me dieron confianza y permitieron el logro de los objetivos y poder terminar este proyecto.

También agradezco a los alumnos practicantes en el campo de la microbiología predictiva y tesis de posgrado por su participación en los experimentos.

A todo el personal administrativo de la unidad de Investigación y de laboratorios de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática.

Al Vicerrectorado de investigación de la Universidad Nacional del Callao por la gestión para la asignación económica parcial, para el desarrollo del proyecto a través del FEDU.

A todas aquellas personas que me proporcionaron un entorno propicio para el desarrollo de las actividades experimentales.



	N° Página
ÍNDICE	1
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
1.1. Descripción de la realidad problemática	9
1.2. Formulación del problema	11
1.2.1. Problema General	11
1.2.2. Problemas Específicos	11
1.3. Objetivos	12
1.3.1. Objetivo General	12
1.3.2. Objetivos Específicos	12
1.4. Limitantes de la Investigación	12
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	13
2.1. Antecedentes	13
2.1.2. Nacionales	13
2.1.1. Internacionales	15
2.2. Bases teóricas	17
2.3. Conceptual	22
2.4. Definición de términos básico	24
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES	28
3.1. Hipótesis	28
3.1.1. Hipótesis General	28
3.1.2. Hipótesis Específicas	28
3.2. Definición conceptual de variables	29
3.3. Operacionalización de variables	29
CAPÍTULO IV: DISEÑO METODOLÓGICO	29
4.1. Tipo y diseño de la investigación	29
4.2. Método de investigación	30
4.3. Población y muestra	30
4.4. Lugar de estudio y periodo desarrollado	31

4.5.	Técnicas e Instrumentos para la recolección de la información	31
4.6	Análisis y procesamiento de datos	34
CAPÍTULO V: RESULTADOS		34
5.1.	Resultados descriptivos	34
5.2.	Resultados inferenciales	36
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS		44
6.1	Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados	44
6.2	Contrastación de los resultados con otros estudios similares.	48
6.3.	Responsabilidad ética	61
CONCLUSIONES		62
RECOMENDACIONES		63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		64
ANEXOS		72



INDICE DE TABLAS DE CONTENIDO

		N° Página
Tabla 1	Tabla 1. Comportamiento del pH y la pérdida de humedad, inicial y final de la carne molida de res precocinada conservada a temperaturas de 4, 10 y 15 °C.	50
Tabla 2	Tabla 2. Calidad microbiológica de las muestras de carne molida de res precocidas	51
Tabla 3	Tabla 3. Velocidad de la Tasa Máxima de la declinación de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> según modelo de Baranyi-Roberts Programa Combase	52
Tabla 4	Tabla 4. Parámetros de sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en Caldo con 6.6% de ClNa y pH 5, 5.5 y 6 en relación a las temperaturas de 4,10 y 15 °C, según Combase	53
Tabla 5	Tabla 5. Características de las curvas de declinación (-Log UFC/g) del crecimiento de <i>Lm</i> inoculadas en carne molida precocida conservada a temperaturas de refrigeración de 4, 10 y 15 °C en condiciones de pH 5.5 y Cloruro de sodio 2%.	54
Tabla 6	Tabla 6. Parámetros cinéticos de la curva de sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en carne molida precocida en condiciones de pH 5.5 y cloruro de sodio 2%.	55
Tabla 7	Tabla 7. Parámetros de sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en la carne molida precocinada conservadas en temperaturas de refrigeración.	56



INDICE DE TABLAS DE FIGURAS

		N° Página
Figura 1	Figura 1. Declinación del crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en carne molida precocida en condiciones de pH 5.5 y 2% Cloruro de sodio conservada a 4, 10 y 15 °C	53



RESUMEN

Los productos cárnicos precocidos tienen muchas probabilidades de mantener carga microbiana sobreviviente de tipo contaminante o patógena como *Listeria monocytogenes*; por otro lado, su conservación hace uso de temperaturas de refrigeración en el cual algunos patógenos psicrófilos pueden adaptarse y producir una infección grave causada por su consumo. El objetivo del estudio fue determinar las características de supervivencia no térmica de *L. monocytogenes* en la carne molida precocinada, utilizando el modelo predictivo de Baranyi-Roberts del programa DMFit del Combase. Se elaboraron curvas de la declinación del crecimiento de *Listeria monocytogenes* inoculadas en la carne molida precocinada y almacenadas a temperaturas de 4, 10 y 15 °C en condiciones pH y % NaCl del producto. Las curvas de declinación de crecimiento se ajustaron con el modelo de Baranyi-Roberts integrado en el programa DMFit del ComBase; Las muestras fueron analizadas mediante un análisis de varianza y separación de medias por cuadrados mínimos ($P < 0.05$). El ajuste de las curvas permitió obtener las: velocidades de declinación del crecimiento ($-\mu_{max}$), periodo de adaptación (λ), población inicial y final. El factor D, tiempo generacional (Tg) y estado fisiológico (h_0) son calculadas a partir de los parámetros anteriores. La sobrevivencia a 4 °C es mayor y se extiende por un periodo de 3 meses, presentándose variaciones diversas del pH, humedad, alta sobrevivencia. El Factor D y estado fisiológico son dependientes de la temperatura de refrigeración y caracterizan a la carne molida precocinada, contaminada con células de *Listeria monocytogenes*, como un alimento que ofrece condiciones para la sobrevivencia del patógeno y no garantiza la inocuidad del producto debido a que encierra un peligro de tipo biológico. Para temperaturas de 10 y 15 °C el tiempo de sobrevivencia es menor, promoviendo el crecimiento y alteración del producto. El modelo de Baranyi-Roberts permitió el ajuste de las curvas de sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* y caracterizó su comportamiento en la carne molida precocinada.

Palabras Claves: Microbiología predictiva, sobrevivencia, tratamiento no térmico.



ABSTRACT

Precooked meat products are very likely to maintain a surviving microbial load of a contaminant or pathogenic type such as *Listeria monocytogenes*; on the other hand, its conservation makes use of refrigeration temperatures in which some psychrophilic pathogens can adapt and produce a serious infection caused by its consumption. The objective of the study was to determine the non-thermal survival characteristics of *L. monocytogenes* in precooked ground beef, using the Baranyi-Roberts predictive model of the Combase DMFit program. Growth decline curves of *Listeria monocytogenes* inoculated in precooked ground beef and stored at temperatures of 4, 10 and 15 °C under pH and % NaCl conditions of the product were prepared. The growth decline curves were fitted with the Baranyi-Roberts model integrated in the ComBase DMFit program; The samples were analyzed by an analysis of variance and separation of means by least squares ($P < 0.05$). The adjustment of the curves allowed to obtain the: growth decline rates ($-\mu_{max}$), adaptation period (λ), initial and final population. The D factor, generation time (T_g) and physiological state (h_0) are calculated from the above parameters. Survival at 4 °C is greater and extends for a period of 3 months, presenting diverse variations in pH, humidity, high survival. Factor D and physiological state are dependent on the refrigeration temperature and characterize precooked ground beef, contaminated with *Listeria monocytogenes* cells, as a food that offers conditions for the survival of the pathogen and does not guarantee the safety of the product because it contains a biological hazard. For temperatures of 10 and 15 °C, the survival time is shorter, promoting the growth and alteration of the product. The Baranyi-Roberts model allowed characterizing the survival of *Listeria monocytogenes* and characterized its behavior in precooked ground beef.

Keywords: Predictive microbiology, survival, non-thermal treatment.



INTRODUCCION

Los productos cárnicos refrigerados Listos para su Consumo (LPC) se elaboran aplicando tratamientos térmicos con la finalidad de eliminar los microorganismos vegetativos; por lo tanto, se consideran que están libres de patógenos vegetativos. Sin embargo, la evidencia científica indica que dichos productos son sensibles a la contaminación cruzada con *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. después de haber soportado el procesamiento térmico. La epidemiología demuestra el surgimiento de varios brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) relacionados con el consumo de carnes LPC. Uno de los patógenos de interés en la carne molida precocinada (CMP) es *L. monocytogenes* (Lm) de amplia distribución en la naturaleza y es causante de listeriosis con una alta tasa de mortalidad. La contaminación cruzada posterior al tratamiento térmico de la CMP puede producirse durante la manipulación, el rebanado o el envasado del producto en las instalaciones de fabricación.

Debido a que la CMP se consume o usa como insumo de otros productos, no siempre reciben otra cocción o esta es de pequeña intensidad, se requiere evidenciar los mecanismos para controlar la probable sobrevivencia del patógeno y garantizar la inocuidad del producto. Las investigaciones científicas demuestran que *L. monocytogenes* posee mecanismos para crecer a temperaturas de refrigeración, lo cual incrementa la preocupación de la ruptura de la cadena de frío durante las etapas de almacenamiento en fábrica, distribución, puntos de venta y almacenamiento en los hogares de los consumidores; por lo tanto, se hace necesario estimar los parámetros del comportamiento de Lm en las condiciones que ofrece la CMP.

La demanda de alimentos mínimamente procesados se incrementó por parte del consumidor, por ello se viene recomendando nuevos métodos de conservación como los procesos no térmicos, que pueden actuar en forma independiente o asociados a otros factores de barrera como el temperaturas de frío, pH, Aw, Atmósferas modificadas, probióticos, sales y otros, que pueden utilizarse sin

afectar sus características de calidad. Estos métodos son practicados en forma artesanal o industrial desde hace mucho tiempo, pero el avance tecnológicos posibilita su uso e incrementa su comercialización, pero existen riesgos microbiológicos que se deben atender debido a que los microorganismos tienen capacidades de adaptación a su entorno logrando la sobrevivencia de células vegetativas de Lm constituyendo en un peligro que se tiene que inhibir o eliminar para disminuir el riesgo.

El tratamiento no térmico aplicado a la CMP requiere de una herramienta que interrelacione su variable independiente con las características intrínsecas del alimento, para ello se acudió a la microbiología predictiva considerado como una herramienta apropiada para el diseño, evaluación y optimización de procesos, desarrollo de productos, establecimiento de vida útil y en procesos de evaluación cuantitativa de riesgo microbiano. En este estudio se utilizó el programa de ComBase que ofrece el modelo matemático de Baranyi y Roberts el cual tiene las opciones para modelar el tratamiento no térmico sobre Lm que permite predecir su posible comportamiento combinando diferentes valores de temperatura, pH y aw, entre otros; así como también, el programa DMFit del ComBase que permitió, a partir de los datos experimentales, conocer los parámetros cinéticos como la velocidad de la declinación del crecimiento ($-\mu_{max}$), periodo de latencia o Fase lag (λ), tiempo generacional (Tg) y sobrevivencia cuantitativa de las células vegetativas de Lm inoculadas en la CMP. Además, se pudo calcular el logaritmo de las poblaciones microbianas y calcular los valores D a partir de la pendiente de la parte lineal de la curva de inactivación.

El objetivo de este proyecto fue determinar las características de supervivencia de *L. monocytogenes* en la carne molida precocida utilizando el modelo predictivo de Baranyi y Roberts del Programa DMFit del ComBase.



I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la Realidad Problemática

Actualmente la predicción del crecimiento microbiano frente a condiciones del entorno de los microorganismos patógenos se realiza utilizando la informática, que obligó al desarrollo de programas informáticos apropiados, que permiten conocer qué microorganismos pueden crecer y a qué nivel, estimar la capacidad para producir toxinas; así como también asociar peligros que se pueden establecer en determinadas condiciones y poder eliminarlos. Sin embargo, estas predicciones relacionados a microorganismos patógenos es algo que se ha estado realizando de forma puntual y de interés propio en algunos centros de investigación, presentando el inconveniente de no poder intercambiar información, evidenciando que se desarrollaban estudios similares, en condiciones no comparables o aplicados a alimentos con procesos de elaboración cultural y artesanal.

La carne es considerada como una excelente fuente de nutrientes para el crecimiento y desarrollo de bacterias alterantes e incluso patógenos, quienes pueden desarrollar peligros a partir del tipo de metabolismo que desarrollen sobre la matriz de la de los productos cárnicos. La carne molida precocinada (CMP) debido a su naturaleza de ofrecer mejores condiciones que la carne cruda entera permite que los microorganismos sobrevivientes al tratamiento térmico pueden tener capacidades metabólicas para generar mecanismos de adaptación a entornos de estrés durante el almacenamiento hasta la llegada al consumidor encerrando peligros que aumenten el riesgo de transmitir una enfermedad.

La CMP se caracteriza por tener un pH inicial muy cercano a la neutralidad, con humedad relativamente alta como mantenerse en un estado coloidal que otorgue una textura apropiada para ser utilizada como insumo en formulaciones de alimentos para consumo directo, por otro lado la calidad microbiana existente en su matriz es mínima por efecto del tratamiento térmico aplicado para su cocción; sin embargo, las condiciones de pH, humedad, nutrientes biodisponibles hacen



posible la sobrevivencia de microorganismo indicadores de contaminación, patógenos, que se agravan si no se ha respetado los parámetros críticos de temperatura para eliminar o inhibir la carga y calidad bacteriana.

Las crecientes exigencias para la elaboración de productos cárnicos, como la carne molida precocinada, requieren un entorno limpio y controlado en todos los procesos y hacerlos más seguros, así como también para su almacenamiento y manipulación. Para su cumplimiento, actualmente, se requiere que las salas de elaboración del producto cárnico mantengan temperaturas de refrigeración, previo conocimiento de la naturaleza del producto cárnico y su calidad microbiana.

La situación actual de la industria cárnica es que no cuenta con una sala para el trabajo con alimentos que cumpla con requisitos muy exigentes; desde la implementación de un sistema de Análisis de peligros y puntos de control críticos, así como también de la necesaria aprobación de las instituciones que norman la inocuidad de los alimentos y el riguroso cumplimiento de la normativa ISO, entre otras medidas como la instalación de las salas blanca en las cuales uno de los factores es la temperatura de envasado de la carne y no se puede operar en ellas, en ninguna de las fases de todo el proceso, a una temperatura mayor a los 12 grados centígrados.

La carne molida debe ser almacenada a temperaturas de refrigeración hasta que llega al consumidor e inclusive indicar las conservación en los hogares. Cuando se trata de la carne picada fresca no puede bajar de los 2 grados y los preparados de carne molida sometida a cocción, máximo a 4 grados. Cualquiera de estas condiciones de temperaturas favorece la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes*, debido a sus capacidades sicotróficas y adaptaciones de tipo genético y fisiológico.

El periodo de tiempo de tiempo en el cual las células vegetativas de *Listeria monocytogenes* (Lm) se adapta a su entorno está relacionado a las condiciones



de relación entre la matriz de la CMP (pH, Aw, temperatura) que puede abarcar un tiempo de días o meses, tiempo en el cual no se detecta su existencia en los ensayos en laboratorio. Esta situación pone al producto cárnico en situación de trasladar un peligro al consumidor.

En vista de que la participación de un número alto de variables que están contenidas en la matriz de la CMP y otras variables de la Lm que permitan obtener respuestas coherentes biológicamente, se requiere realizar muchos ensayos experimentales en un periodo corto de tiempo y cuyos resultados muchas veces no se aproximan a lo que sucede en un crecimiento o declinación de esta; por lo tanto, se generan problemas para el establecimiento de un tiempo de vida útil aconsejable para el producto.

Lo expuesto exige encontrar suficientes explicaciones de lo que sucede a la matriz de la CMP cuando se contamina con células vegetativas de Lm para conocer sus parámetros de sobrevivencia a temperaturas de refrigeración menores a 15°C, con la finalidad de aportar con datos para un producto que está transitando del nivel artesanal al industrial y que puede ser causante de la Listeriosis, enfermedad considerada grave.

La complejidad de manejar muchas variables en conjunto y al mismo tiempo nos permite utilizar modelos matemáticos como el de Baranyi-Roberts contenidos en el Programa DMFit del Combase, de esta manera conocer los parámetros de la declinación de crecimiento, sobrevivencia, y estado fisiológico de Lm, los cuales, para este producto, se desconoce en nuestro medio.

1.2 Formulación del problema

1.2.1. Problema General

¿De qué forma se puede caracterizar la supervivencia no térmica de *L. monocytogenes* en la carne molida precocinada en condiciones de temperaturas de refrigeración?



1.2.2. Problemas Específicos

¿Cuáles son los parámetros cinéticos de la declinación del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en la carne molida precocinada conservado a temperaturas de 4°C, 10°C y 15°C?

¿Cuáles son las características de los parámetros de la adaptación de *Listeria monocytogenes* presente en la matriz de la carne molida precocinada?

¿Cuáles son los valores de los parámetros cinéticos de la supervivencia de *Listeria monocytogenes* presentes en la carne molida precocinada sometido a temperaturas no térmicas y su relación con el pH y Cloruro de Sodio?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Determinar las características de supervivencia de *L. monocytogenes* en la carne molida precocinada utilizando el modelo predictivo de Barangy y Roberts de Combase

1.3.2. Objetivo Específicos

- Determinar los parámetros cinéticos de la declinación del crecimiento de *Listeria monocytogenes* inoculadas experimentalmente en la carne molida precocinada a temperaturas de 4, 10 y 15°C mediante el modelo predictivo del programa: Tratamiento no Térmico, para *Listeria monocytogenes* del COMBASE.
- Determinar los parámetros de las condiciones de supervivencia no térmica de *Listeria monocytogenes* en la carne molida precocinada a temperaturas de 4, 10 y 15 °C, mediante el modelo predictivo del programa DMFit del COMBASE.



- Determinar el Factor D y estado fisiológico de *Listeria monocytogenes* en relación del pH y concentración (%) de ClNa y temperaturas de 4, 10 y 15 °C en la carne molida precocinada..

1.4 Limitantes de investigación

1.4.1. Teórica

El estudio se realizará en carne molida precocinada, considerando una carga microbiana representada por microorganismos como la *Listeria monocytogenes* considerada como uno de los principales agentes de enfermedades de transmisión alimentaria. Teóricamente las bacterias que sobreviven a un proceso no térmico serán las que determinen el tiempo de resistencia en la carne molida precocinada. Es por ello que *Listeria monocytogenes* es la más persistente ya que se desarrolla notablemente a temperaturas de refrigeración menores a los 10 °C, resisten medios con un pH tan alcalino como 9,6 y toleran altas concentraciones de cloruro de sodio de hasta un 10%. Además, son consideradas como un indicador de contaminación cruzada

1.4.2. Temporal

El ensayo experimental abarcó un periodo de tiempo en el cual los tratamientos denoten la culminación del periodo de declinación del crecimiento con una clara formación de cola en un evento que se desarrolla como función sigmoidea.

1.4.2. Espacial

Espacialmente el estudio utilizará la infraestructura del laboratorio de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional del Callao, que cuenta con los equipos para realizar pruebas microbiológicas y equipos de computación para desarrollar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y el modelamiento respectivo presenten en la carne molida precocinada.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Nacional



Sobre conservación no térmica tenemos los estudios de Barbosa y Bermúdez (2010) quienes “mencionan que las industrias alimentarias realizan procesos que brindan productos seguros, pero en muchos casos, la calidad de los mismos es significativamente peor a los productos no procesados. Por estas razones se ha empezado a investigar en forma sistemática, científico, tecnológico y práctico las llamadas tecnologías “no térmicas”. “Es del caso señalar que las tecnologías no térmicas pueden ser utilizadas en combinación entre ellas o con otras, buscando efectos sinérgicos lo cual redundará en procesos más cortos y la obtención de productos de mejor calidad”. (Barbosa y Bermúdez ,2010)

Son diversas formas de contaminación de los alimentos que pueden perjudicar al consumidor como lo presentado por Sánchez,(2013) quien “identificó las especies de *Listeria* sp. obtenidas de lugares de expendio de pollo en Trujillo. Obtuvo 37 cultivos de *Listeria* sp. aislados de lugares de expendio de pollo de los distritos de Trujillo y La Esperanza. Se identificaron 07 cultivos como *Listeria monocytogenes* (18,9%), 13 como *Listeria ivanovii* (35,2) y 17 como *Listeria innocua* (45,9%). Los hallazgos indican que *Listeria monocytogenes* es la especie se presenta en menor porcentaje”.

Alegre (2019) señala que “*Listeria monocytogenes* es un microorganismo patógeno responsable de la listeriosis humana, una enfermedad con alta morbilidad, hospitalización y mortalidad, principalmente en poblaciones vulnerables. Su presencia en alimentos es favorecida por su resistencia a bajas temperaturas y amplio rango de pH; los brotes están vinculados a carnes frescas y procesadas, productos lácteos y alimentos listos para su consumo”.

2.1.1. Internacional

La carne molida de res es un producto que últimamente está siendo utilizada en forma más frecuente en muchas formulaciones para elaborar otros productos cárnicos listos para su consumo y también se presta para muchos preparados en la cocina. Su adquisición se debe exigir que sea de buena calidad, debido a que podría contener aditivos, cortes no adecuados o microorganismos. Su



elección obliga a verificar que no presente olores extraños, coloración verdosa o gris, pérdida de textura, presencia de limo, temperatura de conservación, fecha de caducidad y procedencia; cualquier cambio de sus características puede indicar presencia de microorganismos alterantes o presencia de patógenos. Forester (2012), estudió “la presencia de *Listeria* en carne molida y estableció que el ganado y la carne molida (37 %) pueden albergar cepas virulentas de *L. monocytogenes*. Indica que se requiere hacer un mayor número de estudios en animales y en los productos que se obtienen de ellos para mejorar el control de la listeriosis#. Dedio y col. (2002) “reveló la presencia de *Listeria monocytogenes* en carne vacuna fresca en el área del Gran Mendoza; analizó 100 muestras de carne molida común, En total aisló 306 colonias, de las cuales 68 cepas se identificaron como *Listeria monocytogenes* El 37 % de las muestras de carne dieron positivas para *Listeria monocytogenes*”.

Rees et al (2017) señalan que “*L. monocytogenes* es una bacteria Gram positiva, anaerobio facultativo, psicrotrófico que habita en entornos naturales y artificiales donde su crecimiento es óptimo a 37 ° C, lo que refleja su papel como patógeno oportunista comensal e intestinal, a una temperatura amplia rango (0–45 ° C); es relativamente resistente al NaCl (crecimiento al 10%; supervivencia al 20-30%) en una amplia gama de condiciones de pH (pH 4.6–9.2). No es inhibido significativamente por el dióxido de carbono y puede sobrevivir a muchas técnicas de procesamiento como congelamiento y secado”.

Los procesos de elaboración de productos cárnicos pueden conducir a una contaminación por la superficies inertes, manipuladores, temperatura de las alas de elaboración, ventilación etc., generando su alteración o supervivencia de patógenos. Datta y col. (2012) “indican que los tejidos de la carne son susceptibles a contaminarse con microorganismos patógenos durante las etapas de sacrificio y procesamiento, de tal forma que la contaminación cruzada entre las superficies de la piel del animal o heces y la carne, los hace propensos a que esta contaminación faculte la presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni / coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia*

coli verotoxigénica y en cierta medida, *Listeria monocytogenes*. Por otro lado, Sanchez y col (2006) “analizaron muestras de aire, agua potable, agua residual, superficies vivas e inertes, materia prima y producto terminado para investigar la incidencia de *Listeria* spp., obteniendo baja incidencia de *L. monocytogenes* en materia prima, 30% de *L. innocua* en producto terminado; *L. innocua* en superficies inertes 36%. En agua potable y aire no se detectaron especies de *Listeria*, mientras que en agua residual se presentó 100% para *L. innocua*. Esto indica que existe escasa incidencia del patógeno en las muestras; pero, también existen condiciones adecuadas para que se pueda establecer, la presencia de la especie saprófita *L. innocua* en varias de las muestras que se analizaron”.

Son muchas las investigaciones sobre la prevalencia de *Listeria monocytogenes* y todas ellas llegan a resultados semejantes que nos lleva a considerar a *Listeria monocytogenes*, como un patógeno transmitido por los alimentos que causa la listeriosis humana, que se encuentra comúnmente en los productos cárnicos, por ello se requiere ver a esta bacteria con mayor interés para establecer controles más exigentes a través de la Buenas prácticas de manufactura y Haccp.

Cavalcanti (2022), estimó la “prevalencia de *L. monocytogenes* en una variedad de productos cárnicos brasileños, utilizando un metaanálisis de datos de la literatura. Se incluyeron en el estudio un total de 29 publicaciones de cinco bases de datos, publicadas entre el 1 de enero de 2009 y el 31 de diciembre de 2019. Estimada por el modelo de efectos aleatorios, la prevalencia combinada de *L. monocytogenes* fue del 13 %, con un rango de 0 a 59 %. La prevalencia combinada de *L. monocytogenes* fue del 14 % y el 11 % para la carne cruda y la carne lista para el consumo (RTE), respectivamente.

Con el fin de reducir el uso intensivo de una técnica de conservación y de esta forma producir un menor impacto en las características sensoriales y nutricionales del alimento se hace uso de la tecnología de tratamiento no térmico que implica el uso de diferentes técnicas de conservación, destacando el uso de aditivos químicos, empaques en atmósferas modificadas, almacenamiento a



bajas temperaturas, entre otros. En estas condiciones la carne molida es un producto que puede ser sometida a una cocción a temperaturas que eliminen o disminuyan la carga microbiana contaminante y presentar ausencia de microorganismos patógenos, manteniendo características de su matriz (pH, humedad, Actividad de agua) para ser almacenadas a temperatura de frío hasta cuando llegue al consumidor. Riesco et al., (2016) menciona que “la industria cárnica recurre en muchos casos a la incorporación de los conservantes químicos autorizados en el caso de la Unión Europea (Reglamento (UE) No 1129/2011), como el dióxido de azufre, sulfitos, nitratos, nitritos y acetato potásico”. Sin embargo, Velasco, (2018) menciona que “entre los conservantes más polémicos destacan las sales de nitrato y nitrito quienes en alimentos sometidos al asado pueden formar compuestos cancerígenos denominados “nitrosaminas”. Estos compuestos no están autorizados en carnes picadas, ya que mantienen la apariencia de fresca y podrían convertirse en coadyudantes de adulteración”.

De lo descrito anteriormente Giménez et al (2017) “determinaron el efecto de un proceso no térmico de preservación a altas presiones hidrostática (APH) de 600 MPa que a 400 MPa sobre el color y desarrollo de *Listeria monocytogenes* inoculada en carne bovina sometida a un pre-tratamiento con preservadores químicos durante un almacenamiento refrigerado a 4°C y 10°C. Las materias primas tenían un valor de pH entre 5.4 y 5.7. Se obtuvo como resultado que el crecimiento de *L. monocytogenes* en las muestras inoculadas, tratadas con solución de aditivos químicos y sometidas a APH y almacenadas tanto a 4°C como a 10 °C, presentaron recuentos por debajo del límite de detección (2 log UFC/g) lo cual significa que las altas presiones afectaron a las bacterias, impidiendo así su desarrollo normal”.

Gonzalez y col (2013). “Utilizaron tres lotes diferentes de chorizo y morcilla en el que fueron inoculados con una cepa nativa de *L. monocytogenes* a un nivel de 10^2 UFC/g junto con el bio-conservante *C. maltaromaticum* CB1 a un nivel de 10^3 UFC/g. Obtuvo mejores resultados con el bioconservante *C. maltaromaticum*

CB1 almacenados a 4°C y 8°C con una reducción significativa ($P < 0.05$) en los recuentos de *L. monocytogenes* durante 35 días”.

2.2. Bases Teóricas

Listeria monocytogenes es un patógeno potencialmente mortal que existe en la naturaleza en forma libre y que es transmitido por los alimentos. Actualmente cobra interés su crecimiento en alimentos listos para el consumo (LPC) por lo que debe controlarse estrictamente para garantizar su inocuidad y de ésta forma proteger la seguridad alimentaria de los consumidores.

La teoría de barreras justifica el uso de diversas técnicas para ejercer control sobre los microorganismos nativos, alterante o patógenos que existen en las matrices de los alimentos; sin embargo, los alimentos son ecosistemas complejos constituidos por la matriz del alimento y los organismos que viven en él. (Montville, 2000) considera que “el ambiente de un alimento está constituido por factores intrínsecos del alimento (el pH, la actividad de agua y los nutrientes) y factores extrínsecos a él como, la temperatura, la composición del aire o la presencia de otras bacterias”. Del mismo modo, McMeekin y col., (1993); Krist y col., (1998) consideran que “entre otros ambientales que pueden tener influencia sobre el crecimiento bacteriano destacan los siguientes: la temperatura, el pH, los solutos y la actividad de agua, la concentración de oxígeno, la presión y la radiación, y que en muchos sistemas alimentarios, la temperatura, la actividad de agua y el pH son los factores claves que controlan el crecimiento bacteriano. Las respuestas de las bacterias a estos factores de crecimiento son altamente reproducibles, permitiendo que las respuestas sean resumidas como modelos matemáticos”.

Las tecnologías de conservación de alimentos tienen como herramienta de control de microorganismos el uso de temperaturas altas (pasteurización y esterilización) y temperaturas bajas (refrigeración y congelación). La eficiencia de estos tratamientos está supeditada a los componentes naturales de la

materia prima (factores intrínsecos). Huang y col, 2022, “realizaron un estudio para definir el límite de crecimiento y no crecimiento de *L. monocytogenes* en carne molida con tripolifosfato de sodio (STPP), lactato de sodio (NaL), diacetato de sodio (NaDiAc), cloruro de sodio (NaCl), nitrito de sodio (NaNO₂) y pH como factores de control. Se encontró que NaNO₂ (1800 ppm) y NaDiAc (2500 ppm) no fueron efectivos para prevenir el crecimiento cuando se aplicaron solos. STPP demostró ser muy eficaz para prevenir el crecimiento de *L. monocytogenes*. Su crecimiento no se vio obstaculizado a pH 6-7, pero se inhibió cada vez más allá del rango neutral; así mismo, consideró que el control de la temperatura se encuentra entre los factores más críticos y precisos para el logro de un suministro alimentario que reúna las propiedades sanitarias y organolépticas correctas”.

“Cuando la utilidad del tratamiento térmico y las conservación a bajas temperaturas son aplicadas como elementos de control de la actividad enzimática bacteriana se está afectando el metabolismo celular y en la medida que la temperaturas aumente hasta el óptimo para su metabolismo *Listeria monocytogenes* crecerá; por encima del óptimo el crecimiento disminuye hasta alcanzar el periodo de muerte” (Prescott y col., 1999 ;Montville, 2000); en tanto que, a temperaturas de frio la actividad enzimática disminuye en proporción al descenso de temperatura hasta un punto de inactividad enzimática para algunas bacteria y para otras, como *Listeria monocytogenes* es favorable y se generará un estado de sobrevivencia de células vegetativas dentro de las condiciones intrínsecas del alimento. En ambos casos puede existir una fase de latencia o adaptación en el cual el microorganismo adquiere capacidades de metabólicas y genéticas que le permite la adaptación y sobrevivientes vegetativos de patógenos, muchas veces no detectables por los ensayos en laboratorio.

A su vez las propiedades coligativas, reológicas y de textura de un alimento dependen de su contenido de agua, aun cuando éste también influye definitivamente en las reacciones físicas, químicas, enzimáticas y microbiológicas. “El agua se divide en “libre” y en “ligada”; la primera sería la única disponible para el crecimiento de los microorganismos y para intervenir en



las otras transformaciones, ya que la segunda está unida a la superficie sólida y no actúa por estar “no disponible o inmóvil”. Es decir, sólo una fracción del agua, llamada actividad del agua es capaz de propiciar estos cambios y es aquella que tiene movilidad o disponibilidad. Es con base en este valor empírico que se puede predecir la estabilidad y la vida útil de un producto, y no con su contenido de agua (Badui, 2006).

El pH es otro de los principales factores que determina la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos durante el proceso, el almacenamiento y la distribución. Es difícil separar el efecto del pH y el de otros factores que dependen del pH, por ejemplo, los microorganismos se ven afectados por el nivel de iones H⁺ libres, y además por la concentración de ácido débil no disociado, que depende a su vez del pH. Los límites de pH para el crecimiento difieren ampliamente entre los microorganismos, dentro del rango comprendido entre 1 y 11. “Muchos microorganismos crecen a velocidad óptima alrededor de 7, pero pueden crecer bien entre 5 y 8. Hay sin embargo algunas excepciones: las bacterias lácticas cuyo pH óptimo se encuentra entre 5.5 y 6.0. Los valores máximos de pH a los que es posible el crecimiento son similares en levaduras, hongos y bacterias” (Ramirez, 2006).

La bioconservación y las temperaturas de refrigeración surgen como una alternativa más para conservar productos cárnicos. Los conservantes a base de fermentación ácido láctica funcionan gracias a su acción bactericida o bacteriostática que permite utilizarlos en el control del crecimiento bacteriano en productos refrigerados listos para el consumo. Gomez y col., (2019) “evaluó la capacidad de tres extractos concentrados de bacteriocinas, provenientes de los cultivos de *Enterococcus mundtii*, para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A en un modelo alimentario de hamburguesas. Como resultados se obtuvo que la población de *L. monocytogenes* Scott A en dicho modelo que contiene el extracto antilisteria de *E. mundtii* Tw56 disminuyó desde 4 log UCF/g el día 0 hasta que desaparece completamente el día 3, y en presencia de los otros extractos desaparece recién en el día 7. Por otro lado, la



población de *L. monocytogenes* en presencia de las Bacterias Lácticas (BL) productoras desaparece en el día 5. Mientras que, sin la adición de extractos ni de las BL, el crecimiento de *L. monocytogenes* se mantuvo constante durante los 15 días. Conclusiones: Es evidente el potencial de aplicación de dichos extractos, así como el agregado de las BL productoras, para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* a lo largo de la vida útil esperada de un alimento procesado”.

En los estudios experimentales el uso de muchas variables al mismo tiempo puede distorsionar, de alguna manera, los resultados del experimento; ante esta situación se tienen las herramientas ofrecidas por la Microbiología predictiva que aporta instrumentos estadístico-matemáticos de modelos matemáticos que permiten predecir el crecimiento microbiano presente en el alimento cuando se conocen las condiciones en que éste se mantiene. La utilidad del modelo de Baranyi-Roberts es la más utilizada en muchos ensayos a nivel de ensayos de laboratorio y como sustrato se utiliza un medio de cultivo en condición de caldo con el aporte nutritivo apropiado.

Algunos de las investigaciones que utilizaron los modelos matemáticos, encontramos en Hereu y col.,(2014) quienes “analizaron el comportamiento de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos cocinados (jamón cocido y mortadela) durante el almacenamiento refrigerado (4 °C a 12 °C) después de un tratamiento de alta presión a 400 MPa. Para estimar los parámetros de crecimiento cinético para cada curva de crecimiento, se ajustó con el modelo de crecimiento logístico primario con retraso. Para las muestras sin tratamiento de alta presión, el estado fisiológico de la *L. monocytogenes* inoculada (es decir, adaptada a 8 °C o congelada a -80 °C) no influyó en la cinética de crecimiento del patógeno durante el almacenamiento refrigerado posterior. Independientemente del estado fisiológico, no se observó ningún tiempo de retraso (fase lag), excepto para *L. monocytogenes* estresada por congelación en mortadela almacenada a 4 °C, y las tasas de crecimiento fueron similares para ambos productos en promedio, siendo $0,032 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$, $0,070 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$ y $0,117 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$ a 4 °C, 8 °C y 12 °C, respectivamente.

Ju y col. (2014), desarrollaron un modelo de crecimiento predictivo de *Listeria monocytogenes* en carne de cerdo cruda. Las muestras se inocularon con dos cepas de *L. monocytogenes* ATCC 15313 y L13-2 aisladas de cerdo y se almacenaron a 5, 15 y 25 C. Los resultados se evaluaron utilizando el programa MicroFit. Los modelos predictivos en este estudio fueron desarrollados por los modelos de Baranyi, Gompertz modificado y Logístico basados en datos experimentales. El modelo de Baranyi predijo que la tasa de crecimiento específica (μ_{max}) aumentó gradualmente con valores de 0.05, 0.47 y 0,65 log UFC/g/h a medida que aumentaban las temperaturas de almacenamiento (5, 15 y 25 C, respectivamente). Sin embargo, las tasas de crecimiento específicas en los modelos modificados de Gompertz y Logístico fueron más altas que las tasas predichas en el modelo de Baranyi. El modelo de Gompertz modificado predijo que las tasas de crecimiento específicas a 5, 15 y 25 C fueron 0,11, 1,01 y 1,33 log CFU/g/h. En el modelo logístico, se predijo que las tasas de crecimiento específico a 5, 15 y 25 C serían 0,11, 0,97 y 1,29 log CFU/g/h. Park, Bahk, Park, Park y Ryu (2010) mostraron resultados similares donde la tasa de crecimiento específica usando el modelo de Baranyi fue mayor que la tasa usando el modelo de Gompertz. Estos valores indicaron que los modelos desarrollados fueron aceptables para expresar el crecimiento de microorganismos en la carne de cerdo cruda, lo que puede aplicarse para garantizar la inocuidad de las carnes y establecer estándares para evitar la contaminación microbiana.

2.3 Conceptual

Microbiología predictiva (MP)

La microbiología predictiva es un método rápido para la obtención de resultados en menor tiempo de manera concreta y fiable, que permite evaluar las respuestas de los microorganismos a los factores del medio ambiente con su crecimiento o inactivación del mismo, a través de modelos matemáticos, de tal manera con el

apoyo de este método se resuelve problemas sobre seguridad alimentaria y el deterioro de alimentos (Rassoly & Herold, 2008). (McMeekin et al., 2002).

Crecimiento bacteriano

En microbiología la palabra crecimiento se define como un incremento en el número de células o de masa celular por unidad de tiempo de una población microbiana (Madigan y col., 1997). El crecimiento ocasiona un aumento del número de células cuando los microorganismos se multiplican por procesos como gemación o fisión binaria en este caso las células individuales se agrandan y dividen para originar dos células hijas de un tamaño aproximadamente igual (Prescott y col., 1999).

Curvas de Crecimiento

Las curvas de crecimiento de un cultivo microbiano están divididas en cuatro fases denominadas: Fase de latencia, Fase exponencial o logarítmica, Fase estacionaria y Fase muerte. Estas etapas son la consecuencia de distintos factores como el agotamiento de las reservas celulares de energía, al igual que el crecimiento la muerte asume una función exponencial que es representada por una disminución lineal del número de células viables al largo del tiempo. (Madigan y col.1997; Prescott y col.1999)

Modelos predictivos

Es un modelo de datos para conocer el comportamiento de los microorganismos en condiciones previsible es preciso conocer la evolución de los factores que influyen sobre su crecimiento como, por ejemplo, pH, actividad de agua, temperatura y sal. Precisamente, la microbiología predictiva se basa en que el crecimiento microbiano sobre los alimentos resulta, en cierto modo, reproducible frente a estos factores ambientales. Por consiguiente, se trata de un comportamiento que podría recogerse en distintos modelos matemáticos que estimen tanto el crecimiento microbiano, como su inactivación, producción de toxinas, probabilidad de crecimiento, etc. (Ross, et al, 2000).

Modelos matemáticos

Son expresiones matemáticas que describen el desarrollo, sobrevivencia, inactivación o proceso bioquímico de los microorganismos encontrados en alimentos (McDonald y Sun, 1999).

Tiempo generacional

Es el tiempo necesario para que se duplique una población bacteriana. Según Stanier y col,(2005) lo define como el tiempo requerido para que todos los componentes del cultivo aumenten en un factor de 2. Durante este periodo de generación el número de células y la masa celular se duplica. El tiempo de generación es útil como indicador del estado fisiológico de una población celular, y es usado con frecuencia para comprobar el efecto negativo o positivo de un determinado tratamiento sobre un cultivo bacteriano" (Madigan y col .1997).

Velocidad de crecimiento

El crecimiento se define como un incremento del número de células microbianas o de la masa microbiana en una población. En consecuencia, "la velocidad de crecimiento es el cambio en número de células o de la masa celular por unidad de tiempo" (Madigan ,1999). Un cultivo microbiano creciendo en equilibrio imita una reacción autocatalítica de primer orden, es decir, la velocidad del aumento de bacterias en un tiempo dado es proporcional al número o masa de bacterias presentes durante ese tiempo (Stanier y col .1989). La tasa del crecimiento exponencial (velocidad) de un microorganismo influyen dos conjuntos de factores: las condiciones ambientales (temperatura, pH, composición del medio), y las características genéticas del microorganismo (Madigan y col .1997).

2.4. Definición de términos básicos

Carne



Según el Codex alimentarius define la carne como “todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin” (Alimentos et al., 2017).

Carne molida

NTE INEN 1 346, (2010) lo define como carne apta para el consumo humano, dividida finamente por procedimientos mecánicos y sin aditivo alguno” proveniente principalmente de tejido muscular que incluye, además, tejidos blandos (adiposo, epitelial, nervioso) picado finamente por una máquina trituradora de carne. Generalmente, la carne molida procede del pecho, pecho centro, pecho punta y falda del ganado vacuno. Al ser la mayoría proveniente de tejido muscular provee proteínas y lípidos necesarios en la dieta humana. (Arroyo Llantín, 2008)

Inactivación bacteriana

Se define como la disminución del recuento bacteriano, es decir, a fenómenos de letalidad. Un agente o factor inactivando o letal se llama bactericida (o listericida, si actúa contra Listeria). Desde el punto de vista cinético, el parámetro nombrado valor D, o tiempo de reducción decimal, es el tiempo de exposición a un factor letal que es necesario para inactivar (reducir) el 90% (1 unidad logarítmica) la población de un determinado microorganismo.

Supervivencia

Se refiere a la capacidad del microorganismo para mantener su viabilidad en unas determinadas condiciones que la comprometen. Generalmente, este concepto se utiliza para describir situaciones en que no se aprecia una disminución rápida o brusca de la concentración bacteriana.

Calidad microbiológica

Producto que cumple con los criterios microbiológicos de inocuidad alimentaria. Abarca no solo la determinación de la presencia o ausencia de microorganismos en los alimentos, sean elaborados artesanal o industrialmente, sino también



implica garantizar el cumplimiento de las condiciones higiénico-sanitarias bajo las cuales fueron elaborados. El cumplimiento de ambas características garantiza que el producto elaborado es apto para ser consumido. (Soberon , 2020)

Vida útil

Se define como el período durante el cual el alimento es deseable para el consumo. (Gutiérrez, 2000). En función de criterios de aceptabilidad que incluyen el mantenimiento de las propiedades sensoriales (en la llamada vida útil comercial), que se pueden alterar por reacciones fisicoquímicas, bioquímicas o bien por la acción de microorganismos alteradores; el cumplimiento de las declaraciones nutricionales del producto y la garantía de la inocuidad del producto (vida útil segura), el cual no ha de tener la presencia de un o más peligros (p. ex. microorganismo patógeno y/o toxina) a niveles inaceptables que supongan un riesgo por la salud del consumidor (CCFRA,2004).

Modelo de Baranyi y Roberts

“El modelo de Baranyi y Roberts (1994) describe una curva bacteriana sigmoidea. La diferencia principal entre este modelo y otras curvas sigmoidales como la función modificada de Gompertz, el modelo logístico, etc., es que las interfases son más lineales que los de aquellas curvas sigmoideas clásicas, las cuales tienen una mayor pronunciación en la curvatura de estas interfases. El modelo de Baranyi y Roberts tiene 4 parámetros principales (valor inicial, fase de latencia o retraso/interfase, tasa máxima, valor final) y 2 parámetros de curvatura: mCurv y nCurv, los cuales describen la curvatura de la curva sigmoidea respectivamente al principio y al final de la fase de crecimiento° (DMFiT, 2009). “Pretende calcular la evolución más probable del crecimiento del microorganismo, siguiendo la curva más frecuente, es decir, una sigmoidea (forma de s). Éste es una parte del sistema empleado para el cálculo de las variaciones de tiempo necesarias para que un microorganismo se duplique”. (Baranyi y col. 2004)

Modelo de Barayi-Roberts

$$y(t) = y_0 - \mu_{max} F(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{max} F(t)} - 1}{e^{(y_{max} - y_0)}}\right) \quad (1)$$

$$F(t) = t + \frac{1}{v} \ln(e^{-vt} + e^{-h_0} e^{(-vt - h_0)}) \quad (2)$$

$y(t)$ = concentración celular al tiempo t

y_0 = concentración celular inicial

y_{max} = concentración máxima de células

μ_{max} = velocidad de crecimiento máxima específica

v = velocidad de aumento del reactivo limitante

h_0 = estado fisiológico de las células

λ = duración de la fase de adaptación

(Baranyi y col. 1999; Gonzales y col, 2022.)

Tiempo de reducción decimal (valor D)

“Es el tiempo necesario para disminuir un ciclo logarítmico la carga microbiana, entendiéndose como la forma de destruir el 90% de la población microbiana de un determinado microorganismo a una temperatura dada, y se ha usado como modelo de inactivación bacteriana dado que puede ser extrapolado a un proceso industrial” (Lee and Kaletunc, 2002; Vasan et al., 2013).

Predicción del crecimiento microbiano

La informática, y el consiguiente desarrollo de programas adecuados, ha de permitir conocer qué microorganismos pueden crecer y a qué nivel, su capacidad para producir toxinas o si en determinadas condiciones pueden eliminarse los peligros asociados. “Actualmente, la predicción del crecimiento de patógenos es algo que se ha estado realizando de forma anecdótica en algunos centros de investigación. El gran inconveniente es que, al no intercambiar información, se estaba evidenciando que se desarrollaban estudios similares o en condiciones no comparables”. (Rodriguez, 2014).

ComBase

Es considerada como una base de datos ComBase, en la que se recoge información de las respuestas microbianas más probables ante diversas

condiciones ambientales. ComBase es la mayor iniciativa para coordinar los datos existentes en la actualidad y que se puedan generar en el futuro. Se mantiene gracias al ComBase Consortium, establecido en Londres en mayo de 2003, como una colaboración entre la Food Standards Agency (Reino Unido), el Institute of Food Research (Reino Unido), el USDA Agricultural Research Service (EEUU) y el Eastern Regional Research Center (EEUU).

Estado fisiológico (h_0)

Es un parámetro adimensional que cuantifica el estado fisiológico inicial de las células. Sus dimensiones tienen como límite superior el valor de 1 y el menor 0. El estado fisiológico será idéntico, en un principio, al que tenían en el medio y fase donde se encontrasen (fase exponencial o estacionaria) y que poco a poco, su estado fisiológico se acercará al que tienen los microorganismos en la fase exponencial de crecimiento. Mackey (2000)

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1. Hipótesis

3.1.1. Hipótesis general

Los parámetros de la supervivencia no térmica de *L. monocytogenes* en la carne molida precocinada se logra caracterizar mediante el modelo predictivo de Barangy y Roberts del Programa DMFit del ComBase.

3.1.2. Hipótesis específicas

- Los parámetros cinéticos de la declinación del crecimiento de *Listeria monocytogenes* por efecto del almacenamiento en temperaturas de refrigeración se caracterizan mediante el modelo predictivo de Barangy y Roberts del programa ComBase.
- El modelo predictivo de Barangy y Roberts del programa DMFIT del COMBASE determina las condiciones de supervivencia de *Listeria*

monocytogenes (Log UFC/g) a temperaturas de 4, 10 y 15 °C en la carne molida precocinada.

- Los parámetros cinéticos de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en las condiciones de pH y ClNa de la carne molida precocinada a temperaturas de 4, 10 y 15 °C permite establecer el Factor D y el estados fisiológico.

3.2. Definición conceptual de variables

3.2.1. Variable independiente

Las curvas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* (-Log UFC/g) que permitirán obtener los parámetros característicos de la supervivencia en la carne molida precocinada, almacenadas en temperaturas de refrigeración.

3.2.2. Variable dependiente

La supervivencia no térmica de *Listeria monocytogenes* presente en la carne molida precocinada caracterizado por el modelo de Barangy y Roberts

3.3. Operacionalización de variables

Variable	Dimensión	Indicador	Índice	Método	Técnica
Dependiente: Caracterización de la Supervivencia no térmica	Supervivencia	Inocuidad	Valor D y Estado fisiológico	Numeración de UFC/g de <i>Listeria monocytogenes</i> en la carne molida precocinada	Curvas de declinación del crecimiento.
Variable independiente:	Parámetros cinéticos	Ajuste de curva por	Variación de parámetros	Selección de variables	Modelo predictivo

Curvas de supervivencia de L. monocytogenes en la carne molida precocinada	y declinación del crecimiento	Modelo de Baranyi-Roberts	de Muerte celular) :(- μ_{max} = Log UFC/g/h Fase lag λ (Horas) Tg= Horas	de ingreso al modelo (Temperatura, pH, NaCl)	del programa COMBASE para el ajuste de datos.
--	-------------------------------	---------------------------	--	--	---

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Tipo y diseño de la investigación

4.1.1. Tipo de investigación

La investigación es de tipo prospectivo, porque los datos se recogen a medida que van sucediendo; longitudinal, las variables se caracterizaron en función del tiempo; y experimental, porque se manipuló la variable experimental no comprobada, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce la sobrevivencia de Listeria monocytogenes en la carne molida precocinada

4.1.2. Diseño de investigación

Se aplicó un diseño factorial simple, para lo cual se establecieron 3 grupos experimentales cada uno con 03 muestras o repeticiones. Cada grupo fue almacenado a una temperatura de 4, 10 y 15 °C. De cada grupo se obtuvieron el promedio de la tasa de la declinación del crecimiento ($-\mu_{max}$), Duración de la fase de latencia (λ , horas) y el respectivo Coeficiente de determinación.

4.2. Método de investigación

Se formaron 3 grupos experimentales de carne molida precocinada que incluyen 3 muestras, a cada una de ellas se inocularon células vegetativas de Listeria monocytogenes en cantidad de Log 8.0 UFC/g. Un grupo fue conservado a temperatura de 4°C, otro a 10 °C y el último a 15 °C. De cada grupo se obtuvieron valores promedios de pH y porcentaje de humedad y número de células vegetativas sobrevivientes de Listeria monocytogenes en función del tiempo. Cada grupo quedó expresado como una curva de la declinación del crecimiento

que fue ajustado mediante el modelo matemático de Baranyi-Roberts integrado en la herramienta del DMFit del Programa ComBase; la cual reportó los parámetros que caracterizaron la sobrevivencia en los términos de la tasa de declinación de crecimiento, tiempo de adaptación, tiempo generacional, estado fisiológico y Factor D.

4.3. Población y muestra

4.3.1. Población

La población estuvo representada por 6.0 kilos de carne molida precocinada que servirán de sustrato o matriz para los fines experimentales de la presente investigación.

4.3.2. Muestra

El tamaño de la muestra fue del mismo tamaño que la población y a partir de esta se obtuvieron cantidades o muestras para las repeticiones integrantes de cada grupo experimental. De esta forma cada unidad de análisis tendrá la posibilidad de ser ensayada manteniendo poblaciones semejantes de *Listeria monocytogenes* inoculadas en la matriz cárnica.

4.4. Lugar del estudio

El estudio se ejecutará en el Laboratorio de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional del Callao,

4.5. Técnicas e instrumentos para la recolección de la información.

Obtención y recepción de la materia prima

Se utilizó como materia prima, carne molida precocinada a una temperatura de 80 °C y un tiempo de cocción de 30 minutos para luego ser envasadas en bolsas de plástico con cierre zip con capacidad de 2 Kg. Inmediatamente se procedió al enfriamiento en agua helada conservándola así para su transporte e inmediato análisis en laboratorio.

Análisis físico-químico

Determinación de la humedad



De cada una de las unidades experimentales de cada grupo se tomó y pesaron 5 g de CMP y colocadas en una Balanza electrónica para medir humedad. Modelo VE-50-5, obteniendo directamente la humedad en gramos y porcentaje.

Determinación del pH

Se utilizó un medidor de pH HI98163 HANNA, que mide el pH y la temperatura utilizando el electrodo FC2323 especializado para medir en carnes con una cuchilla de perforación de acero inoxidable. El electrodo es introducido directamente en la CMP de cada una de las unidades experimentales de cada grupo.

Calidad microbiológica

En forma paralela al análisis físico químico de los grupos experimentales se procedió con el análisis microbiológico de la CMP los cuales se realizaron por triplicado, siguiendo las exigencias de la normatividad peruana, NTS N° 071- MINSA/DIGESA-V. 01: “Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano”, se realizó los ensayos bacteriológicos para numerar: mesófilos aerobios, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp; siguiendo las técnicas operativas del Manual Digesa: Laboratorio microbiología de alimentos.

Ensayos de las curvas de sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en la CMP.

Preparación del inóculo.

Se obtuvo la cepa de *Listeria monocytogenes* ATTC 1911, la cual se conservó en congelación de -18 °C hasta el momento de su uso. La activación se realizó mediante un repique del cepario a 10 ml de caldo triptona soya (TSB) estéril e incubada a 37 °C por 24 horas, la cual se repite por 24 horas. (Giménez et al. ,2016). Del último cultivo se obtiene 1 mL y se trasplanta en un tubo con 9 mL de TSB estéril e incubarla a 37°C. por 18 hs, tiempo en el cual se obtendrá una población probable máxima de 8.0 (modelamiento ComBase). Para la verificación del número de células de Lm se realizó la numeración en un cultivo en Agar Plate Count (APC). Posteriormente se procedió a obtener concentraciones de 10 Log UFC/ml por centrifugación para proceder a la contaminación en la CMP.

Proceso de inoculación



Para cada Tratamiento o grupo experimental se utilizaron 3 envases (unidades experimentales) cada uno con 100 gramos de carne molida precocinada, a cada uno de ellos se inoculó 1 ml de suspensión Log 10 UFC/ml de *Listeria monocytogenes* para lograr, al final de la homogenización de carne molida, un nivel de inóculo de de 8 Log UFC/g. Una vez que las unidades experimentales, de cada grupo, estuvieron contaminadas con células de Lm fueron conservadas a 4°C, 10 y 15 °C, siguiendo el esquema del diseño experimental, en las cuales se evaluaron los cambios de la población microbiana (Log UFC/g) como respuesta al pH humedad y adición de Cloruro de sodio (ClNa).de la CMP.

Obtención de la curva de declinación del crecimiento en la CMP

El volumen del inóculo de Lm se incorporó y homogenizó en las unidades experimentales de cada grupo utilizando un homogenizador Stomacher® 400 Circulator Se pesó 5g de CMP y con 45 ml de agua destilada estéril, luego se procedió con la homogenización constante para continuar la dilución al décimo hasta lograr una dilución que permita detectar un número de colonias entre 30 – 300 UFC/g. Esta acción se repetirá desde el inicio (tiempo cero, T₀) hasta cubrir tantas iteraciones como lo requiera el comportamiento de Lm en la Matriz de la CMP, durante la conservación a las temperaturas planteadas en el estudio.

Numeración de Lm en Agar PALCAM

El número de colonias halladas en cada iteración se realizó siguiendo la técnica de numeración por siembra por inmersión utilizando el medio selectivo Agar Palcam, incubando los cultivos a 37 °C por 24 horas.(Mamani, 2016).

Modelamiento del tratamiento no térmico de *Listeria monocytogenes* en el ComBase

Se determinaron los parámetros cinéticos del tratamiento no térmico de *Listeria monocytogenes* referenciados a las condiciones de la matriz de CMP y temperaturas de 4, 10 y 15 °C, utilizando el modelo predictivo de Baranyi-Roberts del programa COMBASE el cual realiza el ajuste de las curvas de declinación del crecimiento de *Listeria monocytogenes* cuya data es originada en un caldo como medio de cultivo para la obtención de la fase de adaptación o fase Lag (A), la tasa máxima de declinación de crecimiento exponencial ($-\mu_{max}$) y el tiempo generacional (T_g), como descriptores

microbiológicos. El modelamiento facilitó la determinación del uso de la concentración porcentual de ClNa y variación de pH en la etapa de obtención de parámetros de supervivencia en la matriz de la CMP

Determinación de los parámetros de supervivencia no térmica de *Lm* en la carne molida precocinada a temperaturas de 4, 10 y 15 °C-

Se utilizó la herramienta DMFit del programa Combase para determinar los parámetros de la supervivencia de *Lm* en la CMP conservada a temperaturas de 4, 10 y 15 °C, como la tasa máxima de la declinación del crecimiento y la fase Lag y su estadístico coeficiente de determinación (R^2). Mediante cálculos basados en dichos parámetros se determinaron el valor D y el estado fisiológico inicial de las células vegetativas mediante la siguiente ecuación:

$$EFC = 10^{(-Lag \times \text{tasa máxima de crecimiento})}$$

4.6. Análisis y procedimiento de datos

Las curvas de crecimiento y supervivencia serán ajustadas por el modelo de Barangy y Roberts utilizando el Programa de Combase y la bondad de ajuste, para ambas, será interpretada por el indicador estadístico Coeficiente de Determinación (R^2).

La comparación de las velocidades de crecimiento y supervivencia de *Lm* entre los tratamientos se realizará mediante el diseño de ANOVA. Así mismo, la medición de la desviación promedio entre el valor ajustado y el observado se realizará de acuerdo con el coeficiente de determinación (R^2).

V. RESULTADOS

5.1 Resultados descriptivos

- Caracterización de la carne molida



Se prepararon tres grupos de carne molida precocida cada uno de ellos con 300 gramos, a los cuales se determinaron el pH, Humedad; así como, su calidad microbiológica.

La tabla N° 1 muestra los valores promedios (n=3) de pH obtenidos al inicio del experimento, observándose que las muestras conservadas a 4 °C, 10 °C y 15 °C inician con un pH de 5.83, 5.81 y 5.83 y al término del periodo experimental de 19, 12 y 6 días el pH varió en un porcentaje de 7.20, 9.12 y 10.46 %, respectivamente.

Las condiciones experimentales exigen que las muestras tengan relativamente un pH cercanamente similar entre sí y esta condición se estableció a través del análisis de varianza que indica que al inicio experimental no existe diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$) entre las muestras estudiadas; sin embargo, la variación del pH final presenta diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) y que esta diferencia se atribuye a los factores que intervinieron en el periodo de conservación a las temperaturas experimentales.

La humedad es otro de los parámetros que caracteriza a la matriz de las muestras por el aporte de agua para mantener la biodisponibilidad de los nutrientes y también las condiciones para la actividad enzimática y crecimiento de bacterias alterantes y patógenas.

En la tabla N° 1, se presentan los valores promedios (n=3) de la humedad contenida por las muestras de carne de res precocida mostrados al inicio del experimento, destacándose que las muestras conservadas a 4 °C, 10 °C y 15 °C mantienen una humedad inicial de, respectivamente, 78.96, 77.73 y 78.01% y del mismo modo, al final del experimento el valor inicial disminuye en 9.38, 4.10 y 1.14 %; durante los periodos de conservación de 19, 12 y 6 días, respectivamente.



La comparación de los porcentajes de humedad inicial de las muestras experimentales mediante el análisis de varianza indica que son similares entre ellas, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$); mientras que la humedad final presente en cada temperatura son diferentes estadísticamente significativos ($p < 0.05$) entre ellos, atribuible a los factores como la temperatura, pH y actividad bacteriana.

Tabla 1. Comportamiento del pH y la pérdida de humedad, inicial y final de la carne molida de res precocinada conservada a temperaturas de 4, 10 y 15 °C.						
Temperatura	pH			Humedad		
	Valor Inicial	Variación (%)	Tiempo (días)	Valor Inicial	% Variación	Tiempo (días)
4 °C	5.83	7.20	19	78.96	9.38	19
10 °C	5.81	9.12	12	77.73	4.1	12
15 °C	5.83	10.46	6	78.01	1.14	6

Fuente: Elaboración propia

La Tabla 2. presenta los valores microbiológicos de las muestras de CMP para los indicadores de inocuidad exigidos como Numeración de Mesófilos aerobios, 30 °C (NMA), Escherichia coli (Ec), Staphylococcus aureus (Sa) y Salmonella sp (Ssp). Las muestras que se conservaron a 5, 10 y 15 °C presentan una carga bacteriana promedio de NMA de 2.57, 2.77, 2.75 Log UFC/g ($p > 0.05$), respectivamente. Referente a EC los promedios, para las mismas temperaturas fueron 1.17, 1.22, 1.25 Log NMP/g ($p > 0.05$). Para el caso de Sa todas las muestras tuvieron un nivel de < 10 Log UFC/g y Ssp Ausencia/25 g. Estos resultados indican que la CMP tiene una calidad microbiológica que garantiza una condición de apta para consumo humano (NTP, 2008).

Tabla 2. Calidad microbiológica de las muestras de carne molida de res precocidas			
Agente bacteriano	Temperaturas de conservación		
	5 °C	10 °C	15 °C
Numeración Mesófilos aerobios (Log UFC/g)	2.57±0.25	2.77±0.12	2.75±0.1125

Escherichia coli (UFC/g)	1.17±1.25	1.22±1.25	1.25±1.63
Staphylococcus aureus (UFC/g)	<10	<10	<10
Salmonella sp. (A/P)	Ausente	Ausente	Ausente

Fuente: Elaboración propia

5.2 Resultados inferenciales

- Modelamiento de la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* utilizando el Programa del Combase

Las condiciones que establece el Programa de tratamiento no térmico incorporado en el ComBase indica que el procesamiento de la data de decrecimiento o muerte celulares es procesado considerando que el sustrato es un medio de cultivo líquido o caldo. Además, el Programa permite seleccionar el nombre del patógeno: *Listeria monocytogenes*, pH, Temperatura, % concentración de CNa (mínimo 6.6 %); por otro lado, por defecto, ofrece el estado fisiológico (h_0). Como respuesta se obtiene tasa máxima de la velocidad del decrecimiento (-log.UFC/h), Valor D(Horas) y Tiempo Lag o tiempo de adaptación (Horas).

Se procedió al modelamiento de la sobrevivencia no térmico para determinar el tiempo de reducción decimal (valor D), el cual es considerado como el tiempo necesario para destruir el 90% de la población de *Listeria monocytogenes* (Lm) a una temperatura de 4, 10 y 15 °C, en condiciones de pH 5.0, 5.5 y 6.0 (variación probable de pH en procesos de almacenamiento) y concentración CNa de 6.6%. (mínima concentración probable para inhibir el crecimiento de Lm).

La característica más importante para la descripción de procesos de crecimiento o no crecimiento es la velocidad en la cual se realiza el evento. La Tabla 3, muestra los resultados del modelamiento efectuado con el programa de supervivencia no térmica del ComBase, observándose que $-\mu_{max}$, (log.UFC//h) es -0.001a 4 °C y pH 5, 5.5 y 6, es semejante hasta un alcance de 6000 horas (250 días) y cada 12.54 días se produce la muerte de un nivele generacional;

mientras que a temperatura de 10 °C $-\mu_{\max}$ es igual para pH 5.5 y 6, es menor a pH a pH 5 y a 15 °C el pH 6 el Tg es semejante a 4 °C. Estos resultados indican que el pH esta relacionado al pH a una concentración constante de 6.6% de CINa.

Tabla 3. Velocidad de la Tasa Máxima de la declinación de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> según modelo de Baranyi-Roberts Programa Combase			
Temperatura	pH	($-\mu_{\max}$, log.UFC//h)	Tiempo de muerte generacional (Tg, días)
4 °C	5.0	-0.001	-12.54
	5.5	-0.001	-12.54
	6.0	-0.001	-12.54
10 °C	5.0	-0.002	-6.27
	5.5	-0.001	-12.54
	6.0	-0.001	-12.54
15 °C	5.0	-0.002	-6.27
	5.5	-0.002	-6.27
	6.0	-0.001	-12.54

Fuente: Elaboración propia

La Tabla 4, muestra los parámetros cinéticos de sobrevivencia de Lm según el modelo de Baranyi, en condiciones de pH 5, 5.5 y 6.0 y CINa 6.6 % y temperatura de 5, 10 y 15 °C. Se que observa que la sobrevivencia es más permisible a 4 °C en donde Lm toma un periodo de 1,910.90 horas (79.62 días) para adaptarse a su entorno y tener probabilidades de iniciar su crecimiento pese a encontrarse a un entorno de hiperosmolaridad producido por la concentración de sal 6.6%, así como cristales de hielo que se pueden estar formando. Sin embargo, el valor de sobrevivencia, valor D, se incrementa en función del pH. El valor D es más alto a temperatura de 4 °C, pH 5 fue de 1776.61 horas (74.03 días). A temperaturas, de 10 y 15 °C el valor D los tiempos son menores, debido dichas temperaturas favorecen su crecimiento, frenándose la muerte celular.

Tabla 4. Parámetros de sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en Caldo con 6.6% de CINa y pH 5, 5.5 y 6 en relación con las temperaturas de 4,10 y 15 °C, según Combase			
Temp (°C)	pH	Tiempo Lag (Horas)	Valor D (Horas)
4 °C	5.0	1776.61	1776.61
	5.5	1776.61	1776.61
	6.0	1776.61	1776.61
10 °C	5.0	1776.61	1776.61
	5.5	1776.61	1776.61
	6.0	1776.61	1776.61
15 °C	5.0	1776.61	1776.61
	5.5	1776.61	1776.61
	6.0	1776.61	1776.61

AD

4 °C	5.0	1910.90	712.10
	5.5	1910.90	1229.20
	6.0	1910.90	1776.61
10 °C	5.0	955.45	606.54
	5.5	1910.90	963.59
	6.0	1910.90	1281.77
15 °C	5.0	955.45	402.30
	5.5	955.45	596.40
	6.0	1910.90	740.32

Fuente: Elaboración propia

Los resultados del modelamiento de la supervivencia no térmica de Lm, utilizando el Programa Supervivencia no Térmica del Combase demostró que la interacción del pH y las temperaturas de refrigeración pueden ser útiles para lograr un control sobre la sobrevivencia y que las concentraciones de sal de 6.6 por ciento, que es el mínimo que ofrece el programa para seleccionar, no ejerce acción sustantiva sobre la supervivencia de Lm.

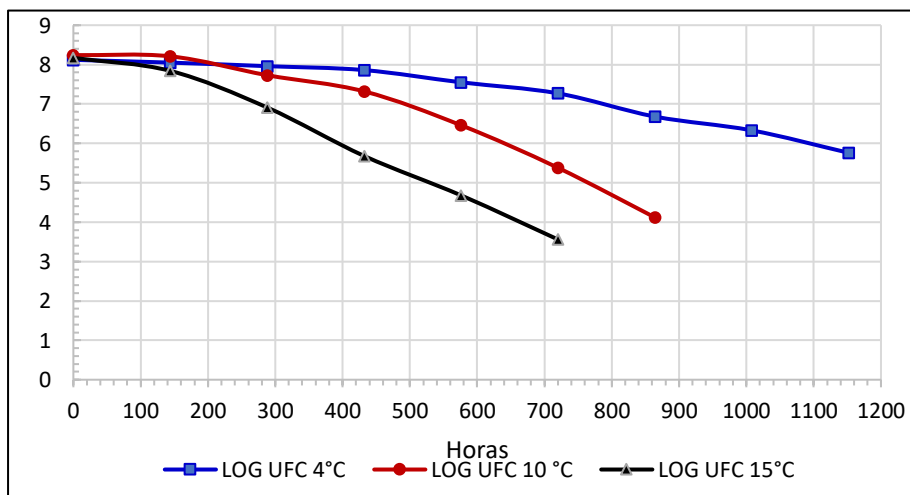
Los fines del presente estudio es utilizar los datos de las curvas de declinación o muerte celular proveniente de un sustrato como la carne molida precocinada (CMP) la cual configura un ambiente que mantenga los requisitos de humedad asociado a su textura y del pH 5.8, apropiado para su almacenamiento posterior a temperatura de refrigeración y de una concentración máxima de cloruro de sodio (sal) de 2% (p/p) que por razones técnicas de proceso y formulación se deben mantener a fin de que el producto pueda ser utilizado de inmediato y evitar el sabor salado, textura blanda y húmeda y olor desagradable.

- Ensayos microbiológicos en matriz de la carne molida precocinada-

Los datos de sobrevivencia de las Unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) de *Listeria monocytogenes* (Lm) que fueron inoculadas en la carne molida precocinada sirvieron para elaborar las curva de declinación del crecimiento o supervivencia y realizar el mejor ajuste para cada una de las combinaciones de variables de temperatura de 4, 10 y 15 °C en condiciones de pH 5.5 y concentración de Cloruro de sodio (ClNa) 2% utilizando el modelo de

Baranyi incorporado en el Programa DMFit del Combase. Cada valor representa el promedio de tres observaciones independientes para cada tiempo.

La figura 1, muestra el comportamiento de la declinación del crecimiento de Lm en la carne molida precocida (CMP) cuando es almacenada a 4, 10 y 15 °C en condiciones de pH 5.5 y concentración de cloruro de sodio al 2% (p/p), destacando la presencia de un periodo de tiempo para la adaptación celular o Fase Lag seguido de otro periodo decrecimiento lineal de tipo logarítmico. La tabla 5 indica que las curvas se inician con una población promedio inoculada aproximada de 8.0 Log UFC/g en cada una de las temperaturas de almacenamiento, no encontrando diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$). La población final, consideradas como unidades logarítmicas (UL), disminuyeron en cantidades -1.64, -4.00, y -4.23 Log UFC/g; correspondiéndoles los tiempos de 1,152, 864 y 377 horas y temperaturas de refrigeración de 4, 10 y 15 °C, respectivamente. El análisis comparativo de la población final y el tiempo de su ocurrencia indica que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) durante su almacenamiento a las temperaturas ensayadas. El comportamiento de las células de Lm encontró mayor efecto de resistencia al frío a 4 °C, traducido a una sobrevivencia por mayor tiempo, produciéndose una muerte celular de bajo nivel; mientras que a 10 y 15 °C el periodo de sobrevivencia es más corto. El error cuadrático medio (RMSE), que mide la cantidad de error que existe entre el valor observado de -Log UFC/g en función del tiempo, y lo que predice el modelo de Baranyi-Roberts, fue de 0.032, 0.029, 0.024 que indica un bajo error al momento de realizar el ajuste de las curvas de sobrevivencia.



AD

Figura 1. Declinación del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en carne molida precocida en condiciones de pH 5.5 y 2% Cloruro de sodio conservada a 4, 10 y 15 °C

Tabla 5. Características de las curvas de declinación (-Log UFC/g) del crecimiento de *Lm* inoculadas en carne molida precocida conservada a temperaturas de refrigeración de 4, 10 y 15 °C en condiciones de pH 5.5 y Cloruro de sodio 2%.

Valores	Temperatura de almacenamiento		
	4 °C	10 °C	15 °C
Población inicial (Log UFC/g)	8.09	8.22	8.27
Población final (Log UFC/g)	6.45	4.22	4.04
Variación UL (-Log UFC/g)	1.64	4.00	4.23
Tiempo (horas)	1,152	864	377
Error cuadrático medio	0.032	0.029	0.024

Fuente: Elaboración propia

- Parámetros cinéticos de sobrevivencia

Los parámetros de sobrevivencia de *Lm* se obtuvieron utilizando el modelo de Baranyi incorporado en el programa DMFit del Combase y los resultados obtenidos se ven plasmados en la Tabla 6. Las tres variables interactuaron para afectar la sobrevivencia de *L. monocytogenes*, evidenciándose cambios en la duración de la fase Lag (LPD) abarcando tiempos de 321.35, 275.71 y 56.86 horas cuando las muestras se encuentran almacenadas a 4, 10 y 15 °C. Del mismo modo, y para las mismas temperaturas la Tasa de la declinación del crecimiento exponencial (EGR) se realizaron a velocidades de 0.00195, 0.0068, 0.0124 Log UFC/g/h, que determinaron el tiempo generacional (T_g) o tiempo necesario para duplicarse de 154.36, 44.26 y 24.24 horas, respectivamente; en condiciones de pH 5.5 y cloruro de sodio 2%. Estos valores en conjunto demuestran que las limitaciones de las variables de pH y Cloruro de sodio pueden controlar una población alta del patógeno dentro de un tiempo muy prolongado cuando es almacenado a temperaturas de refrigeración de 4 °C. El

tiempo hallado será de mucha utilidad para garantizar la inocuidad del alimento listo para su consumo.

La tabla 6, muestra los valores que indican la capacidad de *Listeria monocytogenes* para sobrevivir en condiciones de almacenamiento refrigerado prolongado en la carne molida sin un incremento de las poblaciones viables o declinación de la población existente inicialmente. Los resultados indican que el ambiente de a matriz cárnica molida con pH y ClNa Sodio 2% y temperaturas de refrigeración que favorecen la declinación de la población inicial a una tasa de declinación del crecimiento o velocidad negativa ($-\mu_{max}$) que evita mantener la viabilidad promedio de la población inicial de 8 Log UFC/g plasmándose valores de 0.00195, 0.0068 y 0.0124 Log UFC/g.h⁻¹, en condiciones que aporta el sustrato antes mencionado. Por otro lado, el tiempo de duplicación o tiempo generacional (tg), en este caso, es el tiempo necesario para inhibir a las células de Lm duplicarse y de esta forma ejercer un control sobre su multiplicación. Los tiempo encontrados fueron 154.36, 124.26, 24.24 horas, en forma respectiva para las temperaturas ensayadas.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la curva de sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en carne molida precocida en condiciones de pH 5.5 y cloruro de sodio 2%.			
Parámetros	Temperaturas de conservación		
	4 °C	10 °C	15 °C
Tasa max (-Log UFC/g.h ⁻¹)	0.0019	0.0068	0.0124
Tiempo Lag (Horas)	321.35	275.71	56.86
Tiempo generacional (Tg)	154.36	124.26	24.24
Tiempo Lag/Tiempo tg	2.08	2.22	2.35

Fuente: Elaboración propia

Actualmente en el mercado alimentario vienen apareciendo productos mínimamente procesados que pueden tener demanda por estar asociada a cambios en los hábitos de los consumidores quienes demandan alimentos de fácil preparación, mínimo tiempo de elaboración y máxima seguridad que puede consumirse crudo o después de haber sido sometido a un tratamiento térmico

suave, conservando sus propiedades nutritivas y organolépticas. Estas condiciones permiten a *Listeria monocytogenes* mantener un estado probable de supervivencia y constituir un peligro para la inocuidad alimentaria, por lo que se requiere conocer el tiempo para disminuir una unidad logarítmica de una población de Lm y así mismo establecer el tiempo para considerar que no tiene la mínima concentración de células detectables en los tratamientos no térmicos.

Las muestras de carne de res molida con pH 5.5 y concentración de ClNa 2.0% que fueron inoculadas con recuentos iniciales de *L. monocytogenes*, en promedio, de 8.0 UFC/g y almacenadas a temperaturas de 5, 10 y 15 °C, muestran tasas de declinación del crecimiento de -0.002, -0.005 y -0.019 Log UFC/g/h, en forma correspondiente para cada temperatura. A partir de estas tasas ($-\mu_{\max}$) y los tiempos de adaptación o fase Lag (λ), se obtuvo los valores $D_{\text{pH } 5.5, \text{ClNa } 2\%}$, considerado como el tiempo necesario para la reducción de un orden logarítmico el número de células (90%) de células vegetativas de Lm presentes en la carne molida precocida. Los tiempos para este parámetro fueron de 510.20, 147.06 y 80.65 horas, en forma respectiva para cada una de las temperaturas de almacenamiento ensayadas. Técnicamente se requiere que el tiempo de reducción decimal $D_{\text{pH } 5.5, \text{ClNa } 2\%}$ para la CMP debe ser de 4D (99,99%) y para cumplir esta exigencia se requieren tiempos de 901, 864 y 379 horas para las temperaturas de almacenamiento a 4, 10 y 15 °C, respectivamente. Estos tiempos predicen que a su término las subpoblaciones de Lm sobrevivientes iniciarán su crecimiento y es dependiente de la temperatura de conservación y los factores de pH 5.5 y concentración de sal hasta 2%; en estas condiciones estos están actuando como factores bacteriostáticos; en consecuencia, la CMP se constituye en un peligro para la salud del consumidor.

Otra de las condiciones que determina la declinación del crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo es el estado fisiológico (h_0) es un parámetro adimensional que cuantifica el estado fisiológico inicial de las células quien determina, en gran medida, la fase de adaptación en un entorno de la CMP con pH 5.5 y ClNa 2%. La tabla 7 muestra

los valores del estado fisiológico para Lm de 0.61, 0.66 y 0.71 cuando es sometida a las condiciones de la carne molida precocinada y conservada a 4 °C, 10 y 15 °C, respectivamente. Destaca la relación directa entre h_0 con la μ_{max} y de manera inversa con la fase Lag.

Tabla 7. Parámetros de sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en la carne molida precocinada conservadas en temperaturas de refrigeración ($p < 0.05$).			
Parámetros	Temperaturas de conservación		
	4 °C	10 °C	15 °C
μ_{max} (-Log UFC/g*h ⁻¹)	-0.002	-0.005	-0.019
Fase Lag (Horas)	321.35	275.71	56.86
Tiempo D (Horas)	510.20	147.06	80.65
4D(99.99 % inactiv)	901	864	379
Estado fisiológico (h_0)	0.61	0.66	0.71
Varianza	0.000001	0.0003	0.0007

Fuente: Elaboración propia

VI. DISCUSION DE RESULTADOS

6.1. Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados.

La calidad microbiológica de la CMP se sustenta en la baja tasa de contaminación por indicadores fecales como *Escherichia coli* la cual se encontró en niveles por debajo de los límites mínimos permisibles que exige la norma técnica peruana. Con relación a patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* y *Listeria monocytogenes* las muestras analizadas muestran ausencia de ellas. Comparativamente la calidad microbiológica entre los grupos experimentales no presenta diferencias significativas ($p > 0.05$). Este análisis indica que el proceso de cocción a 80 °C por 30 minutos fue suficiente para reducir la carga microbiana existente y la probabilidad de ausencia de patógenos o no detectable cuando se aplica los análisis microbiológico, manteniendo un peligro de tipo alimentario. Este problema se debe resolver cuando se conozca la característica de sobrevivencia de Lm cuando se utiliza para su almacenamiento tratamientos no térmicos (temperaturas de refrigeración).

La supervivencia se ha podido caracterizar observando el comportamiento de la población inicial y final en la CMP (pH 5.5 y ClNa 2%) almacenada a 4, 10 y 15 °C, destacando la presencia de un periodo de tiempo para la adaptación celular o Fase Lag seguido de otro periodo de declinación del crecimiento lineal de tipo logarítmico. La tabla 5 indica que las curvas se inician con una población promedio inoculada aproximada de 8.0 Log UFC/g en cada una de las temperaturas de almacenamiento, no encontrando diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$). La población final, consideradas como unidades logarítmicas (UL), disminuyeron en cantidades -1.64, -4.00, y -4.23 Log UFC/g; correspondiéndoles los tiempos de 1,152, 864 y 377 horas y temperaturas de refrigeración de 4, 10 y 15 °C, respectivamente. El análisis comparativo de la población final y el tiempo de su ocurrencia indica que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) durante su almacenamiento a las temperaturas ensayadas. El comportamiento de las células de Lm encontró mayor efecto de resistencia al frío a 4 °C, traducido a una supervivencia por mayor tiempo, produciéndose una muerte celular de bajo nivel; mientras que a 10 y 15 °C el periodo de supervivencia es más corto. El error cuadrático medio (RMSE), que mide la cantidad de error que existe entre el valor observado de -Log UFC/g en función del tiempo, y lo que predice el modelo de Baranyi-Roberts, fue de 0.032, 0.029, 0.024 que indica un bajo error al momento de realizar el ajuste de las curvas de supervivencia. De igual forma, el modelo proporcionó un buen ajuste para la variación de la población de Lm con el tiempo de almacenamiento, mostrando altos coeficientes determinantes (R^2) para los ajustes de regresión.

El periodo inicial de la supervivencia esta caracterizado por la manifestación de una Fase Lag (λ , horas) o fase de adaptación fue mayor para el grupo almacenado a 4 °C (321h, 13.38 d) y menor para 10 °C (276 h, 11.5 d) y 15 °C (57 h, 2.38 d). Comparativamente los valores de λ para cada temperatura muestran diferencias significativas ($p < 0.05$). Durante este tiempo que permaneció Lm a los tratamientos no térmicos la población inicial disminuye respondiendo a una función sigmoidea con presentación de "Hombro".

La explicación a esta respuesta de la forma y tiempo de la declinación del crecimiento de *Lm* puede ser interpretada como la concurrencia de varios factores celulares intrínsecos que pueden estar interactuando entre sí, presentación de células en diferentes estadios de su ciclo celular, activación de sistemas metabólicos y genéticos para adaptarse a temperaturas frías. síntesis de compuestos osmoprotectores y crioprotectores para soportar las condiciones de estrés osmótico generado por la pérdida de humedad, viscosidad del agua, presencia de compuestos crioprotectores, permitiéndole crecer en ambientes de alta fuerza osmótica y a temperaturas de refrigeración.

El modelamiento con el programa DMFit del Combase determinó la velocidad máxima de la declinación del crecimiento que se produce en forma logarítmica, el cual se inicia al término del estado de adaptación o fase Lag (λ). Las velocidades máximas ($-\mu_{\max}$) alcanzadas fueron de -0.0019, -0.0068 y -0.0124 (Log UFC/g.h⁻¹) para las temperaturas de 4, 10 y 15 °C, respectivamente. El coeficiente de determinación (R^2), para todos los casos fue >0.98, que indica que el ajuste del historial de -Log UFC/g de *Lm* en función del tiempo, por el modelo de Baranyi-Roberts tiene alta confiabilidad estadística y fue apropiado para describir el comportamiento de *Lm* en la matriz CMP con pH 5.8 y ClNa 2%. Este parámetro representa la velocidad a la cual cada células deja de replicarse y no se forman nuevos individuos o mueren. Se puede inferir que la matriz de la CMP almacenada a 4°C favorece la supervivencia de *Lm* guardando coherencia con el tiempo prolongado de adaptación y la velocidad en la que se produce la declinación del crecimiento, considerado como lento promoviendo la conservación de células vegetativas con capacidades metabólicas y estructurales para resistir la condiciones de estrés; por otro lado, el sustrato también contribuye por su composición química, humedad, pH y sal; mientras que a 10 y 15 °C, la velocidad de sobrevivencia disminuye debido a que las células pronto salen de la etapa de adaptación,



El valor D (tiempo de reducción decimal) definido como, el intervalo de tiempo necesario para una reducción decimal [90 %] del número de microorganismos supervivientes fue calculado a partir de las curvas de inactivación con colas y hombros, relacionando la velocidad de la declinación del crecimiento ($-\mu_{\max}$) y los tiempos de adaptación (λ). A la temperatura de 4 °C el descenso de una unidad logarítmica requiere de un tiempo de 510 horas (21.25 días); a 10 °C, 147 horas (6.25 días); y a 15 °C, 80.65 horas (3.33 días) El análisis comparativo de los valores D, obtenidos para cada temperatura, reveló que entre ellos existen diferencias significativas ($P < 0,05$) generados por las condiciones intrínsecas de la matriz de la CMP (pH y CNa) y el factor temperatura de almacenamiento.

El mayor efecto del almacenamiento de la CMP a la temperatura de 4 °C sobre la sobrevivencia de Lm puede atribuirse a la calidad microbiológica que contiene una carga bacteriana por debajo de los límites exigidos por la Norma nacional la cual ofrece poca competencia por los nutrientes disponibles, más aún cuando Lm es reconocido como una bacteria psicrófila y aprovecha esta condición para contrarrestar el estrés térmico, osmótico y metabólico. Para productos cárnicos que recibieron tratamiento de cocción el Factor $D_{pH5.5, CNa2\%}$ se exige una inactivación 4D (99,99%) y para cumplirla se requieren tiempos de 901 horas (37.54 días), 864 horas (36 días) y 379 horas (15.79), en almacenamientos a 4, 10 y 15 °C, respectivamente. Al término de estos tiempo se predice que las subpoblaciones de Lm sobrevivientes iniciarán su crecimiento y es dependiente de la temperatura de almacenamiento; mientras que el pH y concentración de sal, se consideran como factores bacteriostáticos; en consecuencia, el producto aún conservado a 4 °C constituye un peligro para la salud del consumidor por mantener sobrevivientes de Lm.

El mantenimiento de la sobrevivencia de Lm por periodos largos a temperaturas de refrigeración requiere de tener condiciones metabólicas demandantes de energía y estabilidad de sus estructuras para su funcionabilidad sobre el sustrato, y estas condiciones se establecen a través del estado fisiológico (h_0), el cual se tiene una variabilidad en tanto atraviesan el periodo de adaptación (λ) y la velocidad del desarrollo de la declinación del crecimiento ($-\mu_{\max}$).

El estado fisiológico (h_0) se valora dentro de un rango entre 0 (no crecimiento) a 1 (máximo crecimiento) y los resultados muestran que el valor h_0 para 4 °C, 0.61; 10 °C, 0.66 y 15 °C, 0.71; existiendo diferencias significativas entre cada grupo ($p < 0.05$) que explica que el estado fisiológico de las células de Lm les permite desarrollar condiciones para la sobrevivencia en las condiciones de la matriz de la CMP y la temperaturas de almacenamiento en frío. Sin embargo, el análisis de varianza indica que el almacenamiento de la CMP a 4 °C presenta una varianza estadística de 1.00E-06, que es mucho menor que los otros grupos, interpretándose que la sobrevivencia es más alta, con mucha resistencia para ocasionar la muerte celular a gran velocidad y se mantendrá constante durante las diferentes etapas de las curvas de declinación del crecimiento.

El presente estudio planteo la hipótesis de poder caracterizar la supervivencia no térmica de *L. monocytogenes* en la carne molida precocinada utilizando el modelo predictivo de Barangy-Roberts del Programa COMBASE. Los resultados permiten aceptar la hipótesis planteada, considerándose que la caracterización es sobre la matriz del alimento.

6.2. Contrastación de los resultados con otros estudios similares.

La cocción de la carne de res molida se puede considerar como un tratamiento de pasteurización que se aplica para mejorar la seguridad microbiológica y no degradar la apariencia del producto molido y hacerla inaceptable; al respecto Gill C.O y Badoni M (2002), manifiestan que, “el tratamiento no extendería mucho la vida útil de almacenamiento de la carne de res molida precocida, y que existen microorganismos que tienen capacidades metabólicas y genéticas para sobrevivir a temperaturas de refrigeración y son los que prevalecerán en el producto hasta llegar al consumidor, pudiendo ser la causa de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA)”.

La CMP es considerado como un buen sustrato para los microorganismos debido a que naturalmente aporta nutrientes solubles, condiciones de pH, sal y humedad para mantener condiciones fisiológicas de sobrevivencia y después de un tiempo

iniciar crecimientos en función del tiempo; sin embargo, desde el punto de vista del procesador, evitará que los atributos de la calidad de la CMP puedan verse disminuidos por la cocción motivo que exige controlar la temperatura y tiempo de cocción para evitar el encogimiento y así lograr la estabilidad térmica de las proteínas en el tejido muscular; por lo tanto el mismo proceso de elaboración condiciona presencia de nutrientes que facilita la supervivencia. Ferrari y col, (2013), “observaron, en hamburguesas de carne molida, que “durante la pasteurización (65–90 °C, 1–60 min) los atributos de calidad están correlacionados con una pérdida de proteínas sarcoplásmicas solubles y proteínas miofibrilares solubles en la pérdida por cocción (29–35 %) y la contracción del área (19–28 %) y estos cambios ocurrieron rápidamente en los primeros 2–5 min de calentamiento”.

El entorno que encuentra inicialmente Lm en la CMP es C/Na 2%, pH promedio inicial de 5.8 y humedad 78.23%, conservación a temperaturas de 4, 10 y 15 °C respectivamente. Al final del experimento ambos parámetros presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), siendo las tendencias al incremento del pH y disminución de % de humedad con relación a la temperatura. La menor variación de pH 7.20 % con respecto al inicial corresponde a 4 °C motivado por la disminución de la actividad enzimática sobre los sustratos fermentables, casi inexistentes desde un inicio, y una ligera tendencia a disminuir el pH hasta 5.5 dentro de un periodo de 19 días; del mismo modo, la conservación de humedad en la matriz de la CMP es mayor, 9.38 %, comparada con las temperaturas de 10 y 15 °C, ($p < 0.05$), en las cuales el agua se desprende de la matriz proteica en un tiempo de almacenamiento de 12 y 6 días, respectivamente.

Estos resultados siguen tendencias lineales, motivo por el cual pudieron expresarse mediante una ecuación de función lineal con $R^2=0.98$ que permite predecir el % de variación de pH o humedad en función de la temperatura; sin embargo los valores de la variancia estadística al final del proceso experimental es menor a 4 y 10 °C y mayor a 15 °C indicando que la sobrevivencia es un comportamiento de poblaciones de Lm que se encuentran en diferente estado de su ciclo celular y además las mejores posibilidades de sobrevivir favorecido



por un pH cercano a la neutralidad y suficiente humedad que diluye la presión osmótica que puede estar ejerciendo el Cloruro de sodio 2%.

Valor cercanos a este estudio lo encontramos en Rengifo (2010), “quien analizó la capacidad de retención de agua en carne de res cocida a temperatura de 77 °C y conservada a 10 °C quien tuvo menor humedad (10,67%); concluye que esta carne no retiene muy bien el agua, debido a que el pH de estas carnes se encuentra muy cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas”.

La adición de cloruro sódico influyó sobre la capacidad de mantener la humedad, que mejora con la variación del pH de 5.8 a 5.4 a 4 °C, mientras que a 10 y 15 °C el pH tiende avanzar al neutralidad disminuyendo la capacidad de la CMP para retener la humedad. López y Carballo (1991), indican que “la humedad retenida por la matriz cárnica mejora si el pH es mayor que 5, debido a el ión Cl es mucho más activo que el Na y tiene capacidad de neutralizar las cargas positivas del músculo a pH menor que 5. A pH mayor que 5 el músculo está cargado negativamente, por lo que el ion Cl resulta inactivo.

- Calidad microbiológica de la carne molida de res precocinada (CMP)

La calidad microbiológica del producto cárnico consideró lo establecido en la Norma Técnica Peruana NTP (RM 591 2008), indicando como límites máximos permisibles para mesófilos aerobios 6 Log UFC/g, Escherichia coli Log 2.7 UFC/g, ausencia de Salmonella spp. y 3 Log UFC/g de Staphylococcus aureus, esta norma no incluye la presencia Listeria monocytogenes.

Los resultados muestran que la cantidad promedio de mesófilos aerobios se encuentra por debajo de la exigencia del límite mínimo de la norma reflejando que el proceso de elaboración la temperatura de cocción fue eficiente, sobre todo controlando la contaminación cruzada; sin embargo, “no se asegura que el alimento esté exento de patógenos termoresistentes” (Frazier y Westhoff, 2000). Lemay y col, (2002), “estimaron la efectividad de la cocción a 55 °C en un modelo

de carne de pollo molida moderadamente acidificada (pH 5) sobre las bacterias aerobias mesófilas (*Escherichia coli*, *Brochothrix thermosphacta* y *Lactobacillus alimentarius*. Antes del tratamiento térmico de cocción a 55 °C, la concentración inicial del grupo control fue 5, 6 y 7 log CFU/g, respectivamente y después de la cocción la concentración final fue de 3 - 4 log CFU/g”.

La sobrevivencia de *E. coli*, ocasionado por el tratamiento térmico aplicado a la matriz de la CMP para poder almacenarlos en refrigeración, favorece el crecimiento y la supervivencia de *E. coli*, “cuya dependencia de su supervivencia se encuentra en una serie de factores ambientales, como la existencia de una temperatura mínima de 7- 8 °C, pH hasta 3.6, actividad de agua (Aw) entre 0,995 y 0,950.y la composición del alimento” (ESR, 2001).

Rivas et al (2014) indican que “EC en pH normal de la carne molida sometida a cocción para luego ser conservada a temperaturas de refrigeración menores a 8°C o congelación tiene poca probabilidad que los niveles de contaminación aumenten considerablemente durante el almacenamiento; por otro lado, “temperaturas mayores a 8 °C, en presencia de otro tipo y bajo nivel de número de bacterias competitivas, *E. coli* crecería en carne molida” (Lake et al., 2002). Estas características no se presentarían si se considera que “EC se inactiva rápidamente a temperaturas por sobre los 60°C, con valores $D_{60^{\circ}\text{C}}$ generalmente inferiores a 5 minutos” (Rivas et al., 2014).

En relación con las bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* no se encontraron cantidades de células viables detectable para el primero y ausencia para el segundo, cumpliendo de esta forma con los criterios microbiológicos de la NTP. La no presencia de estas bacterias en la CMP se atribuye al efecto del tratamiento térmico aplicado durante la cocción. Sin embargo, Castillejo-Rodríguez (2002) indica que “*S. aureus* no pudo crecer a 6,5 °C o menos, pero permanece en niveles de población aproximadamente igual al del inóculo original para los productos cárnicos cocidos hasta el final del período de almacenamiento y tampoco pudo crecer en muestras de pollo almacenadas

a 10 °C y su nivel se mantuvo constante, por lo que cualquier aumento posterior de la temperatura permitiría el crecimiento de *S. aureus*”.

La CMP puede contaminarse con patógenos diversos que pueden resistir tratamientos de cocción más aún cuando no se respeta el tiempo y temperatura, por esta razón se incorpora aditivos como ClNa y otras sales con lo cual se genera estados de estrés a las células vegetativas sobrevivientes a la cocción. Tenderis y col (2020) “evaluaron la influencia de sales de lactato de sodio y polifosfatos y sus combinaciones sobre el crecimiento de *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7 y de *S. aureus* en carne molida cocida y almacenado durante 30 días a 4 o 10 °C, demostrando que el uso de combinaciones de dichas sales tiene un efecto sinérgico en la reducción de la viabilidad de *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* y su posterior capacidad de crecimiento en la carne de res”.

La CMP con buena calidad microbiológica es útil para elaborar otros productos cárnicos listos para su consumo inmediato o en periodos muy largos como es el caso de los enlatados, Wu y Su (2014) “evaluaron la supervivencia de *Staphylococcus aureus* en carne de atún precocida, disminuyendo ligeramente (<0.7 log CFU/g) después de 4 semanas de almacenamiento a -20 ± 2 °C, pero aumentaron rápidamente una vez que las muestras se descongelaron y mantuvieron entre 35 y 37 °C, aumentando en más de 3 log CFU/g después de 6 y 8 h, respectivamente. La carne de atún precocida congelada se debe utilizar para producir atún enlatado dentro de las 6 a 8 h posteriores a la descongelación para evitar el deterioro del producto y la posible producción de enterotoxinas por *S. aureus* en la carne de atún precocida contaminada”.

- Modelamiento preliminar utilizando el modelo de Baranyi. Uso de la herramienta predictiva para el Tratamiento no térmico de *Listeria monocytogenes*.

“Para entender la forma como los microorganismos pueden constituirse en riegos de enfermedades en la que pueden estar involucrados cuando son sometidos a

diversas condiciones de su entorno, en un rango de temperaturas, se acude al uso de modelos matemáticos que tengan capacidad de predecir el crecimiento y ayudan al establecimiento de la seguridad microbiana o vida útil en productos cárnicos” (Whiting y Buchanan 1994). “La propuesta es utilizar las herramientas multimedia de la microbiología predictiva que permite realizar diseños experimentales, formulaciones y tecnologías diversas aportando análisis microbiológicos rápidos y de bajo costo”. (McMeekin et al. 1993).

Para poder tener predicciones aproximadas del comportamiento de Lm en un entorno de pH y cloruro de sodio se realizó un modelamiento preliminar utilizando el Programa ComBase que contiene la opción de estimar el tratamiento no térmico, en condiciones variables de pH y concentraciones de cloruro de sodio a temperaturas de 4, 10 y 15 °C. Por otro lado, se debe considerar que el programa se inicia con una concentración de sal al 6.6 % ClNa, justificado porque que dicha concentración es considerada por el programa como la mínima para controlar el crecimiento de Lm. El programa realiza el ajuste de las curvas en base a la ecuación de Barangy & Roberts, con datos de no crecimiento obtenidos en cultivos en un caldo nutritivo, con una población inicial 0 Log UFC/h hasta alcanzar un nivel de -6 UFC/h así mismo ofrece el programa DMFit que procesa datos de crecimiento y retardo o inhibición del crecimiento. Los parámetros de interés para este estudio fueron: tasa máxima ($\mu_{max} = -\text{Log UFC/g/h}$), duración Fase lag (horas) y el Valor D (horas).

El modelamiento preliminar demostró que los parámetros de declinación del crecimiento ($-\mu_{max}$), Fase lag y Factor D, correspondientes a las temperaturas de 4 y 10 °C son valores muy próximos cuando actúan dentro del rango de pH es 5.5 a 5.8 y ClNa 6.6 %, y de mayor magnitud comparados con los valores obtenidos a 15 °C. Esta respuesta indica que otras concentraciones de ClNa <6.6 % los valores serían iguales. Ante esta situación se decidió realizar la experimentación en la matriz de la CMP inoculando una población inicial de 8 Log UFC/g de Lm que se enfrentó a cambios de pH y concentración de ClNa

2.0% durante un periodo de tiempo en el cual se logró la declinación del crecimiento mínimamente de 4 niveles logarítmicos (-6.0 UFC/g).

Estas respuestas del modelamiento del tratamiento no térmico recomiendan para la etapa experimental con CMP se realice con la concentración del 2%, el cual representa una concentración ajustada al paladar del consumidor y de buen manejo dentro de las formulaciones para elaborar producto listo para consumo humano.

El retardo de la declinación del crecimiento se produce en tiempos muy prolongados que resta la importancia del efecto de estrés por el ClNa 2%, debido a .la difusión inmediata en la matriz de la CMP otorgándole textura al coloide cárnico para mantener un sabor uniforme en todo el producto y así poder utilizarlo de inmediato o como insumo en formulaciones de otros productos listos para su consumo. Sólo el nivel de sobrevivencia podría justificar su calidad microbiológica y su condición de inocuidad,

- Determinación de los parámetros de supervivencia no térmica de *Listeria monocytogenes* en la carne molida precocinada a temperaturas de 4, 10 y 15 °C, mediante el modelo predictivo del programa ComBase.

Para la conservación de los productos cárnicos se recomiendan almacenarse en el “rango de temperatura entre -1 y 4 °C y no superior a 5 °C” (Simpson et al., 1989). Sin embargo, durante la elaboración y las redes de distribución no se encuentran implementados con los equipos generadores de frío necesarios para operar entre 7 y 10 °C. Ray (2004), menciona que “por la amplia variedad de productos cárnicos refrigerados mínimamente procesados que se encuentran en el mercado, hace urgente la necesidad de reducir los máximos de temperatura de la cadena de frío para mejorar la seguridad alimentaria”. Por otro lado, los locales de expendio no cuentan con los pasillos fríos que tienen como función disminuir la diferencia de temperatura entre el anaquel y medio ambiente, siendo más crítico en regiones subtropicales o estaciones de verano; por lo cual, la

temperatura promedio de los equipos de frío se encuentran a 15 °C. “También es necesario estimar la capacidad de sobrevivir algunos patógenos, durante largos periodos, en condiciones de temperaturas de refrigeración utilizadas para la conservación de alimentos” (Castro et al., 2016). La medición de los efectos de letalidad de los procesos no térmicos, “pueden combinarse con el uso de antimicrobianos y de esta manera reducir la severidad o el tiempo de exposición a las temperaturas de frío, preservando las propiedades fisicoquímicas y el valor nutricional de los alimentos”. (Severino et al., 2014).

El presente estudio consideró estas observaciones para utilizar las temperaturas de 4, 10 y 15 °C que están muy relacionados al incumplimiento de las exigencias de técnicas de la conservación de alimentos en frío. Simpson et al. (1989), “consideran que la ruptura de la cadena de frío es la principal causa de disminución de la vida de anaquel debido al crecimiento de bacterias psicotrópicas y el crecimiento de importantes patógenos que presentan crecimiento acelerado a temperaturas entre 7 y 10 °C, moderado entre 5 y 7 °C y lento a 5 °C tales como *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*. En términos generales, “la vida útil de un producto refrigerado se reduce a la mitad si este se encuentra entre 7 y 10 °C”. (Ray, 2004).

Las curvas de sobrevivencia o declinación del crecimiento (-Log UFC/g/h), obtenidos experimentalmente por contaminación con células de Lm en la CMP y su almacenamiento de acuerdo con las condiciones previstas, se obtuvieron ajustando los datos observados utilizando el programa DMFit del ComBase, cuyos resultados se analizan en función de los parámetros de las curvas de la declinación del crecimiento en sus etapas de Fase de adaptación, Velocidad de la sobrevivencia, Factor D y Estado fisiológico.

Las muestras de CMP sometidas a experimentación estuvieron distribuidas en tres grupos de almacenamiento, a temperaturas de 4, 10 y 15 °C. Cada una de ellas fueron inoculadas con una población inicial aproximada de 8.0 Log UFC/g interactuando en un pH inicial de 5.8 y CNa 2%. Los tratamientos no mostraron

diferencias significativas al tiempo cero ($p > 0.05$); mientras que al término del periodo de conservación la población final fue de 6.45, 4.22 y 4.04 Log UFC/g para 4, 10 y 15 °C, respectivamente ($p < 0.05$). Las diferencias significativas se atribuyeron a las condiciones que le ofrece la matriz del sustrato.

Las muestras almacenadas a 4 °C tienen menor variación poblacional referido a unidades logarítmicas, sin presentar signos de reproducción en un periodo de hasta 1,152 horas (48 días) comparada con las temperaturas de 10 y 15 °C, interpretándose que a menor temperatura de conservación las células de *Lm* presentan mayor resistencia térmica de refrigeración.

Datos aproximados se tiene con los hallados por Buchanan y col. (1989) quienes “determinaron los efectos e interacciones de la temperatura de 5°C, pH inicial 6.0, contenido de cloruro de sodio 0,5 y 4,5% sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* Scott A, usando caldo de fosfato de triptona. La población inicial fue 3.66 y 3.64 Log UFC/g y final 5.67 y 4.11, respectivamente, denotando el efecto del NaCl 4.5 %. Así mismo, Rodríguez y col. (2022), “encontró que a 16°C las medias de las fases de latencia corresponde de 25.4 a 131.7 horas”. Estos valores permiten inferir que una población que pueda reproducirse a partir de una única célula, manteniendo la misma genética, se caracterizará por presentar respuestas variables ante un concreto tratamiento y temperatura, debido al ciclo celular bacteriano en el cual existirá algunas células supervivientes que requieren mayor tiempo para reconstituir sus estructuras y moléculas funcionales para estar en condiciones para dividirse y aquellas que sobrevivieron son más resistentes y pueden multiplicarse rápidamente.

Nissena y col (2000), “compararon el crecimiento de varios patógenos, entre ellos *Listeria monocytogenes* en carne picada envasada en atmósferas modificadas. La carne picada se inoculó con *L. m.* cuya concentración inicial fue de 2.0 a 3.0 Log UFC/g a 4 °C mostrándose poco crecimiento a 4°C. A 10 °C hubo un crecimiento lento de alrededor de 3.69 Log UFC/g - 4.0 Log UFC/g en el día 5 (120 horas).

La declinación del crecimiento empieza por presentar un periodo de tiempo para adaptarse a su nuevo entorno; cuando estos son medios de cultivo como el caldo nutritivo o triptona los nutrientes son abundantes y sostenibles aún a temperaturas frías; pero cuando se trata de una matriz alimentaria como la carne molida precocinada tiene que ser interpretada como la concurrencia de varios factores que pueden estar interactuando entre sí o presentarse en forma coordinada con el ciclo celular de Lm. Rodríguez (2022), indica que “la supervivencia de Lm radica en su capacidad para adaptarse a los cambios osmóticos cuando se encuentra en la matriz de la CMP e implica la síntesis o absorción de compuestos para equilibrar los entornos osmóticos intracelular y extracelular a temperaturas de refrigeración”.

El tiempo de adaptación estimado para 4 °C es más prolongado en comparación con 10 y 15 °C, existiendo entre ellas diferencias significativas ($p < 0.05$). Siendo el caso que Lm es un patógeno considerado como psicrófilo se hace necesario considerar su resistencia al frío desde el punto fisiológico.

Dentro de los factores intrínsecos de la célula de Lm más importante es cubrir los requerimientos de la demanda energética para sostener una sobrevivencia en la matriz de la CMP; por lo tanto, “los requerimientos nutricionales se cubren a partir de las proteínas y aminoácidos libres de la CMP acercando el pH hacia la neutralidad favoreciendo que *L. monocytogenes* u otras bacterias acompañantes encuentren un medio favorable para su multiplicación y su posterior paso a los seres humanos”. (García 2005).

La presencia de osmoprotectores y crioprotectores en los alimentos puede proporcionar compuestos que favorece a Lm para superar las barreras de alta fuerza osmótica y baja temperatura que de otro modo controlan el crecimiento microbiano. Bayles y Wilkinson (2000), determinaron que “Lm contiene compuestos osmoprotectores y crioprotectores que le permiten soportar las condiciones de estrés osmótico generado por la pérdida de humedad, viscosidad



del agua, presencia de compuestos crioprotectores, permitiéndole crecer en ambientes de alta fuerza osmótica y a temperaturas de refrigeración. Sus resultados indican que la glicina betaína, prolina betaína, acetil carnitina, carnitina, actúan como osmoprotectores, aumentando la tasa de crecimiento de *L. monocytogenes* 10403S y Scott A cuando se les proporcionaron estos compuestos, mientras que se estresan en un medio definido que contenía 0,7 M NaCl. Estos mismos compuestos exhibieron actividad crioprotectora, como lo demuestra el aumento de la tasa de crecimiento de *L. monocytogenes* a 5 °C.

Si bien la actividad metabólica es gravitante para explicar la sobrevivencia en la CMP conservada a temperaturas ensayadas, también es de consideración “la adopción homeoviscosa de la membrana celular para mantener su fluidez a temperaturas bajas, en las cuales la célula bacteriana sintetiza cantidades crecientes de ácidos grasos mono-insaturados y di-insaturados para que sus lípidos tengan una fluidez compatible con un metabolismo activo que retarda la velocidad de crecimiento o, lo que es similar a dar lugar a un crecimiento lento” (Aguirre y col. 2011, Rodríguez y col. 2016).

Para *Lm* la regulación de la expresión génica representa un recurso fundamental para adaptarse a un hábitat que constantemente está variando,” haciendo que los procesos bioquímicos se ajustan a las modificaciones de las características físico-químicas del ambiente extracelular las cuales son detectables por ellas como parámetros químicos, relacionados con los aspectos nutricionales del medio (presencia o ausencia de iones, fuentes de energía, aceptores finales de energía, aceptores finales de electrones, etc.) y parámetros físicos (la temperatura, la presión hidrostática o la presión osmótica). Algunos de estos factores ambientales, sirven de señales para regular la expresión génica y adaptarse al nuevo ambiente con éxito”. (Vera y col. 2013)

Almonacid-Merino et al. (1993) asumieron que “el esfuerzo intracelular corresponde en su mayoría a la necesidad para aumentar la concentración de ácido ribonucleico (ARN), indicador del estado fisiológico de la célula, el cual



llega a su máximo valor cuando el microorganismo inicia la fase exponencial. El tiempo que demora la célula en realizar dicho trabajo representa la duración de la fase de latencia". (Beales, 2004; Koutsoumanis, 2001).

Una vez que las células se han adaptado a las condiciones del entorno, adquieren mecanismos de resistencia a los factores propios de la matriz de la CMP, comenzando de esta forma la fase del declive del crecimiento exponencial. En esta fase, la velocidad de ocurrencia de la sobrevivencia ($-\mu_{max}$) es de pequeña dimensión, para todos los grupos de temperaturas de refrigeración de 4 a 15 °C, como una respuesta al tiempo de almacenamiento de la CMP en la que existe variación del pH e interacción osmótica del ClNa en función a la disponibilidad del agua intracelular; la consecuencia más importante es la disminución de la concentración celular promoviendo la declinación del crecimiento (-Log UFC/g/h). Se puede inferir que las condiciones que presenta la CMP favorecen al patógeno, siendo mayor el efecto a 4 °C en donde los parámetros cinéticos caracterizan un estado de sobrevivencia mayor y con menor efecto a 10 y 15 °C.

Resultados comparativos entre carnes de diferentes especies permite apreciar que la matriz del sustrato influye en la reducción de ciclos logarítmicos existiendo condiciones más favorables para la sobrevivencia en la carne de res comparado con otras especies como la de pollo o pescado, cuando se asocia con la temperatura de conservación a 4 °C. Ozdemir et al. (2006) "modeló la variación de la población de *Listeria monocytogenes* en carne de res adicionada con ácido láctico al 1%, encontrando una población de 1.12, 1.14, 2.16 10g UFC/g para el primer, segundo y tercer día de incubación a 4°C. Mytle et al. (2006) "observaron reducción en el número de ciclos logarítmicos donde *L. monocytogenes* crece 1.0 Log UFC/g a 5°C en 14 días en carne de pollo". Rodríguez & Manca de Nadra (2009) señala "que a 4°C la bacteria crece en carne de pescado incrementando 0.601 Log UFC/g el número de células al final de la incubación".

Actualmente en el mercado alimentario vienen apareciendo productos mínimamente procesados que pueden tener demanda por estar asociada a cambios en los hábitos de los consumidores quienes demandan alimentos de fácil preparación, mínimo tiempo de elaboración y máxima seguridad que puede consumirse crudo o después de haber sido sometido a un tratamiento térmico suave, conservando sus propiedades nutritivas y organolépticas. Estas condiciones permiten a *Listeria monocytogenes* mantener un estado probable de supervivencia y constituir un peligro para la inocuidad alimentaria, por lo que se requiere conocer el tiempo para disminuir una unidad logarítmica de una población de Lm y así mismo establecer el tiempo para considerar que no tiene la mínima concentración de células detectables en los tratamientos no térmicos. Las muestras de carne de res molida con pH 5.5 y concentración de ClNa 2.0% que fueron inoculadas con recuentos iniciales de *L. monocytogenes*, en promedio, de 8.0 UFC/g y conservadas a temperaturas de 5, 10 y 15 °C, muestran tasas de declinación del crecimiento de -0.0019, -0.0068, -0.0124-Log UFC/g/h, en forma respectiva. A partir de estas tasas y los tiempos de adaptación o fase Lag se obtuvo los valores $D_{pH\ 5.5, ClNa\ 2\%}$, considerado como el tiempo necesario para la reducción de un orden logarítmico el número de células (90%) de Lm presentes en la carne molida precocida, fue de 510.20, 147.06 y 80.65 horas, para cada una de las temperaturas de conservación ensayadas. Cuando el Factor $D_{pH\ 5.5, ClNa\ 2\%}$, es considerado para una inactivación 4D (99,99%) se requieren tiempos de 901, 864 y 379 horas. Estos tiempos predicen que a su término las subpoblaciones de Lm sobrevivientes iniciarán su crecimiento y es dependiente de la temperatura de conservación y los factores de pH 5.5 y concentración de sal hasta 2% se consideran como factores bacteriostáticos, en consecuencia, se constituye en un peligro para la salud del consumidor.

Otra de las condiciones que determina el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo es el estado fisiológico (h_0) el cual determina, en gran medida, la fase de adaptación en un entorno con pH 5.5 y ClNa 2%, presentes en la carne de res precocinada. La tabla 7 muestra los valores del estado fisiológico para Lm de -0,61, -0.66 y -0.71



cuando es sometida a las condiciones de la carne molida precocinada y conservada a 4 °C, 10 y 15 °C, respectivamente. Destaca la relación directa entre h_0 con la μ_{\max} y de manera inversa con la fase Lag.

La modelización del tiempo de latencia (adaptación) de los microorganismos es un parámetro que depende de las condiciones ambientales, así también del estado fisiológico L_m en el momento de contaminar el producto. Ross y col (2000), mencionan que, durante el procesamiento de los alimentos, las células de *L. monocytogenes* que pueden contaminar los productos listos para el consumo pueden presentar diversos estados fisiológicos posibles (p. ej. adaptadas al frío o a ambientes con A_w baja, dañadas subletalmente por tratamientos ácidos o térmicos, etc.). Bajo estas condiciones el valor h_0 puede variar entre 0 (inicio del crecimiento sin fase de adaptación) e infinito 1 (crecimiento) dependiendo del estado fisiológico del microorganismo y de la magnitud de la fuente de contaminación y del alimento contaminado.

Comparando el valor del estado fisiológico (h_0) que se obtiene del modelamiento en COMBASE utilizando la herramienta Tratamiento no térmico en el entorno de caldo nutritivo e ingreso de datos de la CMP (pH 5.8, ClNa 2% y temperaturas de ensayo) se obtiene un valor único de -0.012 para h_0 ; mientras que, utilizando el programa DMFit para el ajuste de las curvas de declinación del crecimiento, con las mismas características del entorno de la CMP los valores de h_0 , derivado por cálculo en relación a la fase de latencia y la tasa máxima de la declinación del crecimiento, sus valores fueron menores; sin embargo, indica que las variables que intervienen sobre L_m durante el periodo de almacenamiento no controla la sobrevivencia de L_m , siendo las más importantes la actividad metabólica en función de la temperatura de refrigeración entre 4 y 10 °C.

El objetivo de este trabajo es obtener un modelo primario accesible, sencillo de fácil manejo para el usuario como el modelo de Baranyi-Roberts que permitió predecir las características de la sobrevivencia de una bacteria patógena como *Listeria monocytogenes*, en la carne molida precocinada, para que de esta

manera se pueda predecir y garantizar la inocuidad del alimento listo para su consumo y que actualmente existen pocos estudios sobre ellos.

6.3. Responsabilidad ética de acuerdo con los reglamentos vigentes

Los documentos técnicos y las directrices generales publicados por diferentes organismos e instituciones internacionales relacionados con los estudios de sobrevivencia de los microorganismos patógenos, utilizados en el presente estudio se han cautelado sus autorías; sin embargo, la interpretación de los resultados corresponde a mi autoría, asumiendo mi experiencia y conocimientos de las posibilidades, condicionantes y limitaciones de los procedimientos aplicados.

CONCLUSIONES

El modelo de Baranyi-Roberts posee una elevada bondad de ajuste para los datos experimentales con predicciones confiables de la supervivencia de *L. monocytogenes* en carne molida precocida inoculada en condiciones de pH normal y Cloruro de sodio como saborizante.

Las principales características de supervivencia para *Listeria monocytogenes* son el parámetro nombrado valor D, o tiempo de reducción decimal y el estado fisiológico (h_0); permitiendo evaluar cuantitativamente la resistencia del microorganismo al factor inactivador presente en matrices alimentarias.

Listeria monocytogenes es relativamente resistente a temperaturas de almacenamiento en frío con lo cual es el patógeno de relevancia y preocupación en productos listos para el consumo, mínimamente procesados, constituyendo el peligro microbiológico.

La supervivencia de *Listeria monocytogenes* en la carne molida precocinada depende de su composición química, condiciones de almacenamiento y sobre todo de su estructura heterogénea.



RECOMENDACIONES

Considerar estudios con *Listeria monocytogenes* como referencia para evaluar la eficacia de las estrategias de intervención, medidas de control y procesos de conservación, en las cuales pueden estar implicados tratamientos de temperaturas de refrigeración.

Investigar el proceso de supervivencia para microorganismos alterantes resistentes a temperaturas de refrigeración en alimentos elaborados, con mínimo tratamiento térmico y almacenamiento en frío.

Caracterizar parámetros cinéticos del comportamiento de bacterias patógenas en alimentos procesados artesanalmente, con énfasis para obtener el Valor D y su estado fisiológico.

Realizar estudios comparativos de modelos matemáticos predictivos para ser utilizado en alimentos mínimamente procesados, listos para su consumo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, J., Bravo, C., Ordóñez, J.A., García de Fernando, G. The Poisson distribution is applied to improve the estimation of individual cell and micropopulation lag phases. *Advances in Microbiology*. 2012; Vol. 2 No. 2, 146-161.
- Aguirre, J.S., Monis, A., and García de Fernando, G.D. Improvement in the lag phase estimation of individual cells that have survived mild heat treatment. *International Journal of Food Science & Technology*. 2013; 49 (3): 884-894.
- Aguirre, J.S., Rodriguez, M.R., and García de Fernando, G.D. Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four foodborne organisms. *International Journal of Food Microbiology*. 2011; 149 (3): 236-246.
- Alarcón AD, Corrales J, Ortega J. Utilización de músculos de res de valor económico bajo en la elaboración de un bistecreestructurado. *La Industria Cárnica Latinoamericana* 1996; 104:43-46.
- Anónimo. 2002. Mercados en crecimiento en el mundo: Alimentos y Bebidas. Reporte Ejecutivo de Noticias de A.C. Nielsen – Servicios globales: Mayo 2002, 22p.
- AOAC, 1995. *Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists*, 16th edn., 39. AOAC, Washington, DC, pp. 3 and 6.
- Arias, María Laura ; Jiménez, Manuel ; Antillón, Florencia . Efecto de microondas sobre staphylococcus aureus y salmonella spp. inoculado en carne picada congelada. *Arco. latino nutrir* ; 47(2): 123-6, junio. 1997.
- Augustin JC, Carlier V. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*. 2000;56:29-51
- Baranyi, J y Roberts, TA (1995). *Int J Food Microbiol* 26:199-218.
- Baranyi, J.; Tamplin, M.L. ComBase: A common database on microbial responses to food environments. *J. Food Prot.* 2004, 67, 1967–1971.
- Branciarì Raffaella, Ortenzi Roberta, Roila Rossana, Miraglia Dino, Ranucci David, Valiani Andrea. *Listeria Monocytogenes* in Soft Spreadable Salami: Study of the Pathogen Behavior and Growth Prediction During Manufacturing Process and Shelf Life *Appl. Sci.* 2020, 10, 4438; doi:10.3390/app10134438
- Buchanan Robert L., Stahl Heidi G., and Whiting Richard C. Effects and Interactions of Temperature, pH, Atmosphere, Sodium Chloride, and Sodium Nitrite on the Growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 1989 Vol. 52, No. 12, Pages 844-851

- Buchanan, R.L., Golden, M.H., Whiting, R.C., Phillips, J.G., & Smith, J.L. 1994. Model for the nonthermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*, 59: 179–188.
- Buchanan, R.L., Stahl, H.G. & Whiting, R.C. 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52: 884–851.
- Cassin, M. H., Lammerding, A. M., & Todd, E. C. D. (1998). *Quantitative risk assessment for Escherichia coli O157: H7 in ground beef hamburgers. International Journal of Food Microbiology*, 41, 21-44.
- Castillejo-Rodríguez A.M., García Gimeno R.M, Zurera Cosano E.. Barco Alcalá and Rodríguez Pérez. *Staphylococcus aureus* Growth in Cooked Meat Products. *Journal of Food Protection*, Vol. 65, No. 4, 2002, Pages 659–665
- Castro D.L.E.; Robaina P.R.M. 2003. Manejo del ganado previo a la faena y su relación con la calidad de la carne. (Uruguay). Serie de Divulgación N°1. 31p.
- Castro, K., Moura, N., Fernandes, A., Faustino, M., Simoes, M., Calveiro, J., . . . Neces, M. (14 de octubre de 2016). Control of *Listeria innocua* biofilms by biocompatible photodynamic antifouling chitosan based materials. *Dyes and Pigments*.
<http://www.sciencedirect.com/hemeroteca.lasalle.edu.co/science/article/pii/S0143720816307525>
- Castro-Gamboa, V. Efecto de las microondas sobre algunas bacterias patógenas inoculadas en alimentos preparados mediante recetas populares costarricenses. Tesis, Licenciatura en Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos, San José (Costa Rica). 95 p. Año 1996. Editorial San José, Universidad de Costa Rica.
- CCFRA. Pasteurization: a food industry practical guide (Second Edition). Guideline 51. Campden and Chorlewood Food Research Association; 2006
- Decker Marcelo, de Almeida GOMES Gilmar, Cazonatto GALVÃO Alessandro, da Silva Robazza Weber. Evaluation of a new mathematical model to describe *Clostridium perfringens* growth during the cooling of cooked ground beef *Food Sci. Technol*, Campinas, 33(3): 507-512, July-Sept. 2013
- DMFit. (2009). Software de modelamiento dinámico edición on-line. Disponible en: <http://ifrsvwwwdev.ifrn.bbsrc.ac.uk/CombasePMP/GP/DMFit.aspx>.
- Doyle ME, Mazzotta AS, Wang T, Wiseman DW, Scott VN. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*. 2001;64:410-29.

- ESR. (2001a). Microbial Pathogen Data Sheets: Escherichia coli O157:H7. Retrieved from http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Escherichia_Coli-Organism_Invades.pdf
- Ferrari, R.; Szerman, N.; Sanow, L; Sancho, A; Vaudagna, S. Aplicación de la tecnología de altas presiones hidrostáticas para la elaboración de hamburguesas de carne con bajo contenido de sales. Rev. La Industria Cárnica Latinoamericana 183 : 42-48 (2013)
- Francisca Di Pillo S. y Gustavo Sotomayor D. Escherichia coli productoras de toxinas Shiga O157 y No O157 en carne bovina, Chile. Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria, ACHIPIA. Perfil de Riesgo/ACHIPIA N.º03/2018
- Frazier, W. C. Y Westhoff, D. C. (2000). Microbiología de los alimentos, Parte I en Microbiología de los alimentos. Zaragoza: Acribia, pp. 30-58.
- Fridman, O.; Goldberg, A.; Ronin, I.; Shores, N.; Balaban, N.Q. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. Nature 2014, 513, 418–421.
- Garcés, F., Klotz, B.. Aplicación de procesos de minería de datos para la obtención de modelos predictivos de inactivación de listeria en alimentos. **Alimentos Hoy**, Norteamérica, 19, dic. 2010. Disponible en: <<https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/47/45>>. Fecha de acceso: 30 mar.
- Gill C.O, Badoni M. Microbiological and organoleptic qualities of vacuum-packaged ground beef prepared from pasteurized manufacturing beef, International Journal of Food Microbiology, Volume 74, Issues 1–2, 2002, Pages 111-118
- Gill C.O, Tanders C. Effects of spray-cooling processes on the microbiological conditions of decontaminated beef carcasses. J Food Prot 2003; 66:1247-1252.
- González, Rafael E., Tarón Dunoyer, Arnulfo, & Pérez Mendoza, Jaime. (2022). Modelo de crecimiento microbiano para predecir el comportamiento de Salmonella spp. en queso costeño colombiano. *Información tecnológica*, 33(1), 225-234. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642022000100225>
- Hércules de Melara Ana Delmy. Evaluación del efecto de empaque y temperatura de almacenamiento en la supervivencia de listeria monocytogenes en salchichas artesanales 2014. Tesis Grado de Maestro en Microbiología e inocuidad de alimentos. Universidad de El Salvador. Facultad de Química y farmacia

- Hereu A., Dalgaard P., Garriga M., Aymerich T., Bover-Cid S. Analysing and modelling the growth behaviour of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products after a high pressure treatment at 400 MPa. *International Journal of Food Microbiology* 186 (2014) 84–94
- ICMSF [International Commission on the Microbiological Specification of Foods]. 1994. Choice of sampling plan and criteria for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 22: 89–96.
- ICMSF. 1996. *Microorganisms in Foods, Microbiological Specifications of Food Pathogens*. Vol. 5. London: Blackie Academic and Professional. 513p.
- Jaberi Rahimeh, Kaban Güzin, Kaya Mükerrerem. Effects of vacuum and high-oxygen modified atmosphere packaging on physico-chemical and microbiological properties of minced water buffalo meat. *Asian-Australas J Anim Sci*. Volume 32, number 3, p 421-429, 2019.
- Jay, J. (2002). Indicadores de la calidad e inocuidad microbianas de los alimentos. *Microbiología Moderna de los Alimentos*. 4a Ed. Editorial Acribia, S. A, Zaragoza, España, 363-378.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). Fresh meats and poultry. *Modern food microbiology*, 63-99.
- Ju Lee Yong, Su Jung Byeong, Joo Yoon Hyun, Kim Kee-Tae, Paik Hyun-Dong, Lee Joo-Yoen. Predictive model for the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in raw pork meat as a function of temperature. *Food Control* 44 (2014) 16-21
- Lemay Marie-Jose, Choquette Julie, Delaquis Pascal J., Gariepy Claude, Rodrigue Natalie, Saucier Linda. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology* 78 (2002) 217-226
- Li, B.; Qiu, Y.; Shi, H.; Yin, H. The importance of lag time extension in determining bacterial resistance to antibiotics. *Analyst* 2016, 141, 3059–3067.
- Li, K. Y.; Torres, J. A. 1993. Water activity relationships for selected mesophiles and psychrotrophs at refrigeration temperature. *Journal of Food Protection* 56(7), 612-615.
- Lobacz Adriana, Kowalik Jaroslaw, Tarczynska Anna. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in mold-ripened cheeses- *Journal of Dairy Science*. Volume 96, Issue 6. 2013, Pages 3449-3460. ISSN 0022-0302

- Magdalena Ramos, Ramón Santos, Tatiana Beldarrain, Urselia Hernández, Margarita Nuñez de Villavicencio, Roger de Hombre y Frank Rodríguez. Productos reestructurados y envasados al vacío. Vol. 31 Núm. 2 (2021)
- McDonald, K., y D.W. Sun. (1999) Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 1-27.
- Means WJ, Clarke AD, Sofos JN, Schmidt GS. Binding, sensory and storage properties of algin/calcium structured beefsteaks. *J Food Sci* 1987; 52: 252-8.
- Molina Moreno Nataly, Mercado Reyes y Carrascal Camacho Ana Karina. Efecto del tiempo y temperatura de cocción en hamburguesas y longanizas inoculada artificialmente con *Listeria monocytogenes*. *Revista Bistua. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona, Pamplona-Colombia.* Vol. 8, núm. 1, enero-junio, 2010, pp. 1-28
- Molina-Moreno, Silvia Nataly, Mercado-Reyes, Marcela, & Carrascal-Camacho, Ana K.. (2009). Efecto de tiempo y temperatura de cocción en chorizo inoculados artificialmente con *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*, 14(3), 198-205. Retrieved March 27, 2022
- Murphy RY, Duncan LK, Driscoll KH. D and z values of *Salmonella*, *Listeria innocua*, and *Listeria monocytogenes* in fully cooked poultry products. *J Food Sci.* 2003;68:1443-7.
- Mytle, N., Anderson, G., Doyle, M. & Smith, M. (2006). Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Control Journal*, 17(1), 102-107.
- Nissena H., Alvseike O., Bredholta S., Holcka A., Nesbakkenc T. Comparison between the growth of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in ground beef packed by three commercially used packaging techniques. *International Journal of Food Microbiology.* Volume 59, Issue 3, 10 September 2000, Pages 211-220
- Nyhan L, Begley M, Mutel A, Qu Y, Johnson N, Callanan M. Predicting the combinatorial effects of water activity, pH and organic acids on *Listeria* growth in media and complex food matrices. *Food Microbiol.* 2018 Sep;74:75-85. doi: 10.1016/j.fm.2018.03.002. Epub 2018 Mar 7. PMID: 29706340.
- Ospina Meneses, Silvia Marcela, & Cartagena Valenzuela, José Régulo. (2008). La atmósfera modificada: una alternativa para la conservación de los alimentos. *Revista Lasallista de Investigación*, 5(2), 112-123. Retrieved March 28, 2022, from

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492008000200014&lng=en&tlng=es

Ózdemir, H., Yildirim, Y., Kuplülü, ó., Koluman, A., Goncúoglu, M. & Gokhan, I. (2006). Effects of lactic acid and hot water treatments on Salmonella typhimurium and L. monocytogenes on beef. Food Control Journal, 17(4), 299-303.

Podpečan Branko, Pengov Andrej, Vadnjak Stanka. The source of contamination of ground meat for production of meat products with bacteria staphylococcus aureus Slov Vet Res 2007; 44 (1/2): 25-30

Ramírez Barrera G.. Desarrollo y validación de modelos predictivos dinámicos del crecimiento de staphylococcus aureus en productos cárnicos previo al proceso de cocción. 2011. Tesis de maestría en Ciencias. <http://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/183>

Ray, B. 2004. Fundamental Food Microbiology. 608 p. CRC Press, Boca Raton,

Ritter F.L.; Bergmann R. Eficácia do sistema de pré-resfriamento de frangos em tanques, sobre a redução da contaminação bacteriana de carcaças. Higiene Alimentar, v. 17, n. 108, p. 97-104, 2003.

Rivas, L., Lake, R., Cressey, P., King, N., Horn, B., & Gilpin, B. (2014). Risk profile (update): Shiga toxin-producing escherichia coli in red meat. MPI Technical Paper No: 2015/10.

Roca M, Valladares C. Control microbiológico de la Industria Cárnica en Cuba. La Habana: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia; 1986.

Rodríguez Jerez J. J. Programas para la predicción del crecimiento de patógenos. 2017 https://www.adiveter.com/ftp_public/articulo1276.pdf

Rodríguez, M. & Manca de Nadra, M. (2009). Viabilidad de Listeria monocytogenes en un sistema de alimento acondicionado con combinaciones de compuestos fenólicos. Repositorio Universidad Nacional de Tucumán, Buenos Aires- Argentina.

Rodriguez, Maria R., Aguirre, Juan S., Lianou, Alexandra., Parra-Flores, Julio., García de Fernando, Gonzalo. Analysis of the variability in microbial inactivation by acid treatments. LWT - Food Science and Technology. 2016; 66: 369-377.

Rodríguez Vargas Maria Rosa.; Aguirre García Juan Salvador. Efectos de los tratamientos subletales en la variabilidad de las fases de latencia de Salmonella enterica serovar Enteritidis y Listeria innocua. March 2022. Revista de Investigación en Salud Pública Volumen 13; No 37:31 al 38

Roering, A.M., Luchansky, J.B., Ihnot, A.M., Ansay, S.E., Kaspar, C.W. & Ingham, S.C. 1999. Comparative survival of Salmonella typhimurium DT

- 104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. *International Journal of Food Microbiology*, 46: 263–269.
- Ross T, Dalgaard P, Tienungoon S. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int J Food Microbiol.* 2000;62:231-45.
- Ross, Tom & Dalgaard, Paw & Tienungoon, Suwunna. (2001). Predictive modeling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International journal of food microbiology.* 62. 231-45. 10.1016/S0168-1605(00)00340-8.
- Sandriane Pizato^{1*}, William Renzo Cortez-Vega² , Audecir Giombelli³ and Carlos Prentice. Effect of storage temperature at 7°C on the physical-chemical and microbiological quality of industrialized cooked chicken breast meat. *Maringá*, v. 36, n. 2, p. 355-360, Apr.-June, 2014
- Schlisselberg Dov B., Kler Edna, Kalily Emmanuel, Kisluk Guy, Karniel Ohad, Yaron Sima. Inactivation of foodborne pathogens in ground beef by cooking with highly controlled radio frequency energy, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 160, Issue 3,2013,Pages 219-226
- Simpson, R.; Li, K. Y.; Torres, J. A. 1989. A management tool to improve the microbial quality of refrigerated foods. In *Proceedings of the International Conference on Technical Innovations in Freezing and Refrigeration of Fruits and Vegetables*, Davis, California, Julio 9-12, EUA.
- Syne, S. M., Ramsbhag, A., & Adesiyun, A. A. (2013). Microbiological hazard analysis of ready-to-eat meats processed at a food plant in Trinidad, West Indies. *Infection ecology & epidemiology*, 3, 10.3402/iee.v3i0.20450. <https://doi.org/10.3402/iee.v3i0.20450>
- Tenderis B., Kılıç B. Yalçın H, Şimşek A.. Impact of sodium lactate, encapsulated or unencapsulated polyphosphates and their combinations on *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* growth in cooked ground beef. *International Journal of Food Microbiology.* Volume 321, 2020. ISSN 0168-1605
- Torres, J. A. 1989. Temperature control throughout the distribution system. In *Proceedings of the IFT Short Course on Minimally Processed Foods*, Institute of Food Technologists, Chicago, IL, Junio24-25, EUA.
- van Asselt ED, Zwietering MH. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *Int J Food Microbiol.* 2006;107:73- 82. [151]

- van Lieverloo JHM, de Roode M, Fox MB, Zwietering MH, Wells-Bennik MHJ. Multiple regression model for thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in liquid food products. *Food Control*. 2013;29:394-400.
- Vasquez Chicoma Roosvet (2015). Influencia de tratamiento térmico en el valor nutritivo y características microbiológicas en preparados cárnicos. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3412>
- Vásquez Valles María, Alvarado Salinas Pedro, Rodríguez Haro Icela, Saldaña Sevilla Wilton, Reyes Lázaro Wilson, Vargas Huamán Araceli. Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella parathypi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada. *Revista de investigación científica-Rebiol* Vol. 34 Núm. 1 (2014): Vol. 34, núm. 1 (2014)
- Vera, Alejandra, González, Gerardo, Domínguez, Mariana, & Bello, Helia. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Revista chilena de infectología*, 30(4), 407-416
- Wu Xulei, Su Yi-Cheng. Effects of Frozen Storage on Survival of *Staphylococcus aureus* and Enterotoxin Production in Precooked Tuna Meat. *Journal of Food Science* Volume 79. 2014, Issue 8
- Yeon Ah Kim, Seung Won Jung, Hye Ri Park, Ku-Young Chung and Seung Ju Lee. Application of a Prototype of Microbial Time Temperature Indicator (TTI) to the Prediction of Ground Beef Qualities during Storage. *Korean J. Food Sci. An*. Vol. 32, No. 4, pp. 448~457(2012)
- Yong JuLee, Byeong Su Jung, Hyun Joo Yoon, Kee-Tae Kim, Hyun-Dong Paik, Joo-Yoen Lee. Predictive model for the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in raw pork meat as a function of temperature. *Food Control*. Volume 44, October 2014, Pages 16-21

ANEXOS

AD

MATRÍZ DE CONSISTENCIA

Título: MODELAMIENTO DE CURVAS DE SUPERVIVENCIA NO LINEAL PARA DETERMINAR LA INACTIVACIÓN TÉRMICA DE *Salmonella* ssp., *Escherichia coli* Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN LA CARNE MOLIDA DE POLLO.

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADOR	ESCALA	METODOLOGIA
<p>General ¿De qué forma se puede valorar la inactivación térmica de <i>Salmonella</i> ssp., <i>Escherichia coli</i> y Bacterias ácido lácticas en la carne molida de pollo?</p> <p>Problemas específicos ¿De qué forma se puede establecer las características de la supervivencia de <i>Salmonella</i> ssp., <i>Escherichia coli</i> y Bacterias ácido lácticas en la carne molida de pollo?</p> <p>¿Cuál es la barrera térmica que se requiere para inactivar a <i>Salmonella</i> ssp., <i>Escherichia coli</i> y Bacterias ácido lácticas en la carne molida de pollo?</p>	<p>Objetivo General Modelar curvas de supervivencia no lineal de <i>Salmonella</i> ssp., <i>E.coli</i> y Bacterias ácido lácticas (BAL) para determinar su inactivación térmica en la carne molida de pollo</p> <p>Objetivos específicos Determinar parámetros cinéticos de supervivencia de <i>Salmonella</i> ssp., <i>E. coli</i> BAL en la carne molida de pollo a temperaturas de 55 °C, 60 °C y 65 °C, mediante modelo Gompertz</p> <p>Modelar curvas de supervivencia no lineal de <i>Salmonella</i> ssp., <i>E. coli</i> y BAL en carne molida de pollo para determinar la inactivación térmica a 55 °C, 60 °C y 65 °C, utilizando modelo de Bigelow</p> <p>Establecer tiempo de reducción decimal (Factor D) óptimo para inactivar <i>Salmonella</i> ssp., <i>E. coli</i> y BAL en la carne molida de pollo, sometidas a 55 °C, 60 °C y 65 °C..</p>	<p>Hipótesis general El Modelamiento de las curvas de supervivencia no lineal permitiría determinar el tiempo requerido para la Inactivación térmica de <i>Salmonella</i> ssp. <i>E. coli</i> y BAL en la carne molida de pollo.</p> <p>Hipótesis específicas El impacto de temperaturas mayores que el óptimo, de <i>Salmonella</i> ssp., <i>E. coli</i> y BAL en la carne molida de pollo, modifican sus parámetros de mortalidad generando sobrevivientes, que alteran la inocuidad del alimento.</p> <p>La supervivencia no lineal de <i>Salmonella</i> ssp., <i>E. coli</i> y BAL en carne molida de pollo, sometidas a temperaturas por encima de sus óptimos, pueden ser caracterizadas mediante modelamiento matemático.</p> <p>Los mecanismos de la resistencia y su inactivación, a temperaturas mayores que sus óptimos, de <i>Salmonella</i> ssp., <i>E. coli</i> y BAL en la carne molida de pollo, se podrán establecer por modelamiento matemático.</p>	<p>Variable Dependiente Inactivación térmica bacteriana en la carne molida de pollo</p> <p>Variable independiente Modelamiento de curvas de supervivencia no lineal y resistencia térmica a 55, 60 y 65 °C</p>	<p>Dependientes Disminución del crecimiento bacteriano en función del tiempo</p> <p>Independientes Sobrevivencia, adaptación y resistencia térmica</p>	<p>Dependientes Número de días Temperatura</p> <p>Independientes UFC/gr mg/L ppm Nisina UFC/gr % Ácido Láctico ppm Nisina Log UFC/Hora Horas Log UFC/Hora</p>	<p>Cuantitativa</p> <p>Cuantitativa</p>	<p>Microfit 4.1 Combase</p> <p>Uso del modelo de Gompertz modificado</p> <p>Modelo de Bigelow Combase</p>

Autor: Edgar Zárate