INTRODUCCIÓN

Recientemente en países como Canadá, Dinamarca, Estados Unidos e Inglaterra se han estudiado y desarrollado modelos microbiológicos predictivos que describen la cinética de crecimiento de los principales microorganismos estudiados en alimentos, tanto patógenos como causantes del deterioro, bajo distintas condiciones de crecimiento. La ventaja de estos nuevos modelos con respecto a los modelos matemáticos predictivos aplicados al diseño de procesos térmicos es que involucran dentro de sus parámetros de control otros factores que también afectan la estabilidad del microorganismo como por ejemplo: la actividad de agua, concentración de NaCl, pH, y en algunos un cuarto factor (%CO_2, concentración de nitritos o ácido láctico o acético). Los modelos predictivos microbiológicos dan información de las fases de crecimiento y tiempos que al microorganismo le toma superar las condiciones de estrés a las que es sometido cuando se aplica al alimento un tratamiento para conservarlo.

La industria de alimentos realiza controles microbiológicos de sus productos utilizando métodos tradicionales (i.e. siembras en cultivos selectivos y pruebas bioquímicas) que consumen mucho tiempo (mínimo 24 horas) y recursos. La microbiología predictiva es una alternativa para la industria de alimentos para facilitar y agilizar los controles microbiológicos y de calidad en las diferentes etapas de proceso y en el producto final.

En esta investigación se evaluaron dos modelos predictivos del crecimiento de *Escherichia coli*: Growth Predictor (GP) y Pathogen Modelling Program (PMP). El sustrato utilizado fue filete de pescado, puesto que es uno de los productos más susceptibles al deterioro microbiano, y el microorganismo experimental seleccionado fue *E. Coli*, debido a que es considerada como un indicador de malas prácticas de higiene y manipulación por lo que representa una importante amenaza sanitaria. Se utilizaron tecnologías de barreras para conservar el producto, ya que esta técnica afecta el crecimiento microbiano sin producir cambios drásticos en las características organolépticas y nutricionales del alimento.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si los modelos predictivos GP y PMP pueden ser utilizados bajo nuestras condiciones de trabajo para predecir el crecimiento microbiano de *E. coli* en filetes de corvina tratados con tecnología de barreras.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

~~1.1~~ Materia Prima: Corvina plateada (*Cynoscion spp.*)

Con formato: Numeración y viñetas

La corvina plateada es un pez demersal perteneciente a la familia *Sciaenidae* (genero *Cynoscion*) que habita en aguas costeras tropicales y subtropicales. Las principales especies presentes en Ecuador son: *C. phoxocephalus*, *C. squamipinnis*, *C. analis*, *C. stolzmanni*, *C. albus* y *C. altipinnis* (20, 17). La familia Sciaenidae es de gran importancia para la pesca artesanal en Ecuador, ya que constituye cerca del 44% de los desembarques de demersales de esta flota (27). Los principales puertos de desembarque son: Puerto Bolivar (El Oro), Engabao (Guayas), General Villamil Playas (Guayas). El promedio de captura anual artesanal de corvina plateada en el periodo 1990 – 1998 fue aproximadamente 1630Tm, (17). Recientemente las capturas de esta especie han disminuido,

debido a la competencia con la flota semiindustrial y en el 2004 fueron apenas 820.41 Tm (28).

La carne de corvina es una importante fuente de nutrientes. Contiene aproximadamaente 19.37% de proteínas, 0.45% de grasas y 78.36% de agua, además de incluir vitaminas como la A, B1, B2, niacina y minerales muy diversos, como el calcio, hierro y fósforo y un aporte energético de aproximadamente 1cal/gramo, ver Apéndice A, (45,12, 26).

Alteraciones en el pescado fresco, sus causas y efectos

El pescado fresco es aquel recién capturado que no ha sido sometido a ningún proceso de conservación y que se ha preservado solamente enfriándolo (10), ya sea con adición de hielo troceado, puro o mezclado con sal o a bordo de los pesqueros con agua de mar o salmuera refrigerada, el cual se mantiene inalterado y apto para el consumo humano (32, 25). El mantenimiento en refrigeración, descabezado, y desangrado o eviscerado son operaciones que puede recibir el pescado luego de su captura que no son consideradas como tratamiento conservador (32).

El pescado es uno de los alimentos de tipo carnoso más susceptible a ser degradado, entre otros factores debido a condiciones ambientales, composición química, contenido de agua de sus tejidos así como su estructura histológica (13, 37). Tras la muerte del pescado, el músculo de éste está totalmente relajado, presentando una textura firme y elástica al tacto. A partir de este momento en el pescado comienza una serie de alteraciones que reducen su calidad después de la captura (11). Algunas características evidentes del deterioro según Huss (1997) son:

- Detección de olores y sabores extraños.
- Formación de exudados.
- Producción de gases.
- Pérdida de color.
- Cambios de textura.

Las causas de la alteración del pescado fresco pueden darse por reacciones de oxidación, por autólisis y por actividad microbiana (13). El tipo de deterioro depende de la especie y clase de pescado, de la flora microbiana inicial, de la zona geográfica y de los métodos de captura, procesado y almacenamiento (8).

La actividad celular del pescado después de su muerte continúa aún activa durante poco tiempo impulsada por las reservas de energía, principalmente glucógeno y ATP (39). Una vez que casi se han agotado las reservas de energía se produce el *rigor mortis* que es la contracción del músculo debido a la unión irreversible de los filamentos de actina y miosina. Este estado de rigidez se mantiene durante varias horas o días dependiendo de la temperatura. Terminado el *rigor mortis* el músculo recupera la flexibilidad pero no la elasticidad previa al rigor (20, 11). Otro efecto producido por la ausencia del ATP es la hidrólisis gradual, durante las primeras horas, del glucógeno a ácido láctico, dando lugar, a un descenso del pH desde alrededor de 7 hasta cerca de 6.4 (11). Si la reducción de pH llega hasta el punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares, éstas se desnaturalizan y pierden su capacidad de retener agua, lo que origina cambios en la textura e incrementan la tendencia a la exudación (11, 39). Con el tiempo, la pérdida de energía se traduce en un desequilibrio químico intracelular que activa ciertas enzimas endógenas proteolíticas, que provocan el ablandamiento de la estructura muscular (18; 39). A medida que se deteriora el pescado van apareciendo cambios en su olor y sabor debido a la presencia o ausencia de la inosina monofosfato (IMP) y otros 5'-nucleótidos (11; 39). Generalmente, coincidiendo con la proteolisis comienza la

lipólisis de la grasa, lo que da lugar a la liberación de ácidos grasos, siendo muy importantes los fenómenos posteriores de autoxidación que se producen sobre ellos, ya que pueden producir cambios en el sabor y olor del pescado. En el caso de pescados grasos, estos cambios conducen a serios problemas de calidad, como la aparición de sabores y olores rancios. (39).

La principal causa de alteración de los productos del mar es la acción bacteriana por eso casi todos los esfuerzos de conservación del pescado van encaminados a su control (11). Sin embargo, la degradación microbiana no llega a ser significativa hasta después de un primer periodo, cuando las enzimas intrínsecas han actuado. Una vez que la alteración microbiana empieza ésta prevalece sobre las otras reacciones del deterioro (13, 11).

La microflora inicial del pescado es muy variada, depende de la que existe en las aguas donde vive y de su alimentación (13). Los pescados capturados en aguas muy frías y limpias contienen menor número de microorganismos, en general psicrófilos, mientras que el pescado capturado en aguas cálidas presenta recuentos ligeramente superiores en su mayoría mesófilos (20, 13). Un número muy elevado de microorganismos por ejemplo de 10^7 ufc/cm^2, ha sido

encontrado en pescados capturados en aguas muy contaminadas. Ward (1994) indica que el intervalo de recuentos es: piel, 10^2 -10^6 ufc/cm^2; branquias, 10^3 – 10^5 ufc/g; intestino, desde muy pocos a 10^7 ufc/g o mayor (16, 20).

El músculo de un pez saludable o de un pescado recién capturado es estéril, debido a que el sistema inmunológico del pez previene el crecimiento de bacterias en el músculo (20). Cuando el pez muere, el sistema inmunológico cesa de funcionar y las bacterias que se encontraban en la superficie externa y en las vísceras proliferan libremente invadiendo la carne, donde consumen las sustancias naturales presentes. Estas reacciones producen cambios en las sustancias odoríferas y sápidas, formándose al inicio compuestos con olor y sabor ácido, a hierba o a fruta; apareciendo después sustancia amargas de aspecto gomoso y aroma sulfuroso y al final, en el estado pútrido el carácter es amoniacal y fecal. (11). Entre los compuestos generados por la acción microbiana y que son responsables de estos olores y sabores desagradables tenemos la trimetilamina, compuestos volátiles como aldehídos, cetonas, ésteres y sulfuros (20). La acción continuada de los microorganismos afecta la apariencia y las propiedades físicas del pescado como: la viscosidad existente sobre la piel y branquias al pasar de acuosas y

claras a oscuras, grumosas y decoloradas, la iridiscencia, lozanía y tersura de la piel haciéndose débil, pálida y desagradable al tacto, las agallas que al principio son rojas adquieren un color rosa pálido y finalmente amarillo grisáceo, entre otros (11, 13).

Las diferentes causas de alteración del pescado fresco no actúan de forma aislada sino que dan lugar a procesos concurrentes e interdependientes (11). Se resumen las causas de los diversos tipos de deterioro en la tabla 1.

TABLA 1

CAUSAS DEL DETERIORO DEL PESCADO

Síntomas de deterioro	Causas del deterioro del pescado			
	Microbiológicas	Químicas (oxidación)	Autolíticas	Físicas
Olores/sabores extraños	+	+	+	-
Formación de exudados	+	-	-	-
Producción de gases	+	-	-	-
Pérdida de color		+	+	+
Cambio de textura		-	+	+

Fuente: Modificado de: Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros (18).

~~1.3~~ Principales microorganismos causantes del deterioro del pescado fresco y principales microorganismos indicadores de mala manipulación.

Con formato: Numeración y viñetas

Como se mencionó anteriormente la principal causa de alteración del pesado fresco es la acción bacteriana, siendo de gran importancia distinguir de toda esta gran variedad de microorganismos: los que forman parte de su flora natural característica, que por lo general son los causantes del deterioro en la calidad del pescado, y es común encontrarlos en niveles altos (30, 11); por otra parte, los microorganismos que llegan al pescado debido a una mala práctica de manipulación o captura, ya sea por pesca en aguas contaminadas, por la forma de captura, por la conservación que se les de abordo de las embarcaciones, por la falta de limpieza, higiene y condiciones sanitarias en sus fases de elaboración, entre otros (11).

Entre los microorganismos encontrados en pescado existen algunos patógenos que son los causantes de intoxicaciones y brotes de enfermedades en las personas (30). Por lo general, estos microorganismos no se presentan con frecuencia en cantidades que puedan ser peligrosas, pero debe evitarse condiciones inadecuadas de conservación para disminuir la amenaza de una posible

multiplicación de estos microorganismos que una vez empezada su acción son difíciles de combatir (11).

De la amplia variedad de microorganismos causantes de alteraciones en la calidad de los productos del mar o daños en la salud del consumidor podemos mencionar entre los más importantes las bacterias de los géneros: *Salmonella* sp., *Shigella*, *Vibrio sp., Clostridium, Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium, Micrococcus, Alteromonas, Aeromonas hydrophila*, *Moraxella, Escherichia, Proteus, Serratia, Bacillus, Corynebacterium, Shewanella putrefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, mohos y levaduras (39, 18).

Para nuestro estudio se seleccionó del género *Escherichia* a la bacteria *Escherichia coli* por ser utilizada en la industria alimentaria desde el año 1900 como microorganismo indicador de contaminación fecal (21, 9). Otros organismos usados como indicadores de contaminación no necesariamente fecal son: los aerobios totales (RT), coliformes, enterobacterias y *Listeria monocytogenes* (30, 8). Estas bacterias son consideradas como microorganismos indicadores de malas practicas de higiene durante la manipulación y procesamiento del alimento, debido a que

normalmente no deberían estar presentes como contaminación natural en el alimento estudiado, ya que su habitad normal es el tracto intestinal humano y animal, dejándose notar de esta manera que su presencia en el alimento se debe a una contaminación de origen fecal (8). La presencia de E. coli y demás microorganismos considerados como indicadores en el alimento no representa un riesgo directo para la salud, pero en algunos casos estos sirven para indicar la presencia de un riesgo potencial para la salud (30).

Aunque la mayor parte de las cepas de E.coli no son patógenas, la especie contiene cepas que son capaces de causar varios tipos diferentes de enfermedades, algunos mortales, y se sabe que algunas de estas cepas son transmitidas por alimentos (Bell, 1998).

En la actualidad la industria de alimentos está prestando una atención considerable en el diseño de controles adecuados que permitan reducir al mínimo la contaminación de los alimentos con *E. coli*, debido a la aparición de una cepa productora de la citotoxina Vero (VTEC). Esta cepa ha causado brotes de intoxicación alimentaria, con frecuencia con morbilidad y mortalidad importantes, ver Apéndice B, (9). La mayoría de los brotes de infecciones con E.coli han sido relacionados con el consumo de carne picada de vacuno insuficientemente cocida, y en menor grado, el consumo de leche cruda, y agua mal procesada o conservada (22, 30). Los

mariscos también pueden ser una fuente de enfermedades transmitida por alimentos (ETA) debido a la contaminación de las aguas en donde se los captura y a la manipulación y tratamiento que reciban posterior a su pesca (30).

La carga de E. coli en un pescado fresco con buenas practicas de manipulación no puede pasar de 10 ufc/g. La dosis infecciosa de cepas de *Escherichia coli* de tipos patogénicos está en el rango de 10^6-10^{10} ufc/g y para la cepa más peligrosa enterohemorrágica E. coli O157:H7 productora de verotoxinas la dosis infecciosa mínima está entre 10^1-10^3 ufc/g, ver Apéndice C, (18, 30).

~~1.4~~ Tecnología de Barreras

Con formato: Numeración y viñetas

~~1.4.1~~ Definición y principios

Se conoce con el nombre de “Tecnología de barreras” a una técnica nueva de conservación que se basa en la aplicación de varios métodos de preservación en combinación, con el fin de disminuir la intensidad con que se aplica cada una de estas barreras en individual en los métodos convencionales, y lograr de esta manera conservar al alimento sin afectar sus características naturales, brindando así un producto de alta

calidad, con menos aditivos y nutricionalmente mas saludables (34).

Anteriormente se nombró una serie de reacciones involucradas con el deterioro de la calidad de los alimentos y entre estas se resaltó como principal la potencial presencia y crecimiento de los microorganismos patógenos y del deterioro, ya que es la causa que con mayor frecuencia ha sido asociada con defectos en los alimentos y daños en la salud del consumidor (11), por esta razón esta nueva técnica dirige sus esfuerzos de conservación principalmente a la inactivación, retraso o prevención del crecimiento de los microorganismos, seleccionando para cada tipo de alimento una combinación adecuada de tratamientos o barreras que los microorganismos presentes en el alimento no puedan superar (34).

Esta técnica ofrece una serie de ventajas tales como: un producto mínimamente procesado con características parecidas a las naturales, aumento de la vida en percha del alimento tratado, además dependiendo de las barreras que se seleccionen reduce los costos de procesamiento (34, 15).

Principales barreras y sus efectos sobre los microorganismos

Las barreras y los niveles seleccionados para diseñar una tecnología de barreras dependen de la naturaleza del alimento a conservar, de la cantidad inicial y tipo de flora microbiana presente o que podría presentarse por contaminación. Entre las principales barreras u obstáculos seleccionados en este estudio tenemos: la reducción de la actividad agua y la disminución del pH con ácidos orgánicos.

Reducción de la Actividad de agua.-

Es una medida de la cantidad de agua libre presente en un alimento, que puede intervenir de forma significativa en los procesos de degradación, como son: el crecimiento de microorganismos o las reacciones hidrolíticas. El valor de a_w esta definido por:

$$a_w = P/P_o \qquad (1.1)$$

Donde P es la presión parcial de agua existente en la atmósfera en equilibrio con el sustrato y P_o es la presión parcial de la atmósfera en equilibrio con agua pura a la misma temperatura. Los valores de a_w oscilan entre 0 y 1, siendo las

medidas cercanas a 1 valores que indican mayor contenido de agua libre en el alimento (32, 14, 21).

Cuando se reduce la a_w del medio, disminuye de forma paralela el número de grupos de microorganismos capaces de crecer activamente, ver tabla 2.

TABLA 2

ACTIVIDADES DE AGUA MÍNIMAS PARA CRECIMIENTO ACTIVO DE DISTINTOS MICROORGANISMOS

Grupos de microorganismos	a_w mínima
Mayoría de las bacterias G-	0,97
Mayoría de las bacterias G+	0,9
Mayoría de levaduras	0,88
Mayoría de los hongos filamentosos	0,8
Bacterias halófilas	0,75
Hongos xerófilos	0,61

Fuente: Control e Higiene de los Alimentos (32)

Existen diferentes métodos para reducir la actividad de agua tales como: el secado por arrastre de aire, la liofilización, el secado solar, la deshidratación al vacío, la deshidratación osmótica entre otros, siendo el último nombrado uno de los más compatibles con el tratamiento de los alimentos, ya que es el método que mejor conserva las características

sensoriales de los alimentos y su aplicación no demanda grandes costos (7).

Deshidratación Osmótica (DO)

Es el proceso en el que simultáneamente ocurren dos transferencias de masa: 1) sólidos se transfieren desde la solución osmótica al alimento (Difusión) y 2) agua sale del alimento hacia la solución osmótica debido al gradiente de concentración existente entre el alimento y la solución osmótica (ósmosis) (7), ver figura 1.1.

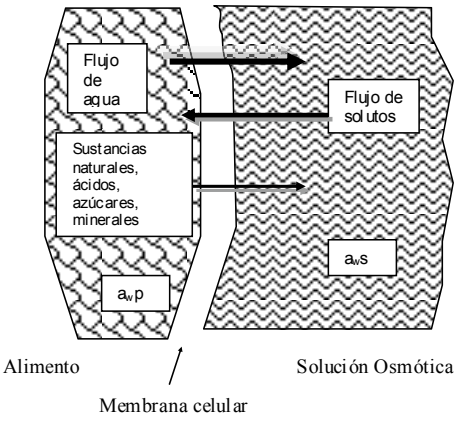


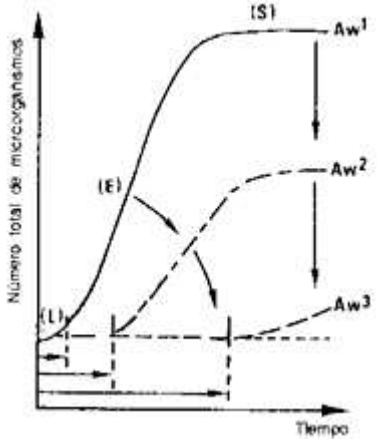
FIGURA 1.1. TRANSFERANCIA DE MATERIA EN LA DESHIDRATACIÓN OSMÓTICA

Fuente: Deshidratación de los alimentos (7)

En otras palabras la DO consiste en la concentración de agentes osmóticos en el alimento por medio de una inmersión en una solución hipertónica que puede estar formada por diferentes compuestos osmóticos como: NaCl, sacarosa, KCl, glucosa, entre otros. Al combinar estos solutos se logra una reducción de sus respectivas difusividades, con lo que se puede obtener ventajas en cuanto al sabor, la captación de solutos y la reducción del agua (41, 42).

Efecto de la reducción de a_w sobre los microorganismos

El crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos dependen esencialmente del agua disponible. Una disminución de la a_w modifica la curva de crecimiento de una especie aumentando su fase de latencia, y disminuyendo la velocidad de crecimiento y el número de microorganismos en la fase estacionaria, ver figura 1.2 (14).



L: fase de latencia,
E: fase exponencial,
S: fase estacionaria.
a_{w1}: actividad óptima de crecimiento,
a_{w3}: actividad límite de crecimiento.

FIGURA 1.2. CURVAS DE CRECIMIENTO DE UN MICRORGANISMO EN FUNCIÓN DE LA a_w

Fuente: Tecnología de la carne y los productos cárnicos (14).

Cuando un microorganismo es expuesto a una solución acuosa concentrada con un soluto y de a_w reducida, el agua es extraída de su citoplasma y pierde la presión de turgor. Este descenso en la presión de turgor perturba el equilibrio interno de la bacteria (homeostasis) y detiene la multiplicación celular. Adicionalmente, mecanismos osmoreguladores se activan y permiten incrementar la hidratación celular por medio de la acumulación de solutos compatibles, principalmente glicina betaína, ectoína, peptidos pequeños, glicerol, sucrosa, manitol, aminoácidos, entre otros. Este

mecanismo de osmoregulación en respuesta a la deshidratación requiere el consumo de energía que bajo condiciones óptimas de desarrollo sería utilizada para el crecimiento, pero que el microorganismo al verse agredido la va consumiendo y si la reducción de la a_w es muy extrema el microorganismo agotará todas sus reservas y llegará un momento en que es incapaz de reparar la homeostasis y últimamente muere (2, 34).

Un pequeño descenso de la a_w es, a menudo, suficiente para evitar la alteración del alimento, siempre que esta reducción vaya acompañada por otros factores antimicrobianos tales como: reducción de pH, adición de ácidos orgánicos, entre otros (21).

Reducción de pH.-

El pH es un factor determinante en el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos debido a la influencia de este factor en la estabilidad de macromoléculas, como enzimas o proteínas, o en iones (32).

La reducción del pH es una de las barreras más utilizadas en la conservación de alimentos, tanto en a nivel doméstico como industrial, debido a su acción sobre los microorganismos patógenos y del deterioro.

El pH se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógenos.

$$pH = -\log_{10}[H^+] \qquad (1.2)$$

Una medida también útil en lo que respecta a la cantidad de ácido presente en el alimento es la acidez. La acidez es la concentración de ácido predominante presente en el medio, que se mide a través de una titulación con álcali estándar de la solución ácida hasta la neutralización. Si el ácido presente en el medio es orgánico se puede calcular la proporción no disociada de este, conociendo el pH, la acidez y los valores de la tabla del Apéndice D. La fracción no ionizada del ácido es la que produce efectos antimicrobianos (21).

Para la reducción del pH o aumento de la acidez en alimentos, lo mas recomendable es utilizar ácidos orgánicos de cadena corta, tales como: el acético, cítrico, láctico,

sórbico, entre otros; por sus características de solubilidad, sabor y baja toxicidad (21). Algunos autores han reportado que la naturaleza del ácido predominante en el medio determina su acción tóxica sobre los microorganismos; por ejemplo el ácido acético es mucho más letal que el láctico y mucho más que el cítrico (32).

Efecto de la Reducción de pH sobre los microorganismos

El pH afecta el crecimiento microbiano en tres niveles: en el medio, en la permeabilidad de la membrana y en la actividad metabólica. La disponibilidad de nutrientes en el medio sufre modificaciones en función del equilibrio iónico. Así, iones como el Mg, Zn, Ca y Fe a diferentes condiciones de pH forman complejos insolubles y no pueden ser utilizados como cofactores de enzimas indispensables. La permeabilidad de la membrana también se ve afectada por las variaciones de concentración de H^+ y OH^-. En medio ácido las permeasas catiónicas se saturan con iones hidrógenos, lo que limita o anula su capacidad de transporte de cationes. Las reacciones enzimáticas presentan un pH óptimo de actividad, fuera del cual su estructura puede verse afectada y su

cinética sufrir cambios, lo que altera la velocidad de crecimiento del microorganismo (32).

Las moléculas de ácido no disociadas pueden difundirse libremente a través de la membrana celular, e ionizarse dentro de la célula, dando lugar a protones que acidifican el medio interno del microorganismo, que es normalmente alcalino, la misma acción tienen algunos aniones de ácidos débiles al ser metabolizados dentro de la célula bacteriana (21). Los microorganismos disponen de métodos eficaces para estabilizar su pH interno; sin embargo, si su medio sufre cambios el pH interior puede verse considerablemente afectado por el pH del medio externo. Las células de diferentes especies microbianas muestran muy distinta tolerancia a la acidificación interna o a la acumulación de aniones y sus membranas presentan distintas características en cuanto a permeabilidad de ácidos orgánicos lipofílicos. A partir de una microflora mixta la acidez puede actuar como agente selector de un componente de la población inicial que sea particularmente tolerante. Los límites de pH para el crecimiento difieren ampliamente entre los microorganismos,

dentro del rango comprendido entre 1 y 11, ver Apéndice E, (21).

Respuesta de los microorganismos a los estímulos asociados con las tecnologías de barreras.

Homeostasis.-

Cuando el medio alrededor del microorganismo es fuertemente perturbado, mecanismos homeostáticos actúan para mantener los parámetros y actividades fisiológicas en el microorganismo relativamente inalterados. Como resultado, el crecimiento puede continuar y la supervivencia es asegurada. Las tecnologías de barreras utilizadas en la preservación de alimentos para ser exitosas deben superar estos diferentes mecanismos homeostáticos.

La mayoría de los mecanismos homeostáticos son activos, es decir que requieren energía para su funcionamiento. En contraste algunos mecanismos homeostáticos son pasivos, estos son realizados por los microorganismos antes de que se produzca el estrés ambiental, por ejemplo, los mecanismos incorporados en las esporas bacterianas durante su formación que le permiten subsecuentemente resistir el calor y a otras condiciones adversas.

Los mecanismos homeostáticos contribuyen a la extrema resistencia de las bacterias a los bactericidas y preservativos alimenticios, particularmente a la acción de los ácidos orgánicos débiles (2, 34).

Agotamiento Metabólico.-

Este fenómeno ocurre en el microorganismo después de que este ha gastado todas sus reservas de energía para mantener los procesos de respuesta al estrés. Cuando el microorganismo ha llegado a este estado es casi imposible su reposición, ya que si continúan las condiciones adversas en su medio, que es lo mas probable cuando se trata de conservar un alimento, el microorganismo muere al no poder activar o mantener sus mecanismos de respuesta al estrés. Esta autoesterilización del alimento se produce más rápido mientras mayor sea la agresividad de los tratamientos aplicados a este para su conservación.

Para los microorganismos vegetativos, los procesos homeostáticos que la tecnología de barrera debe superar involucran principalmente el gasto de energía y la desviación de esta hacia otras actividades biosintéticas no relacionadas

con el crecimiento celular. Mientras la intensidad de una barrera en particular aumente, y mas energía sea requerida, el microorganismos se acerca cada vez mas al agotamiento metabólico, por ejemplo, cuando una célula no puede alargar por mas tiempo la exportación de protones necesaria para mantener un pH interno satisfactorio, o cuando no puede continuar acumulando una concentración suficiente de solutos compatibles en un alimento de actividad de agua reducida para continuar creciendo. La última consecuencia de este estado es la muerte del microorganismo, (2, 34).

Reacciones de estrés.-

Las reacciones de estrés son mecanismos de defensa de los microorganismos a situaciones adversas de desarrollo, y pueden ser origen para mecanismos de resistencia a los medios convencionales de conservación de alimentos. Esto crea posibilidades para que organismos que se creían controlados por estos métodos, dejen de serlo y se conviertan en amenazas para la salud humana.

El rango de estreses conocido al que los microorganismos responden ha crecido en los últimos años incluyendo calor,

frío, tensiones de oxígeno altas y bajas, altas presiones osmóticas, niveles altos de sodio, etanol, entre otros. Además, las células microbianas reaccionan ante un estrés por medio de comunicaciones "célula a célula" a través de la cual se transfiere información genética. Por lo general, estas reacciones son el resultado del incremento de la resistencia de los microorganismos a un estrés particular al cual han sido sometidos. Estas reacciones pueden algunas veces conducir a cambios indeseados, como aumentar la patogenicidad de microorganismos patógenos (2, 34).

Microbiología Predictiva

Definición e importancia de su estudio

La microbiología predictiva es una herramienta creada para modelar y predecir el comportamiento de un determinado microorganismo bajo condiciones ambientales particulares, a través de modelos matemáticos. La mayoría de estos modelos incluyen los efectos de tres o cuatro variables, los factores mas estudiados son: temperatura, pH, a_w y concentración de preservantes tales como: nitritos, ácidos orgánicos débiles y CO_2.

Algunos de estos modelos están disponibles en la forma de programas de computación diseñados para facilitar la aplicación de controles microbiológicos en las industrias de alimentos. (35, 34, 19).

Algunos ejemplos de su uso son los siguientes:

- Determinar la probabilidad de crecimiento de un microorganismo teniendo en cuenta las variables intrínsecas y extrínsecas del alimento.
- Evaluar la seguridad y la estabilidad de nuevas formulaciones e identificar una que provea la vida en percha deseada.
- Modelar la conducta microbiana de crecimiento, supervivencia e inactivación para obtener datos cuantitativos e interpolar condiciones adecuadas de inhibición.

~~1.5.2~~ Modelos predictivos del crecimiento de microorganismos

Con formato: Numeración y viñetas

En esta última década, ha surgido el interés por el desarrollo de programas de computación de modelos predictivos en los que se involucre la cinética de crecimiento de microorganismos en los alimentos. Al inicio los modelos de

crecimiento fueron desarrollados para mejorar los análisis de peligro y puntos críticos de control (HACCP) y los ejercicios de evaluación de riesgo para ayudar a asegurar la inocuidad de los alimentos. Por este motivo estos modelos se enfocaron en los microorganismos más comúnmente asociados a intoxicaciones alimentarias. No obstante, actualmente ha aumentado el interés en modelos de crecimiento de microorganismos del deterioro.

La forma usual para determinar el crecimiento potencial de un tipo de microorganismo en particular en una clase de alimento en particular ha sido: inocular en el alimento un número conocido de microorganismos patógenos o causantes de deterioro específicos, y después realizar análisis continuos por un periodo determinado donde se enumeran los microorganismos a través de procesos particulares con el fin de monitorear muerte o sobrevivencia. El tiempo de adaptación, y la tasa de crecimiento observados dependen de la influencia combinada de tiempo y temperatura, y de todos los demás factores que afecten a los microorganismos en el alimento en particular. Una limitación de estos estudios es que sus resultados son relevantes solamente para la

composición del alimento estudiado bajo las condiciones particulares de almacenamiento seleccionadas. De forma general la extrapolación de estos datos a otras condiciones se considera insegura, puesto que en otros alimentos la formulación cambia y las condiciones de procesamiento y almacenamiento son diferentes. El objetivo principal de los modelos predictivos es superar esta desventaja. Esto lo hacen abarcando los efectos sobre los microorganismos de control de un rango de valores claves de crecimiento, inhibición y factores ambientales, para luego diseñar ecuaciones matemáticas que describan exactamente las respuestas de estos microorganismos. Por lo que las ecuaciones pueden ser utilizadas para hacer predicciones aun de los efectos de valores que representan situaciones que no fueron específicamente evaluadas, sin poder hacer extrapolaciones fuera de los valores usados para el desarrollo de estos modelos. Por lo tanto un modelo puede ser relevante para un amplio rango de alimentos y reducir significativamente el consumo de tiempo y dinero en hacer análisis para cada condición en que se encuentre el alimento a estudiar (35, 34).

En la actualidad existen varios programas comerciales y de acceso gratuito en la Internet, tales como: ComBase, Pathogen Modeling Program (PMP), Growth Predictor (GP), Seafood Spoilage Predictor (SSP), Sym'previus, Food Spoilage Predictor (FSP), entre otros, que han sido desarrollados por distintas instituciones encargadas de regular y establecer normas de control de la calidad y seguridad alimentaria. El desarrollo de estas bases de datos, junto con la aplicación de modelos matemáticos y procesos estadísticos ha sido un elemento clave en la seguridad alimentaria (1, 43, 24).

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Corvina fresca entera se adquirió en un mercado local de Guayaquil, se le realizó una limpieza en agua con hipoclorito de sodio (50 ppm) y se la fileteó aproximadamente a las dimensiones que se indican en la tabla 3, se mantuvo los filetes alrededor de 8 horas a temperatura de 13ºC±2ºC hasta el momento de los análisis, inoculación y aplicación de los tratamientos. La inoculación se la hizo como se detalla en el literal 2.5.

TABLA 3

PESOS Y DIMENSIONES DE FILETES DE CORVINA

Peso y dimensiones	Rango
Peso (gramos)	190 - 220
Largo (cm)	22 - 23
Ancho (cm)	5,5 - 7,4
Grosor (cm)	0,9 - 1,8

Aplicación de tecnología de barreras

Un resumen de la aplicación de las barreras sobre los filetes de corvina se muestra en la figura 2.1.

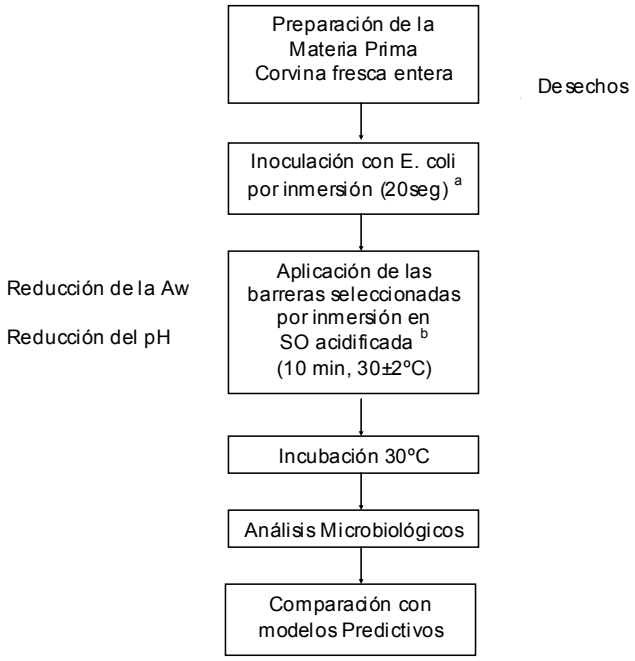


FIGURA 2.1 ESQUEMA DE PASOS SEGUIDOS EN LA APLICACIÓN DE TECNOLOGÍA DE BARRERAS A FILETES FRESCOS DE CORVINA

[a] Suspensión de E. coli = 6.12 log10(ufc/ml)
[b] Soluciones osmóticas acidificadas descritas en la tabla 13.

Se utilizaron dos barreras para controlar el crecimiento microbiano: reducción de a_w y reducción de pH, las barreras se aplicaron a los filetes de corvina usando el método denominado Proceso de Impregnación y Deshidratación por Remojo (PIDR), ya que este mantiene la textura e integridad del producto inicial (15, 41).

Para la reducción de la a_w se utilizaron soluciones osmóticas ternarias conformadas por sal, azúcar y agua, en dos porcentajes diferentes de concentración de solutos totales del 30% y 40% (porcentaje con respecto al peso total de la solución). Al 30% se utilizaron dos proporciones de sal:azúcar del 2:1 y 1:1 y al 40% una proporción del 1:1. En todos los casos la relación producto/solución fue 1/8. Los tiempos de inmersión fueron de 10, 15 y 20 minutos. Durante el tiempo de deshidratación osmótica (DO) se realizaron agitaciones constantes con el fin de mantener una solución homogénea. Los agentes osmóticos utilizados fueron de grado comercial adquiridos en la ciudad de Guayaquil.

Para la acidificación de los filetes los ácidos utilizados fueron: el ácido cítrico en concentraciones de 2, 3 y 4% y el ácido acético en concentraciones de 1,1.5 y 2% (porcentaje con respecto al peso total de la solución). Los tiempos de inmersión fueron 10, 15, 20 min.

Estos ácidos fueron escogidos por ser compatibles con el sabor del pescado. Para alcanzar las concentraciones de ácido acético se trabajó con vinagre comercial que tiene una concentración de ácido acético de 4.29%. En lo que respecta al ácido cítrico se utilizó uno de uso comercial adquirido en Laboratorios Vematlab S.A.

Los valores indicados de porcentajes, proporciones y tiempos están basados en estudios anteriores en otras especies de pescado, (15, 44). En la presente investigación se aumentó el tiempo de inmersión de los filetes en las soluciones osmóticas acidificadas con el fin de mejorar la acción de las barreras sobre los microorganismos presentes, puesto que en este estudio se inocula una carga de *E. coli* a los filetes para estudiar su comportamiento a las condiciones dadas por los tratamientos.

Evaluación sensorial

Para seleccionar adecuadamente las concentraciones de sal/azúcar y ácidos orgánicos en las soluciones osmóticas y el tiempo de inmersión de las muestras se realizaron análisis sensoriales de los filetes tratados. En general, se realizaron 4 pruebas sensoriales, las 3 primeras tenían como objeto la selección de las barreras y la última consistió en determinar la aceptación de los tratamientos

seleccionados. Para las evaluaciones sensoriales se expusieron las muestras a diferentes tiempos en soluciones conformadas por los ingredientes que se indican en la tabla 4.

TABLA 4

INGREDIENTES DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA SELECCIÓN DE LAS BARRERAS

Nº Prueba	Ingredientes en las soluciones			Tiempo de inmersión
	ClNa:Sacarosa	Ac. cítrico	Ac. Acético	
1	30% (1:1)	-	-	10, 15 y 20 minutos
	30% (2:1)	-	-	
	40% (1:1)	-	-	
2	-	2%	-	10 y 15 minutos
	-	3%	-	
	-	4%	-	
	-	-	1%	10 y 15 minutos
	-	-	1,5%	
	-	-	2%	
3	30% (1:1)	3%	-	10 y 15 min
		4%	-	
		-	1,5%	
	30% (2:1)	3%	-	10 y 15 min
		4%	-	
		-	1,5%	
	40% (1:1)	3%	-	10 y 15 min
		4%	-	
		-	1,5%	
4	30% (2:1)	3%	-	10 min
		4%	-	
	30% (2:1)	-	1,5%	
	40% (1:1)	4%	-	

Todas estas evaluaciones sensoriales se realizaron con el fin de seleccionar las 4 combinaciones de barreras (tecnologías de

barreras) que de acuerdo al consumidor sean las que impartan mejor sabor a los filetes tratados con ellas.

En las dos primeras pruebas sensoriales se dieron a degustar las muestras preparadas a 5 panelistas semientrenados y en la tercera a 4 panelistas entrenados, a los que se les entregó cuestionarios basados en pruebas hedónicas de 4, 5 y 9 puntos respectivamente, (Apéndices F, G, H y I). La evaluación sensorial final se realizó con una repetición, con 12 panelistas semientrenados mediante una prueba de medición del grado de satisfacción en cuanto al sabor de la muestra, para la cual se utilizó una escala hedónica de nueve puntos. A los resultados obtenidos en esta prueba se les realizó un análisis de varianza (3).

Análisis Físicos – Químicos

Determinación de la a_w

Los valores de a_w en los filetes tratados y el filete control sin tratamiento (FCST) se determinaron a través de la ecuación de Grover:

$$Aw*100 = 104 - 10E^o + 0.45\,(E^o)^2 \qquad (2.1)$$

$$E^o = \Sigma(E_i / m_i)$$

Donde:

E_i: es un valor constante de ingredientes i para la ecuación de Grover.

m_i: es el contenido de humedad del ingrediente en gramos de agua por gramo de ingrediente.

Para poder aplicar esta ecuación es indispensable conocer la composición del filete antes y después del tratamiento, la misma que fue determinada mediante un balance de materia, y también conocer los valores E_i para la ecuación de Grover, ver Apéndice J.

Se realizó una isoterma de desorción para la carne de corvina fresca por el método isopiéstico o gravimétrico, usando el programa Microcal ORIGIN 6 (figura 2.2). Esta isoterma es una curva que relaciona el contenido total de humedad y la correspondiente actividad de agua del alimento (7, 31).

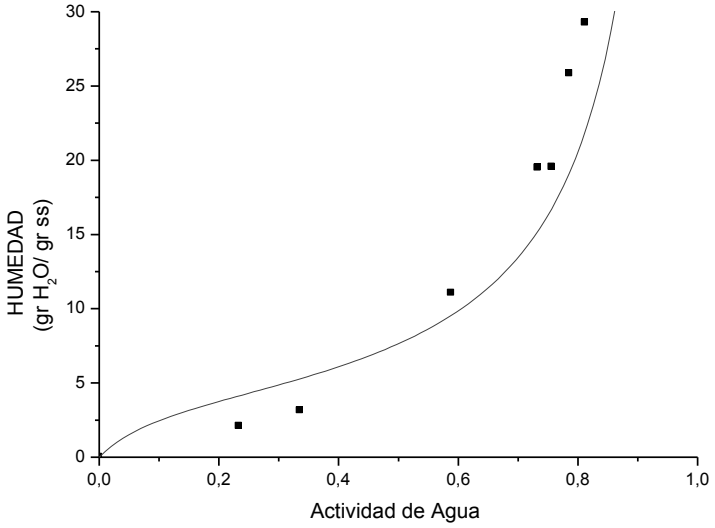


FIGURA 2.2. ISOTERMA DE DESORCIÓN DE CARNE DE CORVINA FRESCA - MÉTODO GRAVIMÉTRICO

Para seguir el método gravimétrico se construyeron 11 sistemas cerrados con distintas solución saturada de diferentes actividades de agua, las sales utilizadas se muestran en la tabla 5. La temperatura de trabajo fue de 5ºC±2ºC. Esta prueba se realizó por duplicado.

TABLA 5

ACTIVIDADES DE AGUA DE SOLUCIONES SALINAS SOBRESATURADAS A 5ºC±2ºC

Soluciones saturadas de:	Aw (5±2ºC)
Sulfato de Potasio	0,9848
Nitrato de Potasio	0,9627
Cloruro de Potasio	0,8767
Sulfato de Amonio	0,8242
Cloruro de Amonio	0,8121
Nitrato de Sodio	0,7857
Cloruro de Sodio	0,7565
Yoduro de Potasio	0,733
Nitrato de Magnesio hexahidratado	0,5886
Cloruro de Magnesio hexahidratado	0,336
Acetato de Potasio	0,2337

FUENTE: Moisture Sorption: Practical Aspects of Isotherm Measurement and Use (31).

Determinación de Humedad, Cloruros, pH y acidez

Estos análisis fueron realizados a la carne de corvina fresca y tratada, y se utilizaron las normas indicadas en la tabla 6.

TABLA 6

MÉTODOS SEGUIDOS EN LOS ANÁLISIS DE HUMEDAD, CLORUROS, pH Y ACIDEZ

Muestra	Análisis	Método	Nº Análisis
Filetes tratados y FCST	% Humedad	Secado por estufa (105ºC) (6)	3
	% ClNa	Mohr	2
	pH (25ºC)	Potenciométrico - INEN 183 (25)	3
	Acidez	AOAC 17^{TH} 925,53 (4)	3
Vinagre	Acidez	AOAC 17^{TH} 930.35J	1

Análisis Microbiológicos

Aislamiento de *Escherichia coli*

La bacteria fue aislada del suelo, para su identificación se realizaron las pruebas IMViC[c] las cuales dieron como resultado Indol (+), Rojo de Metilo (+), Voges-Proskauer (-) y Citrato Simons (-), con lo que se confirmó *Escherichia coli* tipo I, ver tabla 7.

TABLA 7

DIFERENCIACIÓN DE COLIFORMES

	Gas en caldo lactosado biliado a 44-45,5°C	Prueba del Indol	Prueba del rojo de metilo	Prueba de Voges-Proskauer	Crecimiento en citrato
Escherichia coli Tipo I	+	+	+	-	-
Tipo II	-	-	+	-	-

FUENTE: Microorganismos de los Alimentos (23)

Adicionalmente se realizaron las siguientes pruebas: Tinción de gram, siembra en agar EMB (eosin metil blue) y siembra en petrifilm EC® (3M), las que dieron resultados afirmativos de presencia de E. coli.

[c] El procedimiento de las pruebas IMViC sigue el descrito en el libro Microorganismos de los Alimentos (IMSF, 2000)

Inoculación, siembra y conteo

La solución madre (SM) se preparó partiendo de un cultivo de cepas jóvenes de 24hrs sembradas en placas de PCA por estrías, de estas placas de tomaron 15 asadas de cultivo con un asa de platino de 5mm de diámetro y se hizo una suspensión en un tubo con 9ml de agua de peptona la cual se homogenizó con agitaciones constantes y se realizó una siembra de esta suspensión en placas petrifilm[d] para E. coli por duplicado la misma que se incubó por 18-24hrs y la suspensión se la guardó a temperatura de refrigeración de 3ºC±1ºC con el fin de mantener al menos el mismo ciclo logarítmico hasta el día siguiente de inoculación. El día de la inoculación se contó las placas sembradas con la SM antes de refrigerar (SM_{AR}) obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 8, por varias pruebas realizadas con suspensiones de E. coli antes y después de refrigerar a 3ºC±1ºC se sabe que la SM guardada a esa temperatura (SM_{DR}) mantiene el mismo ciclo logarítmico medido el día anterior, sin embargo se realizó una siembra de la SM_{DR} para confirmar (tabla 8). Con estos antecedentes se realizó la suspensión de inoculación tomando 1ml de la solución refrigerada homogenizada [10.87 $\log_{10}$(ufc/ml)] y se lo

[d] Para el uso de estas placas y la interpretación de los resultados se siguieron los pasos descritos en la Guía de Interpretación de Placas Petrifilm para recuento de E.coli/coliformes de 3M.

colocó en 1000 ml de agua estéril para obtener una suspensión de E. coli próxima a 6 log_{10}(ufc/ml) que es el límite inferior de la dosis infecciosa de Escherichia coli transmitida por alimentos (30).

TABLA 8

CARGA DE E. COLI EN LA SOLUCIÓN MADRE ANTES Y DESPUÉS DE REFRIGERAR A 3ºC±1ºC

SM_{AR}		E. coli [ufc/ml]	SM_{DR}		E. coli [ufc/ml]
Dilución	-9	67	Dilución	-9	89
	-9	81		-9	98
		$67x\ 10^9$			$89x\ 10^9$
		$81x\ 10^9$			$98x\ 10^9$
Promedio		$74\ x10^9$	Promedio		$93.5\ x10^9$
SM_{AR} = 10,87 Log_{10}(ufc/ml)			**SM_{DR} =** 10,97 Log_{10}(ufc/ml)		

Con esta suspensión de E. coli con una carga de 6.12 log_{10}(ufc/g) se inoculó a todos los filetes por inmersión por un tiempo de 20 segundos (40). Seguido a la inoculación se le aplicaron los tratamientos seleccionados a cada filete según se indicó en el literal 2.2 y al FCST sólo se lo sumergió en agua estéril. Después de la aplicación de los tratamientos a los filetes se los colocó a cada uno por separado en unos recipientes de plástico limpios con una rejilla en la base que les permitía escurrirse, se los cubrió y se los guardó en una incubadora a 30ºC. Se les realizaron los análisis a los tiempos 0, 1.5, 5.13, 9.63 y 21.55 horas después de aplicados los tratamientos. Para estas pruebas se tomaron muestras de 1 gramo

del filete en análisis, se lo transfirió a 9ml de agua de peptona, se lo maceró y luego se realizó las diluciones respectivas de acuerdo al tiempo de análisis en agua de peptona. Se hicieron las siembras en placas petrifilm para E. coli y se las colocaron en una incubadora a 35ºC por 24hrs (AOAC 998.08) (5).

También se realizaron análisis microbiológicos a la materia prima siguiendo los pasos detallados anteriormente y a las soluciones osmóticas con siembra directa y dilución de 10^{-1}.

Para saber si existía diferencia en el efecto de los tratamientos sobre la bacteria, los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando análisis de varianza (Minitab 13, Minitab Inc.). El diseño aplicado consistió en un diseño completamente al azar con 5 repeticiones por cada tratamiento, tomando como repeticiones los tiempos de análisis.

Modelos Predictivos

Los modelos utilizados en este estudio para predecir el crecimiento de la E. coli en filetes de corvina tratados y el FCST son los antes mencionados en el capítulo 1, el Growth-Predictor 1.0 y el Pathogen Modeling Program 7.0, los mismos que se encuentran disponibles

en: www.arserrc.gov/mfs/PATHOGEN .HTM y www.ifr.ac.uk/Safety/GrowthPredictor/ respectivamente.

Estos programas se utilizaron siguiendo las instrucciones de sus creadores. En los dos modelos para realizar las predicciones es necesario ingresar los parámetros o factores ambientales (temperatura, pH, a_w y/o % NaCl, concentración inicial de la bacteria, entre otras) en los que se quiere conocer el comportamiento de la bacteria, valores que deben estar dentro de los rangos establecidos en cada programa. En estos programas la predicción del crecimiento de E. coli sólo ha sido estudiada en caldos de cultivo y la reducción de la a_w sólo con el uso de NaCl. En ambos modelos predictivos el usuario tiene la opción de ingresar el parámetro de a_w o % de NaCl, ya que el uno se calcula automáticamente una vez ingresado el otro valor. En esta investigación se decidió trabajar con estos dos parámetros en forma separada, para analizar la diferencia de las predicciones de estos modelos al usar el uno o el otro parámetro, ya que al ingresar el valor medido de uno de los dos el otro calculado por el modelo resulta distinto al valor medido en la realidad. Los dos modelos presentan los datos calculados en tablas y gráficas de manera clara y fácil de interpretar.

Los datos obtenidos con estos modelos fueron comparados entre si y con los resultados reales a través de pruebas de Tukey con un α= 0.05 (Minitab 13, Minitab Inc.).

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

~~3.1~~ Barreras seleccionadas

Con formato: Numeración y viñetas

La tecnología de barreras se basa en la aplicación de una combinación inteligente de barreras (métodos de preservación) con el objetivo de mejorar la calidad total del alimento (33). Con base en reportes previos (15, 44), se eligió emplear la reducción de actividad de agua y la reducción de pH como barreras para inhibir el crecimiento de la *Escherichia coli* inoculada en filetes de corvina. Es importante recalcar que al añadir ácidos a un alimento no sólo el pH tiene un efecto sobre la bacteria sino también el tipo de ácido utilizado, ya que si son ácidos orgánicos la concentración de la parte no disociada de estos tiene un efecto importante en la desestabilización del microorganismo (21).

Las soluciones osmóticas ternarias utilizadas para la aplicación de las barreras seleccionadas a los filetes de corvina se muestran en la tabla 9. Se utilizaron distintas relaciones de sal y azúcar con el fin de reducir la actividad de agua; y dos tipos de ácidos orgánicos a diferentes concentraciones para la reducción del pH.

TABLA 9

BARRERAS SELECCIONADAS PARA EL TRATAMIENTO DE LOS FILETES DE CORVINA

Reducción de a_w	Acidificación		Tiempo de inmersión
Concentración (sal:Az)	Acidos utilizados	Concentración (%)	
30% (2:1)	Cítrico	3 y 4	10 min
40% (1:1)	Acético	1,5	

Antes de la selección de las barreras descritas en la tabla 9 se realizaron tres evaluaciones sensoriales, en la primera evaluación sensorial se descartaron las soluciones osmóticas que tenían un tiempo de inmersión de 20 minutos, debido a que impartían un sabor muy salado a las muestras, que las hacían inaceptables por el consumidor, por lo que obtuvieron las calificaciones más bajas como se puede notar en la tabla 10.

TABLA 10

DESCRIPCIÓN DE LAS SOLUCIONES OSMÓTICAS (concentración sal:azúcar, tiempo de inmersión)

Concentración (sal:azuc)	Tiempo inmersión (min)	Calificación Promedio
30% (1:1)	10	2,6
30% (2:1)	10	2,4
40% (1:1)	10	1,8
30% (1:1)	15	2,6
30% (2:1)	15	2,4
40% (1:1)	15	1,8
30% (1:1)	20	0,8
30% (2:1)	20	0,8
40% (1:1)	20	0,8

En la segunda evaluación sensorial de las 12 muestras acidificadas evaluadas por los panelistas se escogieron las 6 de mejor calificación, ver tabla 11.

TABLA 11

DESCRIPCIÓN DE LAS SOLUCIONES ACIDIFICADAS

Acido orgánico	Concentración (%)	Tiempo (min)	Calificación Promedio
Cítrico	2	10	2,2
	3	10	3
	4	10	3,6
	2	15	2,4
	3	15	3
	4	15	3,2
Acético	1	10	2,2
	1,5	10	3,4
	2	10	1,2
	1	15	2
	1,5	15	2,2
	2	15	1,8

Al combinar las barreras de a_w y acidificación seleccionadas anteriormente resultaron 18 formulaciones, de las que después de la tercera evaluación sensorial se eligieron 8, ver tabla 12.

TABLA 12

DESCRIPCIÓN DE LA COMBINACIÓN DE LAS BARRERAS SELECCIONADAS Y SU CALIFICACIÓN A TRAVES DE UNA ESCALA HEDÓNICA DE 9 PUNTOS.

Tiempo	Ácidos	Concentración (Sal:Az)	Calificación promedio
10 min	3% Cítrico	30% (1:1)	5,25
		30% (2:1)	6,5
		40% (1:1)	6,75
	4% Cítrico	30% (1:1)	6
		30% (2:1)	6,5
		40% (1:1)	7,25
	1,5% Acético	30% (1:1)	6,5
		30% (2:1)	6,5
		40% (1:1)	6,25
15 min	3% Cítrico	30% (1:1)	6,5
		30% (2:1)	5,5
		40% (1:1)	5,75
	4% Cítrico	30% (1:1)	6
		30% (2:1)	5,25
		40% (1:1)	5,5
	1,5% Acético	30% (1:1)	6,5
		30% (2:1)	5,25
		40% (1:1)	5

De las 8 soluciones, se escogieron 4, con el fin de reducir costos y facilitar el análisis estadístico. En la tabla 13 se muestra la formulación de los tratamientos seleccionados.

TABLA 13

FORMULACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS SELECCIONADOS

Tratamientos	% de componentes en la solución
1	sal 20% Azuc 10% Acido cítrico 3% Agua 67%
2	sal 20% Azuc 10% Acido Cítrico 4% Agua 66%
3	sal 20% Azuc 10% Acido Acético 1,5 % (34,97% Vinag) Agua 35,03%
4	sal 20% Azuc 20% Acido cítrico 4% Agua 56%

3.1.1 Reducción de la actividad de agua

Los filetes tratados con la solución ternaria de concentración 30% proporción 2:1 sal/azúcar obtuvieron una a_w promedio de 0.972 y una humedad de 75.76% y con la solución del 40% proporción 1:1 sal/azúcar una a_w de 0.975 y una humedad de 75.04%, valores de actividad de agua relativamente iguales, a pesar del uso de diferentes proporciones de azúcar en las soluciones. Esta semejanza en los valores de a_w según datos de otras investigaciones se atribuye a la influencia mínima que

tiene la sacarosa en la reducción de la a_w en soluciones ternarias, siendo el NaCl el soluto responsable de la reducción de la mayor parte de la a_w, debido a su bajo peso molecular y capacidad de ionización. Contrario a lo que pasa con la actividad de agua, el porcentaje de humedad es menor en los filetes tratados con la solución de mayor proporción de azúcar, lo que es debido a su alto peso molecular, que hace posible aumentar la salida de agua (36). El fin de usar en combinación estos dos solutos es aprovechar las ventajas de cada uno.

En lo que respecta al porcentaje de a_w que se alcanzó en los filetes tratados se logró una reducción importante para la estabilidad microbiológica al llegar de 0.99 a 0.97, puesto que la mayoría de los microorganismos, incluyendo las bacterias patógenas, crecen más rápidamente a niveles de a_w entre 0.99 – 0.98 (21).

3.1.2 Acidificación

Las concentraciones utilizadas en las soluciones osmóticas de ácido cítrico fueron del 3 y 4% y de ácido acético de 1.5%, consiguiendo reducir el pH después de la inmersión de los

filetes en esta soluciones desde 6.63 hasta 5.88, 5.83 y 5.95 respectivamente, lográndose una reducción significativa, puesto que el pH óptimo de la mayoría de las bacterias asociadas a los alimentos está en el rango de 6.5 – 7.5 (2), no obstante el pH alcanzado puede ser adecuado para el desarrollo de bacterias más resistentes que pueden crecer bien en un rango de pH de 5 – 8 (21).

Como podemos notar en la tabla 14 el % de ácido no disociado fue mayor en los filetes tratados con las soluciones con ácido acético, lo que se explica por el valor de su pKa que es mayor al del ácido cítrico. Por lo tanto, siempre el acido acético en solución estará mucho menos disociado que el ácido cítrico a un mismo pH, lo que le da más efectividad en su acción sobre los microorganismos (7, 21, 35).

TABLA 14

ANÁLISIS QUÍMICOS DE LOS FILETES TRATADOS CON LAS SOLUCIONES ACIDIFICADAS

Acido Orgánico	Concentración en solución (%)	Tiempo de inmersión (min)	Filetes Tratados		
			pH	%Acidez	% de Ac. no disociado
Cítrico	3	10	5,88	0,57	0,00031
Cítrico	4	10	5,83	0,59	0,00044
Acético	1,5	10	5,95	0,54	0,03627

3.1.3 Análisis del efecto de la interacción de las barreras seleccionadas en el crecimiento de *Escherichia coli*.

La inmersión de los filetes de corvina en las soluciones osmóticas tiene un efecto positivo en la reducción de la carga de E. coli inoculada [4.79 $\log_{10}$ (ufc/g)], ya que en los 10 minutos de tratamiento se logró una reducción de mas de un ciclo logarítmico de la bacteria en cada uno de los filetes tratados, lo que no se logró con la carga del FCST que fue sumergido sólo en agua, ver tabla 15 y figura 3.1.

Las soluciones osmóticas utilizadas logran un efecto inicial de lavado en las superficies de los filetes, que ayuda posteriormente a mejorar el efecto de las barreras aplicadas al disminuir la carga inicial de microorganismos sobre la cual van a actuar, puesto que estos agentes conservantes utilizados resultan ineficaces cuando los niveles iniciales de microorganismos son elevados (21).

TABLA 15

CARGA DE E. COLI EN LOS FILETES DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Tratamientos	Log10 (ufc/g) después del tratamiento
1	3,29
2	2,90
3	3,95
4	3,22
FCST	4,55

En la tabla 16 se muestran los parámetros físicos-químicos de a_w, % de ClNa, pH, acidez, % de humedad y % de acido no disociado medidos en los filetes tratados y el filete testigo, que son necesarios para el uso de los modelos predictivos.

TABLA 16

PARÁMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS DE LOS FILETES TRATADOS Y EL FILETE TESTIGO

TRAT.	a_w en la S.O.	En Filetes Tratados					
		a_w	NaCl (%)	Humedad (%)	Acidez (%)	% Ac no disociado en el producto	pH
1	0,808	0,974	2,46	75,95	0,57	0,00031	5,88
2	0,806	0,970	2,71	75,71	0,59	0,00052	5,8
3	0,812	0,970	2,64	75,62	0,54	0,03627	5,95
4	0,796	0,975	2,39	75,04	0,58	0,00036	5,86
FCST	-	0,999	0,39	78,36	0,49	-	6,63

En la figura 3.1 la carga de E. coli en los filetes tratados con las soluciones osmóticas con ácido cítrico presentan un aumento al menos de 0.5 log10 (ufc/g) en cada tiempo de análisis, lo que no ocurre con la carga del filete tratado con la solución osmótica con ácido acético que se mantuvo casi constante hasta las 6.33 horas, a pesar de haber sido el filete de los tratados que quedó con mayor carga después de la inmersión. Esto demuestra claramente el efecto del porcentaje de acido no disociado en el alimento.

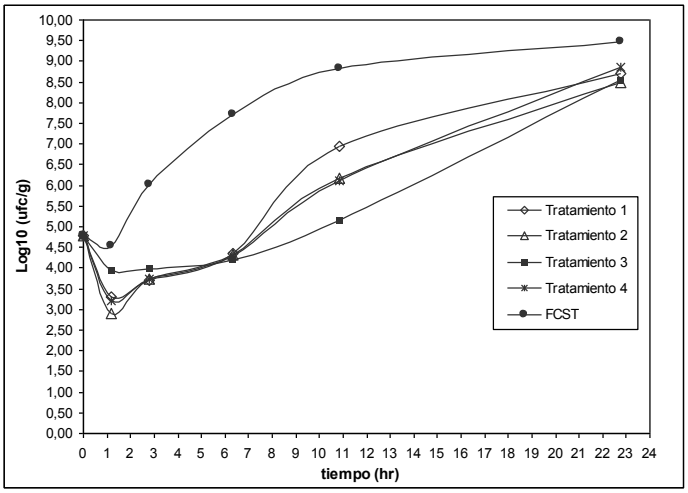


FIGURA 3.1. CURVAS DEL CRECIMIENTO DE E. COLI EN FILETES DE CORVINA TRATADOS CON TECNOLOGÍA DE BARRERAS Y EN EL FCST.

Desde las 6.33 horas hasta las 22.75 horas del último análisis, se notó un mayor crecimiento de la E. coli en todos los filetes. También, se pudo notar que el filete con el tratamiento 3 mantuvo la carga microbiana por debajo de la de los otros filetes con los otros tratamientos hasta casi el final de las observaciones, en donde todos los filetes llegaron a una carga promedio de 8.65 $\log_{10}$ (ufc/g), ver tabla 17. Los filetes al final de las pruebas quedaron totalmente inaceptables con una apariencia, textura y olor totalmente desagradables.

TABLA 17

CARGA DE E. COLI EN FILETES DE CORVINA TRATADOS CON TECNOLOGÍA DE BARRERAS Y EN EL TESTIGO A DIFERENTES TIEMPOS DE ANÁLISIS

tiempo (h)	Log10 (ufc/g)				
	Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3	Trat. 4	FCST
0,00	4,79*	4,79*	4,79*	4,79*	4,79*
1,20	3,29•	2,90•	3,95•	3,22•	4,55•
2,78	3,72	3,74	3,99	3,73	6,01
6,33	4,34	4,32	4,20	4,30	7,71
10,83	6,93	6,18	5,15	6,11	8,82
22,75	8,70	8,49	8,56	8,84	9,47

* Carga promedio de E. coli inoculada en los filetes de corvina antes de la aplicación de los tratamientos.
• Carga promedio de E. coli en los filetes de corvina después de la aplicación de los tratamientos.

Como podemos notar el tratamiento 3 es el que retardó un poco más el crecimiento de la bacteria, lo que se debe a la acción conjunta de las barreras aplicadas, y de una manera particular a la acción del ácido acético, que a pesar de haber sido el ácido con menor concentración empleada en la solución, presentó mayor efectividad sobre la bacteria, debido a la solubilidad de su forma no disociada en la membrana celular que le permite pasar al interior de la célula bacteriana sin mayores problemas, en donde esta molécula de ácido se disocia, causando acidificación en el interior de la célula, inhibiendo de esta manera el transporte de nutrientes y dando lugar a concentraciones intracelulares de sus aniones, los

cuales ejercen acción inhibitoria (21; 35). Esta efectividad del ácido acético se potencia al usar conjuntamente la barrera de reducción de la a_w usando soluciones osmóticas, debido a que en el tiempo de inmersión se produce una diferencia de potencial químico a través de la membrana semipermeable entre el producto y la solución, que provoca una transferencia de materia, salida de agua del producto y entrada de solutos al alimento, lo que reduce el agua disponible para las reacciones metabólicas de los microorganismos, mejorando de esta manera el efecto de este ácido, sin el cual tampoco hubiese habido acción sobre la bacteria, ya que los niveles alcanzados de a_w, pH y ácido no disociado en los filetes no fueron suficientes para lograr por ellos solos un efecto sobre la E. coli, ver tabla 16 y Apéndices K y L (21, 7). Por eso es importante el uso en conjunto de las barreras para lograr un medio hostil que supere de alguna manera el mecanismo homeostático de respuesta que genera la bacteria al estrés causado.

A pesar de que no se inhibe el crecimiento de la E. coli inoculada [4.79 $\log_{10}$ (ufc/g)] en los filetes de corvina con los tratamientos aplicados, se consigue un retardo en su

crecimiento, ver figura 3.1 y tabla 17. Al comparar las curvas y valores de crecimiento de E. coli de los filetes tratados con la curva y valores de E. coli en el filete sin tratamiento, podemos notar que la carga del FCST es superior a la de los filetes tratados desde el inicio, lo que indica que las barreras si poseen acción conservadora. Se encontraron diferencias estadísticas significativas (p-value < 0.001) entre los resultados obtenidos de crecimiento de E. coli en los filetes tratados y el FCST, con lo que se corrobora que al someter a la bacteria a condiciones ambientales desfavorables aumenta su tiempo de generación (TG) y la duración de la fase de latencia (DFL), como se puede notar en la tabla 18 según resultados predichos por el modelo PMP, (8).

TABLA 18

DATOS DE a_w, TG Y DFL POR EL MODELO PMP AL USAR LOS PARÁMETROS Temperatura, pH y %NaCl

Tratamiento	a_w predicha	DFL (hr)	TG (hr)
1	0,991	4,20	0,80
2	0,985	4,70	0,90
3	0,985	4,40	0,80
4	0,987	4,10	0,80
FCST	0,997	1,90	0,40

Con respecto al efecto de los tratamientos sobre la carga de E. coli inoculada en los filetes, según una prueba ANOVA con un p-value de 0.762, no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

3.2 Pruebas sensoriales

La realización de esta evaluación sensorial fue con el objeto de conocer la opinión del consumidor en cuanto al sabor de los filetes de corvina tratados con las soluciones osmóticas señaladas en la tabla 13. Los resultados del análisis de varianza indican con un nivel de confianza del 95%, que no existe diferencia significativa entre las calificaciones asignadas a los filetes, es decir que los distintos sabores impartidos por los tratamientos a los filetes tuvieron la misma acogida o aceptación por parte de los panelistas, ver tabla 19, (3).

TABLA 19

CALIFICACIÓN DADA A LOS FILETES DE CORVINA TRATADOS CON LAS SOLUCIONES OSMÓTICAS SELECCIONADAS

# de Panelistas	Promedio			
	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
1	6	7,5	7	4,5
2	6	5,5	8	7,5
3	8	7	5,5	7
4	5	8	4,5	5
5	7,5	5,5	7	3,5
6	8	7	5,5	7
7	6	8	8	9
8	5	5,5	6,5	8
9	5	8,5	5,5	6
10	7,5	6,5	8	7,5
11	4	7	5	6,5
12	6	5	7	6,5
Suma	74	81	77,5	78

3.3 Pruebas Microbiológicas

Los resultados de los análisis microbiológicos realizados al pescado fresco indican que la materia prima por lo general presenta una carga inicial de bacterias coliformes (tabla 20); lo que indica que en los mercados de expendio popular no se maneja normas de higiene al manipular los alimentos frescos perecibles, lo que señala una fuente de peligro potencial para la salud. Por otro lado vemos que no siempre se encuentra carga de E. coli en el pescado fresco, pero es posible encontrar una carga menor, igual o incluso mayor de 1.8 Log10(ufc/g), lo que nos indica que por seguridad siempre debemos aplicar algún tratamiento seguro de conservación a los alimentos

altamente perecibles comprados en estos centros si es que no van a ser consumidos inmediatamente luego de una preparación adecuada.

TABLA 20

CARGA MICROBIANA INICIAL EN CORVINA FRESCA

Semana de análisis	ufc/g	
	E. coli	Coliformes
1	0	770
2	220	1.760
3	30	2.390
4	0	610
Promedio	63	1.383
Log10 (ufc/g)	1,80	3,14

3.4 Comparación de Modelos Predictivos

Modelos Predictivos vs Datos reales

Las tablas 17, 21, 22, 23, los Apéndices M, N, O, P y la figura 3.1 muestran las diferencias entre los datos predichos (ufc/ml ó g de E. coli) por los modelos GP y PMP cuando se ingresan los parámetros: temperatura, pH y %NaCl y cuando se ingresan los parámetros: temperatura, pH y a_w y la comparación entre estos datos con los datos reales. Las diferencias en estas predicciones podrían estar asociadas al cálculo de la a_w realizada por los modelos, ya que estos calculan a_w a través de una ecuación dependiente únicamente de la concentración de NaCl ignorando otros componentes que también modifican el valor de a_w del alimento. Ingresar en los modelos la

concentración de NaCl medida en los filetes tratados calcula valores de a_w mayores a los reales (Tabla 18), debido a que otros componentes como por ejemplo sacarosa, no se incluyen en el cálculo. Por otra parte, si se utilizan los valores de a_w medidos en los filetes, estos calculan una concentración de NaCl mayor a la medida en los filetes tratados, lo que hace que los modelos simulen condiciones de crecimiento mas adversas de lo real, esto se debe a que el NaCl tiene un coeficiente de difusión mayor que la sacarosa y una impregnación mayor en los tejidos animales, así como mayores efectos antimicrobianos (38).

Cuando se ingresó el valor de a_w en los modelos predictivos, únicamente para las condiciones del filete tratado con el tratamiento 3 y el FCST se produjeron respuestas estadísticamente similares a las reales en ambos modelos (Tabla 21). Esta respuesta podría estar asociada a que el tratamiento 3 contenía acido acético en lugar de acido cítrico como agente reductor de pH, lo que proporcionó condiciones más adversas de crecimiento para la bacteria, y en lo que respecta a las predicciones a las condiciones del FCST se ajustan a lo real debido a que a estas condiciones la bacteria no tiene ninguna restricción para su crecimiento normal. Las demás predicciones en los dos modelos bajo las condiciones de los otros

tratamientos usando los parámetros de temperatura, pH y a_w no se ajustan con los datos reales, ver tabla 21, (Apéndices M, O y Q).

TABLA 21

VALORES DE P-VALUE DE COMPARACIONES ENTRE DATOS REALES Y PREDICHOS AL USAR LOS PARÁMETROS Temperatura, pH y a_w EN LOS MODELOS GP Y PMP

Datos Reales/predichos	p-value
T1/GP1	0,0950
T1/PMP1	0,0874
T2/GP2	0,0449
T2/PMP2	0,0699
T3/GP3	0,2509
T3/PMP3	0,1781
T4/GP4	0,0427
T4/PMP4	0,0656
$FCST/GP_{FCST}$	0,1021
$FCST/PMP_{FCST}$	0,2200

Cuando se usan los parámetros temperatura, pH y %NaCl los modelos GP y PMP predicen satisfactoriamente el crecimiento microbiano de E. coli a todas la condiciones dadas por los cuatro tratamientos en los filetes incluyendo a las condiciones del FCST, ver tabla 22, (Apéndices N, P y R). Puesto que no se evaluaron probabilidades de error β, no es posible declarar que la falta de diferencias entre los modelos predictivos y nuestros resultados empíricos implica que estos modelos efectivamente predicen el crecimiento microbiano bajo las condiciones evaluadas. Nuevos estudios incluyendo mayor número de repeticiones son necesarios

para establecer la idoneidad de los modelos para predecir crecimiento microbiano bajo condiciones particulares de conservación.

TABLA 22

VALORES DE P-VALUE DE COMPARACIONES ENTRE DATOS REALES Y PREDICTIVOS AL USAR LOS PARÁMETROS Temperatura, pH y %NaCl EN LOS MODELOS GP Y PMP

Datos Reales/predichos	p-value
T1/GP1	0,3961
T1/PMP1	0,1318
T2/GP2	0,1598
T2/PMP2	0,1545
T3/GP3	0,1821
T3/PMP3	0,1268
T4/GP4	0,4760
T4/PMP4	0,3769
$FCST/GP_{FCST}$	0,1226
$FCST/PMP_{FCST}$	0,2444

No existen diferencias estadísticas entre las predicciones realizadas por el modelo Growth Predictor y el modelo Pathogen Modeling Program, ver tabla 23.

TABLA 23

VALORES DE P-VALUE DE COMPARACIONES DE LOS DATOS PREDICHOS POR LOS MODELOS GP Y PMP

GP/PMP	p-value	
	%NaCl	a_w
GP1/PMP1	0,1503	0,1562
GP2/PMP2	0,5633	0,2340
GP3/PMP3	0,2533	0,1446
GP4/PMP4	0,3132	0,1294
GP_{FCST}/ PMP_{FCST}	0,162	0,2017

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones:

De los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. Los cuatro tratamientos estudiados en esta investigación retardan el crecimiento de E. coli, existiendo una diferencia mínima promedio en la densidad poblacional de 0.82 $\log_{10}$ (ufc/g) en la última observación realizada a las 21.55 horas y una máxima promedio de densidad poblacional de 3.42 $\log_{10}$ (ufc/g) a las 5.13 horas de análisis entre los filetes tratados y el blanco.

2. A pesar de no existir diferencias estadísticas significativas entre los 4 tratamientos, el único tratamiento en que se utilizó ácido acético para reducir el pH fue el que retardó por mas tiempo el crecimiento de E. coli, efecto que probablemente se debe a la fracción no disociada de este ácido, con lo que se demuestra que no sólo el pH alcanzado en el

alimento tiene efecto sobre la bacteria, sino también el tipo de ácido utilizado.

3. Los valores predichos por los modelos predictivos GP y PMP de crecimiento de E. coli a las condiciones de pH, temperatura y %NaCl evaluadas en este trabajo se ajustan a los valores observados. En cambio ninguno de los dos modelos predictivos se ajustan al usar los parámetros pH, temperatura y a_w para las predicciones, debido a que estos modelos basan sus estudios en el efecto del porcentaje de NaCl y no en la medida misma de a_w.

Recomendaciones:

1. Es importante que la industria de alimentos estudie la alternativa de usar modelos predictivos microbiológicos como una herramienta de trabajo en las área de microbiología y desarrollo de productos, ya que de ajustarse un modelo predictivo a sus condiciones de trabajo esto le significaría a la industria ahorro de tiempo y recursos, no obstante esto no sustituye que al menos periódicamente se realicen análisis exhaustivos tradicionales que verifiquen la consistencia de los modelos.

2. Los modelos predictivos deberían incluir dentro de sus parámetros de control también el porcentaje de acidez y el tipo de ácido utilizado, así de esta manera se evaluaría la mayoría de factores que afectan de alguna manera al microorganismo en control.