



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MODELOS MATEMÁTICOS PREDICTIVOS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO PARA ESTIMACIÓN DE LA VIDA ÚTIL EN JAMÓN LONCHADO EMPACADO AL VACÍO

Gustavo Andrés Buelvas Salgado

Universidad Nacional de Colombia sede Medellín
Facultad de Ciencias Agrarias
Departamento de Ingeniería y Alimentos
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos
Medellín, Colombia
2013

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MODELOS MATEMÁTICOS PREDICTIVOS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO PARA ESTIMACIÓN DE LA VIDA ÚTIL EN JAMÓN LONCHADO EMPACADO AL VACÍO

Gustavo Andrés Buelvas Salgado

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director (a):

Ph.D. Jairo Humberto Patiño Gómez

Codirector (a):

MSc. Margarita Núñez de Villavicencio

Línea de Investigación:

Calidad e inocuidad de los alimentos

Universidad Nacional de Colombia sede Medellín
Facultad de Ciencias Agrarias
Departamento de Ingeniería y Alimentos
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos
Medellín, Colombia
2013

A Dios y mi familia

*Por el acompañamiento y los esfuerzos
realizados para completar este proyecto.*

Gustavo Andrés Buevas Salgado.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria (INTAL) en Medellín- Antioquia y el Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia (IIIA) en La Habana - Cuba, por direccionar, coordinar y facilitar los recursos e instalaciones para ejecutar esta investigación.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. Las Bacterias ácido lácticas (BAL) han sido consideradas como las responsables de deterioros como el abombamiento de los empaques, la sinéresis, los cambios de color, el limo superficial y la aparición de lechosis en Jamones cocidos lonchados empacados al vacío (JCLEV), defectos de calidad que pueden causar rechazo por parte de los consumidores. **OBJETIVOS.** Este trabajo tuvo como objetivos primeramente evaluar el efecto de las condiciones de almacenamiento en refrigeración de tiendas de barrio, mini mercados y supermercados sobre la calidad fisicoquímica y el deterioro sensorial visible de JCLEV; producto del metabolismo de bacterias ácido lácticas y en segunda instancia modelar el crecimiento del *L. mesenteroides* en función de la temperatura de almacenamiento (refrigeración) y la concentración de sal (NaCl) en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis para predecir la vida útil de JCLEV. **MÉTODOS.** Para el desarrollo de esta investigación se evaluaron 6 marcas comerciales de JCLEV teniendo en cuenta dos tiempos de muestreo, 25 días antes de fecha de vencimiento (FV) y aproximadamente 15 días después de FV, para este último los resultados se estiman para un total de 45 días teniendo en cuenta la fecha de elaboración del producto, evaluando los criterios microbiológicos de calidad (NTC 1325, 2008), los recuentos de BAL y los parámetros fisicoquímicos (pH, acidez, a_w , humedad, cloruros). Una vez realizados los muestreos respectivos se clasificaron macroscópicamente y microscópicamente las unidades formadoras de colonias (UFC/g) de BAL y se realizaron pruebas bioquímicas de confirmación y tipificación para determinar el género y especie de la especie predominante, para luego realizar la modelación. El desarrollo de los modelos predictivos se llevó a cabo empleando caldo TSB, al cual se le adicionó concentraciones de 1,5 a 3,5% de NaCl. Luego fueron sellados con una capa de \pm 1cm de parafina. Para los tratamientos de anaerobios se colocaron los tubos en jarras de anaerobiosis; inmediatamente se incubaron a $2\pm 1^\circ\text{C}$, $8\pm 1^\circ\text{C}$ y $14\pm 1^\circ\text{C}$. El efecto combinado de los factores sobre el crecimiento del *L. mesenteroides* se determinó a través de un diseño de superficie de respuesta D-óptimo calculando los parámetros cinéticos de crecimiento ajustando a los modelos de Gompertz y Logístico sigmoideal que luego se emplearon para validar en productos cárnicos (JCLEV) el modelo secundario desarrollado. Posteriormente

se procedió a estimar el tiempo de vida útil e igualmente se comparó la exactitud de las estimaciones. Los resultados fueron analizados mediante modelación no lineal para los modelos primarios y de superficie de respuesta para los modelos secundarios, a través del paquete estadístico SPSS y Desing Expert 8.0. **RESULTADOS.** Los JCLEV a tiempo t_0 (25 días antes de FV) presentaron una acidez entre 0,41 a 0,53 g ácido láctico/g de muestra, al igual que recuento de BAL en todas las marcas. Empleando el criterio propuesto por otros autores, que afirman que un producto cárnico cocido se encuentra alterado por acidificación cuando la cantidad de ácido láctico excede de 3-4 mg/g o pH ($\leq 5,8$); se encontró que dichos jamones estaban fisicoquímicamente deteriorados por acidificación a t_0 , sin cambios sensoriales visibles. Además, se identificó al *Leuconostoc mesenteroides* como el microorganismo predominante de los JCLEV, con el cual se desarrolló y validó un modelo predictivo de la velocidad de crecimiento capaz de predecir el incremento de la población microbiana así mismo realizar estimaciones sobre la vida útil. En cuanto a la fase de adaptación los modelos presentaron dificultades para explicar el comportamiento de las células, por esto, las predicciones de este parámetro deben ser interpretadas con prudencia. **CONCLUSIÓN.** Debido a que los JCLEV no son productos fermentados, las BAL pueden ser empleadas como un indicativo del deterioro fisicoquímico, de la calidad de los procesos de elaboración y las inadecuadas condiciones de almacenamiento, que influyen negativamente sobre la estabilidad sensorial y fisicoquímica de los JCLEV. Además el empleo de la ecuación de Monod para realizar estimaciones de vida útil en función del incremento de la población microbiana alterante, es una herramienta que puede ser empleada en conjunto con el modelo secundario desarrollo del crecimiento de *L. mesenteroides*, para estimar cómo las condiciones de almacenamiento en refrigeración afectan la población microbiana, la calidad del producto y la vida útil de los JCLEV. Permitiendo mejorar la cadena de frío y las condiciones de almacenamiento, reduciendo de esta manera los costos para los industriales del sector cárnico.

Palabras claves: Microbiología predictiva, *Leuconostoc mesenteroides*, Jamón cocido lonchado empacado al vacío.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	VII
TABLA DE CONTENIDO.....	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABLAS.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	15
1. CAPÍTULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1 Métodos de estimación de la vida útil de los alimentos	21
1.2 Productos cárnicos	26
1.2.1 Características del Jamón cocido	27
1.3 Legislación Colombiana para productos cárnicos cocidos (Jamón).....	27
1.4 Métodos de conservación de productos cárnicos cocidos.....	28
1.4.1 Conservantes en productos cárnicos cocidos	28
1.4.1.1 La sal.	28
1.5 Calidad, vías de deterioro y alteraciones del jamón	29
1.5.1 Microorganismos alterantes en jamón	30
1.5.1.1 Bacterias ácido lácticas	31
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	34
1.6 Microbiología predictiva.....	35
1.6.1 Clasificación de modelos	36
1.6.1.1 Modelación de curvas de crecimiento y determinación de los parámetros cinéticos (modelos primarios).....	37
Descripción de modelos primarios.....	38
1.6.1.2 Modelación del efecto de los factores intrínsecos y extrínsecos en el crecimiento del microorganismo. (Modelos secundarios).....	41
1.6.2 Desarrollo de modelos predictivos del crecimiento microbiano	44
Raíz del error cuadrático medio (RMSE).	48
Coeficiente de determinación o de regresión múltiple (R^2).....	48
Factor de sesgo ("Bias factor" B_f) y exactitud (accuracy factor A_f).	49
1.6.3 Limitaciones de los modelos predictivos.....	50
1.7 Aplicaciones de la microbiología predictiva en la industria de alimentos.....	51
2. CAPÍTULO 2: Efecto de la cadena de frío sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, la calidad fisicoquímica y la alteración de jamones cocidos lonchados empacados al vacío.....	53
Resumen.....	53
Introducción	55
Materiales y métodos	57
Resultados.....	60

Discusión	63
Conclusiones	66
Referencias bibliográficas	67
3. CAPÍTULO 3: Desarrollo de un modelo predictivo del crecimiento <i>Leuconostoc mesenteroides</i> para estimar vida útil de jamones cocidos lonchados empacados al vacío	71
Resumen	71
Introducción	73
Materiales y métodos	74
Resultados y discusión	80
Discusión	91
Conclusiones	93
Agradecimientos	95
Referencias Bibliográficas	95
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	100
4.1 CONCLUSIONES	100
4.2 RECOMENDACIONES	102
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
6. ANEXOS	113
6.1 Jamones cocidos lonchados empacados al vacío 25 días antes de FV.	113
6.2 Jamones cocidos lonchados empacados al vacío 15 días después de FV.	114
6.3 Identificación macroscópica	114
6.4 Identificación microscópica	115
6.5 Pruebas bioquímicas de identificación.	116
6.6 Procedimiento experimental para la validación del modelo secundario.	117
6.7 Artículo aprobado para publicación Revista LASALLISTA de investigación.	118
6.8 Constancia del sometimiento a la revista VITAE el Artículo 2.	120
6.9 Instrucciones para los autores Revista VITAE.	121

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Capítulo 1.	
Figura 1: Ciclo para desarrollar modelos microbiológicos predictivos.....	44
Figura 2: muestra A) ajuste del modelo de Gompertz sobre el crecimiento de <i>Aeromonas hydrophila</i> en diferentes concentraciones de sal. B) parámetros cinéticos de crecimiento estimado con el modelo logístico para una condición experimental.	46
 Capítulo 3.	
Figura 1: Comportamiento de los valores medios del crecimiento de <i>L. mesenteroides</i> a diferentes condiciones de almacenamiento in-vitro ($2\pm 1^{\circ}\text{C}$, $8\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $14\pm 1^{\circ}\text{C}$) y concentración de sales en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, durante el tiempo..	81
Figura 2: Superficies de respuesta estimadas para los parámetros de la ecuación de Gompertz (A: μ_{max} Atmósfera Aerobia, B: μ_{max} Atmósfera Anaerobia, C: LDP Atmósfera Aerobia y D: Atmósfera Anaerobia).....	86
Figura 3: Validación <i>in-vivo</i> del modelo predictivo de crecimiento de (Gompertz) para <i>L. mesenteroides</i> en JCLEV. (A. 4°C -Aerobio, B. 4°C - Anaerobio, C. 10°C Aerobio, D. 10°C Anaerobio). Siendo los puntos rellenos los valores observados; la línea continua, los valores predichos y las líneas discontinuas, los intervalos de confianza del 95% inferior y superior del modelo.	89

LISTA DE TABLAS

Pág.

Capítulo 1.

Tabla 1. Características de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*.....32

Tabla 2: Aplicaciones de la microbiología predictiva.51

Capítulo 2.

Tabla 1: Valoración de los requisitos microbiológicos para jamones cocidos lonchados empacados al vacío 25 días antes de Fecha de vencimiento – NTC 1325 2008.60

Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas y recuento de BAL de seis marcas comerciales de JCLEV (M1, M2, ..., M6) obtenidas en supermercados (SM), mini mercados (MM) y tiendas de barrio (TB) por un periodo de almacenamiento de 25 días antes de FV y 15 días después de FV (45 días a partir de fecha de fabricación).....62

Capítulo 3.

Tabla 1: Detalles bioquímicos de la tipificación de BAL aislado de JCLEV a través del test VITEK.80

Tabla 2: Índices estadísticos de modelos primarios estimados ajustados a los datos experimentales.82

Tabla 3: Cálculo de los parámetros cinéticos para A) modelo de Gompertz B) modelo Logístico sigmoidal que describen el crecimiento de *L. mesenteroides* para cada tratamiento.....83

Tabla 4: Coeficientes significativos de los efectos principales y las interacciones de los modelos de regresión estimados.....85

Tabla 5: Valores observados y predichos para μ_{max} y los intervalos de confianza para los ajustes realizados con el modelo de Gompertz.....88

Tabla 6: Índice estadísticos de la precisión del modelo secundario para predecir el crecimiento del *L. mesenteroides*. En JCLEV89

Tabla 7: Estimación de la vida útil para los JCLEV.....90

INTRODUCCIÓN

La vida útil está definida como el periodo de tiempo durante el cual los productos alimenticios son: a) inocuos b) mantienen sus características sensoriales, microbiológicas y fisicoquímicas c) cumplen con la declaración nutricional en las condiciones de almacenamiento recomendadas. En general, los cambios microbiológicos son de primera importancia porque acortan la vida útil de los productos (Latiful, 2009).

En el caso de productos cárnicos procesados y almacenados en refrigeración, a nivel mundial la mayoría de las empresas manejan su vida útil por los cambio en los recuentos de los grupos microbianos mediante un procedimiento costoso, no solo económica sino tecnológicamente, por lo que en los últimos años los industriales del sector cárnico han enfocado sus esfuerzo en el desarrollo de ecuaciones matemáticas que les permitan predecir el comportamiento de los recuentos microbianos reduciendo costos y tiempos en la estimación de la vida útil (Bruselas, Moya, Beldarraín, y Francisco, 2007).

En Colombia, existen aproximadamente 314 empresas nacionales, dedicadas a la producción de cárnicos procesados, donde solo el jamón lonchado representó en ventas 28 millones de dólares para el año 2002 ("Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en Bogotá. El sector de los procesados cárnicos en Colombia," 2005 Feb).

El jamón lonchado encuentra condicionada su vida útil por los efectos acumulativos de la temperatura, durante el manejo de las materias primas, los procesos productivos, las etapas de almacenamiento y transporte requeridas para su comercialización. Los abusos de temperatura se reflejan en serios problemas de estabilidad microbiológica (Tirado, Paredes, Velázquez, y Torres, 2005). Este sector ha presentado grandes pérdidas económicas, que son ocasionadas por microorganismos resistentes al proceso térmico o aquellos que pueden penetrar secundariamente durante la manipulación. Los microorganismos presentes son capaces de replicarse a grandes velocidades en condiciones de refrigeración, presentando deterioros como el abombamiento de los

empaques, acompañado de sinéresis, cambios de color, limo superficial y aparición de lechosis (Ossa, Coral, y Vanegas, 2010).

Por lo tanto, la cadena de frío es una de las principales preocupaciones de la industria cárnica, ya que los sistemas de producción, canales de distribución y zonas de almacenamiento tienen que mantener un rango de temperatura entre -1 y 2°C, sin superar los 5°C (Simpson, Almonacid, Acevedo, y Cortés, 2003). Esto para evitar disminuir la vida útil de los jamones cocidos lonchados y otros productos cárnicos refrigerados, por bacterias psicrótrofas (Tirado *et al.*, 2005).

Desafortunadamente en Colombia al igual que otros países latinoamericanos, se encuentra alejada de esta realidad, porque los estantes de refrigeración son generalmente programados a 7 y 10°C y en algunos sectores de la población son apagados por la noche. Sin embargo las cadenas de supermercados han implementado tecnologías, “pasillos fríos” para disminuir el diferencial de temperatura entre el anaquel y el medio ambiente, pero muchos de estos se encuentran frecuentemente por encima de los 15°C. Situación que inquieta a los industriales del sector cárnico y al consumidor.

Los jamones cocidos lonchados empacados al vacío, elaborados con carne de cerdo, como es el caso de esta investigación, presentan mayor riesgo de deterioro microbiológico, ya que, la carne que se emplea por lo general es pálida, blanda y exudativa (PSE), problema crítico de calidad, debido a que estos músculos durante su manipulación y almacenamiento pierden de un 7 a un 10% de peso, y su textura blanda y color pálido, que se transmiten al producto final (Chorné, 1996). Por otro parte, el consumidor detecta fácilmente la presencia de carne PSE en los jamones, ya que destaca la presencia de manchas pálidas y blandas con una excesiva liberación de agua entre el producto y el envase (García Macías, Ruis Carrión, Ortega Gutiérrez, y Núñez Gonzales, 2000).

Durante el almacenamiento el problema anterior ha sido uno de los inconvenientes más comunes, ya que, promueve la proliferación de los microorganismos presentes afectando la calidad microbiológica y a su vez alterando al producto final (Montoya, Restrepo, y Suárez, 2010), es decir, comúnmente en la medida que aumenta población microbiana se

incrementa la sinéresis, la adhesividad y la dureza instrumental, afectando las características sensoriales y por ende acortando el periodo vida útil (González, Suárez, y Martínez, 2009).

Para corregir el problema anterior los industriales han empleado gran cantidad de aditivos, uno de los mayormente empleados son los carragenatos o carrageninas, que cumplen funciones tecnológicas como, producir geles estables a temperatura ambiente, estabilizar emulsiones, también ayuda evitar la sinéresis. Sin embargo, hasta el momento, no ha sido fácil encontrar una sustancia capaz de dar una solución completamente satisfactoria (Montoya *et al.*, 2010).

Además de la calidad de la carne, las malas prácticas de manufactura propician la contaminación cruzada con bacterias ácido lácticas (BAL) que son otro potenciador de la disminución de la vida útil de jamones cocidos lonchados empacados al vacío (JCLEV), sin embargo, la legislación colombiana no contempla a este grupo de microorganismo como deteriorantes de este tipo de producto (NTC-1325, 2008), debido a que son microflora natural y dominante de muchos productos cárnicos almacenados en frío (Tirado *et al.*, 2005). Considerados en ocasiones como flora benéfica ya que son productores de sustancias antimicrobianas que causan un efecto inhibitor contra bacterias patógenas (Vásquez, Suárez, y Zapata, 2009).

Sin embargo en la mayoría de los casos los *Lactobacillus* y otras BAL, en los JCLEV son un indicativo de malas prácticas de manufactura, contaminación de equipos y/o materias primas entre otras, su presencia influye en la vida de anaquel de este tipo de productos, porque son bacterias saprófitas que originan alteración en las propiedades organolépticas de los jamones (Espinoza, Leija, Amaya, Vela, y Rodríguez).

Investigaciones recientes han mostrado a *Lactobacillus sake* y *Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides*, como los principales microorganismos responsables de la alteración a 4°C y 12°C, debido a la recontaminación en la sala de lonchado Ossa *et al.* (2010).

En la actualidad estos esfuerzos continúan ya que se siguen presentando defectos de calidad, como es el caso del abombamiento de carne y jamones de cerdo empacados a vacío estudio realizado por Ossa *et al.* (2010), quien encontró que en etapas posteriores al procesado térmico, el jamón se encuentra expuesto a contaminación cruzada con bacterias deteriorantes formadoras de películas como *Lactobacillus spp*, entrando en contacto con el producto terminado y esto, sumado con los problemas mencionados de la cadena de frío ocasionan el deterioro por abombamiento del empaque o *Blown pack*, fenómeno atribuido a una recontaminación con BAL transmitidas por el aire, siendo las principales fuentes de contaminación los manipuladores y las superficies de trabajo en contacto con los alimentos.

No obstante las condiciones mencionadas son las únicas que acortan el periodo de vida útil de los jamones cocidos lonchados empacados al vacío ya que la permeabilidad al oxígeno del material de empaque, la presencia de nitritos (150mg/kg) y las bajas temperaturas de almacenamiento favorecen el crecimiento de BAL psicrófilas como *Leuconostoc spp* y *Lactobacillus spp*. las que provocan un descenso del pH que limita el crecimiento de otras poblaciones microbianas, convirtiendo a este grupo de microorganismos en flora dominante, incrementando las posibilidades de deterioro de los jamones lonchados empacados al vacío (Matagaras, Dronis, Vaidanis, y Metaxopoukos, 2006).

La utilización de modelos predictivos para predecir el comportamiento de microorganismos frente a factores intrínsecos y extrínsecos ha sido más estudiada en el caso de los patógenos, sin embargo, son más reducidas las investigaciones que han desarrollado modelos predictivos referentes al comportamiento de microorganismo alterantes en alimentos (Wijtzes, Rombouts, Kant- Muermans, Van't Riet, y Zwietering, 2001) entre de estos estudios encontramos el realizado por Rodríguez (2003) en el que evaluó el comportamiento del crecimiento de alterantes como *Leuconostoc mesenteroides*.

Este proyecto presenta como objetivos primeramente evaluar el efecto de las condiciones de almacenamiento en refrigeración de tiendas de barrio, mini mercados y supermercados

sobre la calidad fisicoquímica y el deterioro sensorial visible de JCLEV; producto del metabolismo de bacterias ácido lácticas y en segunda instancia modelar el crecimiento del *L. mesenteroides* en función de la temperatura de almacenamiento (refrigeración) y la concentración de sal (NaCL) en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis para predecir la vida útil de JCLEV.

Dentro de las limitaciones encontradas en el crecimiento *in vitro* de las BAL, se encuentra que se desprecian las interacciones con otros microorganismos, la competencia entre ellos por los nutrientes y demás reacciones metabólicas (Rodríguez, 2003).

Para el desarrollo de este proyecto se evaluaron las condiciones *in vitro* de crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*, con la finalidad de desarrollar una ecuación matemática para estimar los parámetros cinéticos de crecimiento de los microorganismo, que permita predecir el comportamiento de los recuentos de bacterias ácido lácticas (*Leuconostoc mesenteroides*) en las estanterías, y de esta manera relacionarlo con la vida útil de los JCLEV, lo que representará un avance para las empresas del sector cárnico en Colombia.

1. CAPÍTULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este capítulo se contextualiza la investigación, a través de una detallada búsqueda bibliográfica, en su mayoría soportada en libros y artículos científicos de revistas de circulación internacional. Se presentan generalidades de los productos cárnicos cocidos lonchados empacados al vacío (Jamones), la legislación colombiana y principalmente, argumenta el interrogante sobre la manera cómo los microorganismos alteran estos productos. Además se explica cómo las ecuaciones matemáticas son empleadas para predecir el comportamiento de los microorganismos alterantes en las condiciones de almacenamiento, como un aporte importante en la industria de alimentos.

Este capítulo pretende orientar a la comunidad académica y científica, interesada en precisar dentro de los diferentes métodos de estimación de la vida útil de los alimentos, cuales producen un mayor impacto en la industria de productos cárnicos cocidos lonchados empacados al vacío. Expresado de manera clara, sencilla, pero cuidando el rigor científico de los temas, procurando que sea provechoso e interesante para los lectores.

1.1 Métodos de estimación de la vida útil de los alimentos

La vida útil de un alimento fue definida por Labuza en 1994, como “el periodo de tiempo, después de elaborado y envasado el alimento y almacenado en las condiciones recomendadas, en que el producto sigue siendo seguro y apropiado para el consumo” definición ratificada por Herrera, (2011). Sin embargo, Man, (2000) amplió el concepto, definiendo la vida útil de un alimento como “el periodo de tiempo durante el cual esté es: A) Inocuo. B) Conserva sus características fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas. C) Cumple con los requisitos nutricionales declarados en la etiqueta del producto bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas”.

Los alimentos pueden ser clasificados de acuerdo a su naturaleza en productos “*perecederos*” con vida útil muy corta, “*semiperecederos*” con una vida útil corta o media y los “*poco perecederos*” con una vida útil de media a muy larga (Nuñez de villavicencio, 2011 y Gordon L, 2009).

Los productos perecederos presentan una durabilidad aproximada de 7 días bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas; las reacciones microbiológicas y enzimáticas son principalmente las causantes de la pérdida de calidad de este tipo de productos. Los alimentos pertenecientes a esta categoría son almacenados en condiciones de congelación o refrigeración entre -12°C a -18°C o 0°C y 7°C respectivamente (Gordon L, 2009).

Los alimentos que presentan una vida útil entre los 30 y 90 días son denominados alimentos semiperecederos, los cuales han sido sometidos a tratamientos como la pasteurización, el ahumado o fermentaciones entre otros, que les proporciona cierta tolerancia a las condiciones de almacenamiento y a los abusos en los sistemas de distribución. Dentro de este grupo se encuentran algunos quesos, huevos, la leche pasteurizada, el jamón ahumado y ciertos vegetales fermentados (Gordon L, 2009).

Finalmente, se encuentran los alimentos de larga vida útil o “*poco perecederos*”, los cuales tienen una vida útil desde varios meses hasta años, permaneciendo estables a temperatura ambiente. Dentro de este grupo se ubican los alimentos esterilizados, deshidratados, entre otros, además de algunos productos naturales como los granos de cereales, nueces y productos de confitería (Gordon L, 2009).

En general, la vida útil de los alimentos está condicionada por tres factores principales que son: *A*). las características del producto, incluyendo parámetros de formulación y procesamiento (*factores intrínsecos*). *B*). Medio ambiente al que se expone el producto durante su distribución y almacenamiento (*factores extrínsecos*). *C*) las propiedades del empaque (Gordon L, 2009). Dichos factores potencializan la interacción entre las reacciones fisicoquímicas, microbiológicas y enzimáticas lo que dificulta la estimación de vida útil de los alimentos (Hough y Fiszman, 2005).

Los factores intrínsecos y extrínsecos que influyen en la vida útil de los productos fueron clasificados por el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (IFITA) en 1993, referenciados por (Kilcast y Subramaniam, 2000).

Siendo los factores intrínsecos aquellas propiedades del producto final, entre las que se encuentran la actividad de agua (a_w), el pH y el valor total de la acidez, el potencial redox, el oxígeno disponible, los nutrientes, la flora microbiana natural, así como los microorganismos sobrevivientes a las metodologías de conservación y los conservantes como la sal y los nitritos o aquellos de carácter natural son incluidos en la formulación.

Por su parte, los factores extrínsecos son aquellos no relacionados con el producto pero con capacidad para afectar la calidad del mismo. Entre los que se encuentran los perfiles de tiempo y temperatura durante el proceso de elaboración del producto, el control de la temperatura durante el almacenamiento y distribución, la humedad relativa durante la elaboración del producto, distribución y almacenamiento. Así como los recuentos microbiológicos ambientales de las instalaciones, entre otros.

La interacción entre los factores extrínsecos e intrínsecos inhibe o promueve las reacciones químicas o biológicas, las cuales influyen sobre la calidad y seguridad de los alimentos, dichas reacciones se denominan “*vías de deterioro*”, las cuales son condicionadas por la naturaleza del alimento, el proceso al cual fue sometido y al procedimiento de empacado (Rondón, Ortega, y Pacheco Delahaye, 2004 y Hough y Fiszman, 2005).

Las principales vías de deterioro de los alimentos “*percederos y semipercederos*” son la degradación enzimática y la contaminación microbiológica (crecimiento de bacterias, hongos y levaduras) que ocurren antes de los cambios físicos y químicos. Algunos microorganismos como las bacterias ácido lácticas, producen como parte de su metabolismo ácidos y gases; mientras que otros producen sabores y/o olores extraños, o separación de fases, afectando negativamente la calidad del producto final (Nuñez de Villavicencio, 2011).

En el caso puntual de la vida útil de alimentos perecederos como la carne y los productos cárnicos, su estabilidad se ve afectada principalmente por la pérdida de calidad sensorial causada por los microorganismos y el crecimiento de patógenos a niveles detectables (Gordon L, 2009., Toldrá, 2009., Doyle, 2009., McDonald y Sun, 1999., y Tirado, Paredes, Velázquez, y Torres, 2005).

Uno de los factores que potencializa la reducción del tiempo de vida útil de los alimentos son los abusos de temperatura durante el proceso de elaboración, empaqueo y almacenamiento de la carne y productos cárnicos, incrementando la posibilidad de adquirir enfermedades transmitidas por alimentos o intoxicaciones, causadas por el incremento de microorganismo patógenos (Tirado *et al.*, 2005).

Sin embargo, los procesos térmicos, agentes antimicrobianos y temperaturas de refrigeración utilizadas en la elaboración y almacenamiento de los productos cárnicos incrementan su vida útil debido a que disminuyen la carga y variedad inicial de microorganismos patógenos como *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*; *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus* en productos pasteurizados y refrigerados; y *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* O157:H7 en productos cárnicos, pescados y mariscos refrigerados. (Toldrá, 2009).

Por su parte, en los procesos de empaqueo de los productos cárnicos se presentan riesgos de contaminación cruzada, principalmente de microorganismo alterantes causantes de pérdida de calidad durante el almacenamiento de los productos (Gordon L, 2009).

Los microorganismos pertenecientes a este grupo en su mayoría son bacterias psicotrópicas y capaces de crecer lentamente entre los 0 y 4°C; sin embargo su crecimiento se acelera cuando se presenta un incremento de temperatura en algún punto de la cadena de frío (Tirado *et al.*, 2005). Dichos microorganismos producen sabores, olores y apariencia desagradable en el producto final (Doyle, 2009).

Otro factor que potencializa la reducción del tiempo de vida útil en los productos cárnicos es el empaque, por lo que su selección es esencial para prevenir o reducir los cambios microbiológicos, que traen como consecuencia deterioro físico y químico del producto final durante el almacenamiento. La selección del material de empaque se encuentra condicionada por el tipo de producto y la estabilidad deseada. En general, aquellos materiales que presentan una baja permeabilidad al vapor de agua, al oxígeno y CO₂, así como una buena resistencia mecánica reducen la posibilidad de que un alimento envasado ya estabilizado, se altere (Nuñez de villavicencio, 2011).

Existen diferentes métodos para determinar la vida útil de los alimentos, teniendo en cuenta su naturaleza, las principales vías de deterioro y los factores intrínsecos y extrínsecos que interactúan inhibiendo o potenciando las reacciones microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales que limitan el tiempo de estabilidad de los productos lo que puede ser determinado mediante la aplicación de modelos matemáticos (Gudmundsson y Kristbergsson, 2009).

Dicha estimación puede ser realizada en tiempo real o mediante métodos acelerados de estimación basados en métodos probabilísticos, determinísticos respectivamente y la modelación matemática del crecimiento microbiano (Nuñez de villavicencio, 2011).

El enfoque probabilístico se fundamenta en la aplicación de un modelo de probabilidad (distribución de tiempos de vida) en el que se supone que los tiempos de vida se distribuyen de acuerdo a una ley de probabilidad previamente seleccionada; Luego se estiman los parámetros de la distribución, con los que se puede inferir estadísticamente el tiempo de vida útil. Un ejemplo de las funciones de densidad de probabilidad más ampliamente utilizada es la distribución de Weibull (Koseki, Mizuno, y Yamamoto, 2007., Cardelli y Labuza, 2001., Hougha, Calle, Serrat, y Curia, 2007., Guerra, Lagazio, Manzocco, Barnaba, y Cappuccio, 2008., Sun, 2012).

Los métodos determinísticos utilizan modelos matemáticos cuyos parámetros se relacionan con los factores relacionados con la pérdida de calidad de los alimentos, fundamentalmente por la acción de microorganismos, el desarrollo de reacciones

químicas y enzimáticas conforme a la naturaleza del alimento y las interacciones del producto-ambiente-envase, entre las ecuaciones matemáticas más utilizadas se encuentra el modelo de Arrhenius (Robertson, 2000., Brugga Vila, 2008., Gudmundsson y Kristbergsson, 2009., Beldarraín, Nuñez de Villavicencio, Aloida Guerra, y Bruselas, 2012., Sun, 2012).

Finalmente, encontramos la microbiología predictiva la cual combina elementos de la microbiología, matemática y estadística para el desarrollo de modelos matemáticos que describan y predigan el comportamiento de los microorganismos bajo condiciones ambientales específicas (Brugga Vila, 2008., Gudmundsson y Kristbergsson, 2009). En el caso puntual de los productos cárnicos esta metodología ha sido ampliamente empleada ya que permite reducir costos, así como estimar el efecto de las condiciones de almacenamiento (*Factores extrínsecos e intrínsecos*), sobre la calidad e inocuidad del producto final. Como los estudios realizados por Beldarraín *et al.*, (2012) quienes estudiaron el comportamiento de *staphylococcus aureus* en hamburguesa; o los realizados por Dominguez y Schaffner, (2007) quienes Desarrollaron y validaron un modelo matemático para describir el crecimiento de *Pseudomonas spp.* en carne cruda de aves de corral. Así mismo Masana y Baranyi, (2000) describieron matemáticamente el crecimiento y no crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* en función de la actividad de agua y el pH para describir el deterioro de carne refrigerada empacada al vacío y en atmosfera modificada, entre otros estudios que enfatizan la importancia de los microorganismos en los productos cárnicos (McDonald y Sun, 1999., Shimoni y Labuza, 2000., T. A. McMeekin, 2007., Mcmeekin *et al.*, 2008., T. McMeekin, Olley, Ratkowsky, Corkrey, y Ross, 2013).

1.2 Productos cárnicos

Los productos cárnicos en Colombia son clasificados en tres categorías conforme al tratamiento térmico; encontrando a los productos procesados cocidos (jamón, salchicha, salchichón, entre otros), productos procesados enlatados (carne de diablo, entre otros) y los productos crudos, que a su vez se subdividen en frescos (hamburguesa, chorizo y salchicha frescas, entre otros) y crudos madurados (chorizo, salamis) (NTC 1325, 2008).

1.2.1 Características del Jamón cocido

El jamón cocido es un producto cárnico cocido, curado, listo para el consumo, debido a que está incluye dentro de su proceso de elaboración, sales de curado y un tratamiento térmico de pasteurización. Es igualmente es clasificado dentro de los alimentos embutidos escaldados de baja acidez (Ossa, Coral, y Vanegas, 2010).

El jamón, es elaborado con musculo, grasa o vísceras, provenientes de animales de abasto, enteros o troceados, con adición de sustancias de uso permitido y listo para el consumo. El cual dentro de su proceso industrial incluye etapas de manipulación, mezclado, embutido, cocción y moldeado o prensado (NTC 1325, 2008).

Entre los ingredientes más utilizados se encuentran las sales de curados (cloruro de sodio, los nitritos y nitratos) así como otros aditivos como el lactato sódico, ascorbato, especias y los fosfatos.

El tratamiento térmico del jamón y de los demás productos cárnicos cocidos se realiza por medio de vapor o agua caliente como medio de transferencia de calor, con la finalidad de garantizar 72°C en el punto frío o centro del alimento.

Generalmente, finalizado el tratamiento térmico, el jamón y otros productos cárnicos son lonchados y empacados al vacío o en atmosfera modificada, dicha etapa del proceso implica la manipulación de los alimentos, por tanto, estas labores han de realizarse en condiciones donde, se garantice la inocuidad y se disminuyan los riesgos de contaminación cruzada con microorganismos patógenos y alterantes.

1.3 Legislación Colombiana para productos cárnicos cocidos (Jamón).

La legislación Colombiana para los productos cárnicos cocidos (Jamón), establece parámetros microbiológicos para identificar su calidad; los rangos permisibles por tipo de microorganismo son: Coliformes totales (100 UFC/g), *Staphylococcus aureus* cuagulasa positivo (<100 UFC/g), *Listeria monocytogenes* (1/25 g), *Salmonella* (1/25 g), Esporas de *Clostridium* sulfito reductor (<10 UFC/g), *Escherichia coli* (<10 UFC/g) (NTC 1325, 2008).

1.4 Métodos de conservación de productos cárnicos cocidos

La conservación de los alimentos es posible realizarla aplicando diferentes métodos, entre los que se encuentran el empleo de bajas temperaturas, desecación, fermentación, curado, salazón, ahumado, liofilización como metodologías tradicionales (Restrepo Molina, Arango Mejía, Amézquita Campuzano, y Restrepo Digiammarco, 2001., Caballero Torres, 2008., Sun, 2012); sin embargo, en las últimas décadas se han implementado otros métodos como la irradiación, las altas presiones hidrostáticas e hidrodinámicas (Toldrá y Nollet, 2006); así como el uso de conservantes y aditivos (Tarté, 2009), bacteriocinas (Toldrá, 2001) y tecnologías de empacado (Michael, Grady, y Kerry, 2008., Gordon L, 2009) para garantizar la inocuidad de los alimentos, así como mejorar la calidad de los mismos. A continuación se especifican los métodos de conservación utilizados en la industria cárnica especificando en los utilizados en jamón cocido.

1.4.1 Conservantes en productos cárnicos cocidos

Entre los conservantes y aditivos más empleados en el proceso de elaboración de productos cárnicos cocidos curados se encuentra la sal, agentes curantes (nitritos y nitratos), los polifosfatos y acidulantes como el ácido ascórbico, el ascorbato de sodio, y el eritorbato de sodio (Restrepo Molina *et al.*, 2001., Tarté, 2009). A continuación se especifica la función de los conservantes y aditivos de mayor impacto en la inocuidad y la calidad del producto final.

1.4.1.1 La sal.

El cloruro de sodio (sal) es uno de los ingredientes más antiguos y comunes utilizados en la conservación de los productos cárnicos. Su uso ha generado preocupación a nivel mundial por el exceso de sodio en la dieta humana y se han implementado esfuerzos para reducir su consumo, Sin embargo según (Tarté, 2009) la sal es un ingrediente crítico que no puede ser eliminado de este tipo de producto.

El cloruro de sodio es un ingrediente multifuncional dentro de los productos cárnicos, debido a que, inhibe el crecimiento de los microorganismos, es capaz de reducir la actividad de agua de los productos cárnicos, reduce la solubilidad del oxígeno en agua, lo

que contribuye a prolongar la vida útil de los productos (Restrepo Molina et al., 2001). Además a nivel tecnológico, contribuye con la solubilidad de las proteínas permitiendo estabilizar la grasa en los productos emulsificados lo que favorece posteriormente las propiedades físicas de textura de los productos finales incrementando la calidad sensorial (Tarté, 2009).

La importancia de este ingrediente dentro de la industria ha generado investigaciones que tenían como fin describir y predecir el comportamiento de los microorganismos sobre la calidad e inocuidad de los productos. Como las realizadas por Salter, Ratkowsky, Ross, y McMeekin, (2000) quienes modelaron el efecto de la temperatura y la concentración de sal (NaCl) sobre el crecimiento de *Escherichia coli*. Igualmente, Kajak y Kołożyn-Krajewska, (2006) desarrollaron modelos predictivos del crecimiento de microorganismos en productos cárnicos salados y curados; así mismo C. Møller et al., (2013) modelaron el efecto de la microbiota natural en el crecimiento de *Salmonella* spp. en la carne de cerdo fresca. Igualmente S. Møller et al., (2013) modelaron el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en quesos y su efecto sobre la estructura del producto.

1.5 Calidad, vías de deterioro y alteraciones del jamón

La calidad del jamón se encuentra relacionada con el proceso tecnológico, las condiciones de almacenamiento, el tipo de corte, el masajeo, el tiempo y temperatura de cocción; factores que afectan la calidad y las características sensoriales, como apariencia, textura, sabor etc.; sin embargo, es razonable asumir que existen algunas relaciones entre los constituyentes químicos (agua, proteína, grasa, sal y minerales) y atributos físicos (terneza, dureza, jugosidad, cohesividad, gomosidad, elasticidad adhesividad). Las características fisicoquímicas más deseables en el jamón son la cohesividad, la firmeza y la jugosidad (González, Suárez, y Martínez, 2009).

La composición química del jamón y la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos hacen que se encuentre entre los productos cárnicos más perecederos (Zúñiga Velázquez, 2012). Presentando vías de deterioro *químicas* (formación de sustancias sápidas e aromáticas derivadas de la oxidación lipídica y degradación de proteínas); *físicas* (pérdida de las propiedades texturales); *microbiológicas* (acción de

microorganismo patógenos y alterantes) y *sensoriales* (ausencia/presencia de defectos) (Molinero Sánchez, 2005, y Gordon L, 2009).

Sin embargo, la principal causa de disminución de la vida útil de los productos cárnicos refrigerados, entre ellos el JCLEV, es la pérdida de calidad sensorial causada por microorganismo y el crecimiento de patógenos a niveles detectables (Tirado et al., 2005). Esto se debe a que el bajo contenido de sal (2% en promedio), un pH alrededor de 6.0 y una alta actividad de agua (0.945) son sólo pequeños obstáculos para inhibir a los microorganismos asociados con el deterioro del JCLEV, los cuales pueden ingresar al producto en el procesamiento posterior a la cocción (Zúñiga Velázquez, 2012).

Entre los microorganismos causantes de deterioros se encuentran bacterias Gram-negativas aerobias como *Pseudomonas*, BAL anaerobias como *Carnobacterium*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, incluso bacterias tolerantes al CO₂, como los lactobacilos principalmente *Lactobacillus sakei* y *L. curvatus*, *Leuconostoc carnosum*, *L. gasicomitatum*, *L. mesenteroides*, *Weissella* spp. y *Carnobacterium* spp. Estos microorganismos representan la causa principal de deterioro en productos cárnicos provocando acidez, decoloración, producción de gas, formación de limo superficial y cambios de pH. Deterioro presentado antes de su fecha de caducidad de los JCLEV (Tirado et al., 2005., Molinero Sánchez, 2005., Salcido, De Corona, y Eleazar, 2010., Ossa Canencio, Restrepo, Coral Durago, y Vanegas Lopez, 2010., y Zúñiga Velázquez, 2012).

1.5.1 Microorganismos alterantes en jamón

La descomposición microbiológica de los alimentos es una de las vías de deterioro más importante en la pérdida de calidad, especialmente en los productos cárnicos perecederos - Jamón (Kilcast y Subramaniam, 2000). El incremento de la población microbiana, se encuentra en función de las condiciones ambientales, las cuales favorecen el crecimiento de grupos de microorganismos convirtiéndolos en la flora predominante; por ejemplo, en carne de res envasada en condiciones aerobias se promueve el crecimiento de *Pseudomonas spp.*, pero en condiciones anaerobias este microorganismo se inhibe y se promueve el crecimiento de *Lactobacillus spp.* (Labuza y Fu, 1993).

Específicamente, la pérdida de calidad del jamón cocido lonchado empacado al vacío, se encuentra asociada al crecimiento de bacterias ácido lácticas anaerobias de los géneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (Doyle, 2009., Gonzalez, Suárez, y Martinez, 2010., y Salcido *et al.*, 2010). Los cuales se caracterizan por ser bacterias Gram-positivas, no esporuladas, normalmente no móviles y en forma de cocos, cocobacilo o bacilo. Son anaerobias facultativas, catalasa negativa (algunas cepas presenta pseudo-catalasa) que fermentan carbohidratos en ácido láctico principalmente (Toldrá, 2001)., Las BAL se encuentran clasificadas en dos subgrupos las homofermentativas (ruta de Embden – Meyerhof), las cuales producen como principal metabolito ácido láctico y las heterofermentativas (ruta oxidativa de pentosas fosfato), las cuales producen cantidades de ácido láctico, dióxido de carbono y etanol; dentro de este grupo se destacan los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. (Tran, 2004).

Dichos géneros, han sido frecuentemente asociados a la pérdida de calidad de los jamones cocidos lonchados empacados al vacío, provocando acidificación, limo superficial y desprendimiento del empaque por el CO₂ generado en el metabolismo de estos microorganismos; así mismo se produce un descenso del pH y la aparición de olores y sabores extraños. Alteraciones que causan rechazo sensorial (Mataragas, Drosinos, Vaidanis, y Metaxopoulos, 2006).

1.5.1.1 Bacterias ácido lácticas

Teniendo en cuenta la importancia de las bacterias ácido lácticas heterofermentativas (*Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*) dentro de la industria cárnica, A continuación se describen las condiciones de crecimiento, su morfología y el metabolismo de estos géneros.

Tabla 1. Características de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*.

CARACTERÍSTICAS	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
Morfología	Bacilos, coco-bacilos. De cadenas cortas	Cocos.	Cocos
Gram	Gram +	Gram +	Gram +
Anaerobio facultativo	+	+	+
Crecimiento a T^a óptima	30 – 40°C	30°C	20 – 32°C
10°C	±	+	+
45°C	±	-	-
Crecimiento a pH óptimo	5,5 -6,2	*	*
pH 4,4	±	±	±
pH 9,6	-	-	-
Colonias en agar	2-5 mm, convexas, sin pigmento	0,5–1,5 mm (en agar sangre)	± 1mm, viscosas (en agar con sacarosa)
Formación de esporas	NO	NO	NO
Motilidad	-	-	-
Oxidasa	*	-	*
Catalasa	-	-	-
Formación de ácido láctico	D y L ácido láctico	L ácido láctico	D ácido Láctico
Producción de CO₂ desde glucosa	SI	NO	SI
productos de fermentación de carbohidratos (anaerobiosis)	Lactato; algo de acetato, etanol, CO ₂	Lactato	Lactato, etanol
Crecimiento con NaCl:			
6,5%	*	-	±
18%	*	-	-
Hábitat	Lácteos, pescado, vegetales	carne, Lácteos plantas	y Lácteos y plantas y otros, alimentos

Fuente: (Rodríguez Perez, 2003), (Tran, 2004).

+ Positivo, crecimiento aproximado del 90% de las cepas viables.

± la respuesta varía entre las especies, entre el 11 -89% de las cepas positivas.

- Negativo, ≥ 90% de las cepas inviables.

* No descrito.

Atendiendo la importancia del *Leuconostoc* spp y de los otros géneros de BAL heterofermentativas en la industria cárnica se han realizados estudios como:

Chenoll, Macián, Elizaquível, y Aznar, (2007), caracterizaron la flora microbiana asociada al abombamiento de los empaques en jamón de cerdo. Concluyendo que el *Leuconostoc*

mesenteroides es la principal especie responsable del deterioro por abombamiento de los productos cárnicos envasados al vacío.

Nychas, Skandamis, Tassou, y Koutsoumanis, (2008) caracterizaron la flora microbiana causante de la pérdida de calidad de los productos cárnicos durante la distribución, atribuyendo su deterioro a las bacterias ácido lácticas, dentro de las cuales el género *Leuconostoc* y *Lactobacillus* se encuentran presentes con alta frecuencia en la carne fresca y en los productos cárnicos.

Flores rondón *et al.*, (2011), evaluó el tiempo de almacenamiento e identificaron las bacterias ácido lácticas presentes en carne de res picada y empacada al vacío, concluyendo que la flora predominante, aislada, pertenece al grupo de BAL heterofermentativas de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus*.

Yanqing *et al.*, (2011), evaluó el efecto de las altas presiones (HPP) sobre la inactivación de los microorganismos en jamón cocido lonchado empacado al vacío, concluyendo que el *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus*, son sensibles al tratamiento con HHP (HPP a 600 MPa durante 10 min a 22°C), ya que, las muestras no presentaron recuentos de unidades formadoras de colonias viables durante el almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, otros microorganismos como los *Viridescens Weissella* y *Leuconostoc mesenteroides* sobrevivieron al tratamiento y fueron responsables de la descomposición final.

Zúñiga Velázquez, (2012), estudió el efecto de las altas presiones sobre *Leuconostoc* spp., por su capacidad de producir gasificación y líquido lechoso como principales deterioros en jamón cocido lonchado empacado al vacío y almacenados a 4°C. Concluye que el tratamiento es efectivo para la inactivación de este microorganismo. Así mismo, identificó 44 cepas pertenecientes al género *Leuconostoc*; siendo las sub-especies predominantes *L. fallax*, *L. citreum* y *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

Leuconostoc mesenteroides.

Las cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, se caracterizan por ser Gram-positivas, no patógenas, anaeróbicas facultativas, no móviles, ni formadoras de esporas (Tran, 2004 y Nychas *et al.*, 2008).

La importancia de este microorganismo dentro de la industria cárnica han generado investigaciones para modelar el efecto de los factores (*extrínsecos e intrínsecos*) sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de microorganismos y su relación con el deterioro de los productos, entre las que se encuentran.

Pin y Baranyi, (1998) quienes desarrollaron modelos predictivos para cuantificar las interacciones entre los microorganismo causantes de los deterioros (*Pseudomonas, Acinetobacter, Psychrobacter, Shewanella, Carnobacterium, Lactobacillus, Leuconostoc, Brochothrix* y *Kurthia* spp.) en productos cárnicos; empleando como factores de estudio la temperatura y el pH.

Rodríguez Pérez, (2003), desarrollan y validan los modelos predictivos para *Leuconostoc mesenteroides* con el fin de estimar la vida comercial del jamón cocido, la pechuga de pavo y la pechuga de pollo, empleando como factores la temperatura, el pH, la concentración de sal y nitritos, en condiciones aerobias y anaerobias. Llegando a la conclusión de que los modelos predictivos son una herramienta útil para calcular la vida media comercial predictiva de los productos cárnicos cocidos, empleando los parámetros cinéticos estimados por dichos modelos matemáticos.

García Gimeno *et al.*, (2005), modeló el comportamiento de *Leuconostoc* spp., mediante la metodología de redes neuronales artificiales empleando como factores la temperatura, el pH, la concentración de sodio y el contenido de nitritos. Obteniendo como resultados ecuaciones matemáticas confiables que estiman los parámetros cinéticos de crecimiento del microorganismo; permitiendo predecir el incremento de la población microbiana en función del tiempo.

Mataragas *et al.*, (2006), desarrolló modelos predictivos para estimar el deterioro de productos cárnicos cocidos y curados almacenados en refrigeración, bajo perfiles de temperatura estáticos y dinámicos (0°C y 12°C), Empleando como criterios el deterioro fisicoquímico, microbiológico y el deterioro sensorial visible; llegando a la conclusión que las estimaciones realizadas mediante el modelo microbiológico son confiables y constituyen una valiosa fuente de información para estimar la calidad de los productos cárnicos durante el almacenamiento.

Limbo, Torri, Sinelli, Franzetti, y Casiraghi, (2010), desarrollan un modelo predictivo, para estimar la vida útil de carne troceada almacenada en un atmosferas rica en oxígeno, obteniendo como resultado que la temperatura ejerció un efecto significativo sobre las reacciones de deterioro del producto.

1.6 Microbiología predictiva

La microbiología predictiva (MP) es la disciplina que combina elementos de matemáticas, estadística, sistemas informáticos, ingeniería, química y ecología microbiana para desarrollar modelos que describen y predicen el comportamiento de los microorganismos bajo condiciones experimentales (Parra, 2009).

Un modelo microbiológico predictivo, es una expresión matemática que describe el crecimiento, la supervivencia, la inactivación o proceso bioquímico de un microorganismo de origen alimentario (McDonald y Sun, 1999). El desarrollo de los modelos matemáticos no solo se basa en encontrar la ecuación que describa el comportamiento de un conjunto de datos sino en determinar modelos precisos y versátiles al mismo tiempo (Sun, 2012).

Las aplicaciones prácticas de la MP se encuentran relacionadas con el mejoramiento de las técnicas tradicionales para garantizar la seguridad alimentaria, es decir la evaluación de riesgos microbiológicos o la evaluación de procesos de elaboración de alimentos tradicionales o innovadores (T. a McMeekin y Ross, 2002).

T. a McMeekin *et al.*, (2006) señaló que el sello distintivo de la microbiología predictiva es convertir los datos en conocimiento.

1.6.1 Clasificación de modelos

Existen diferentes criterios para clasificar los modelos predictivos del crecimiento microbiano, los cuales pueden ser agrupados según su funcionamiento matemático, según su finalidad o por la propuesta de Pin y Baranyi, (1998), que los ordena en modelos primarios, secundarios y terciarios (Coll Cárdenas, Giannuzzi, Noia, y Zaritzky, 2001); siendo esta última clasificación la más aceptada por la comunidad científica (Sun, 2012). A continuación se presenta una descripción de tipos de modelos.

La primera clasificación agrupa los modelos de acuerdo a su funcionamiento matemático, en modelos empíricos y mecanicistas.

Aquellos modelos matemáticos que son desarrollados a partir de datos obtenidos experimentalmente, reciben el nombre de modelos empíricos; estos son de gran interés, debido a que describen los datos de crecimiento bajo condiciones específicas. Entre los modelos más representativos de este grupo se encuentra el modelo de Gompertz, el modelo de raíz cuadrada y sus modificaciones, ecuaciones polinómicas, así como, las redes neuronales artificiales. Dichos modelos son utilizados para describir la velocidad de crecimiento (N_{max}), la fase de latencia (LDP) y otros parámetros en función de condiciones experimentales como la temperatura, el pH, entre otras (József. Baranyi y Pin, 2001).

El cuanto a los modelos mecanicistas se diferencian de los empíricos, debido a que estos parten de una base teórica biológica, la cual obliga al modelo a adaptarse a la realidad biológica mediante una hipótesis determinada, en consecuencia, estos modelos explican con más exactitud los datos experimentales aunque no se ajusten con tanta exactitud como los modelos empíricos a los datos utilizados para la generación del modelo. Dentro de estos modelos se destacan los que predicen la tasa de crecimiento en función de la temperatura o aquellos que describen la velocidad de catálisis enzimática a bajas temperaturas, entre otros (Salvador, 2013).

La segunda clasificación de los modelos predictivos se fundamenta en la finalidad y agrupan los modelos en cinéticos y probabilísticos.

Los modelos cinéticos son aquellos que se desarrollan para explicar el crecimiento de los microorganismos en términos de las variables ambientales tales como la temperatura, el pH o la actividad de agua. Igualmente, pueden ser incluidas otras variables como la atmosfera gaseosa o el potencial redox, la humedad relativa, el contenido de nutrientes y las propiedades antimicrobianas. Estos modelos son útiles al momento de explicar el comportamiento de los microorganismos durante el tiempo de proceso o almacenamiento, sin embargo son de difícil construcción, debido a que requieren de gran cantidad de datos de recuentos microbianos. (McDonald y Sun, 1999).

Por otro lado, se puede decir que en la medida que incrementa el tiempo también lo hace la variabilidad, eventualmente hasta el punto en que los modelos cinéticos se sustituyen por modelos de probabilidad. El momento de cambio entre los tipos de modelos se encuentra condicionado por el nivel de confianza que se pretenda, es decir, la probabilidad de fallo o consecuencia de fracaso “riesgo” (T. McMeekin *et al.*, 2008). Los modelos probabilísticos son comúnmente empleados para estimar los límites de crecimiento/no crecimiento o producción/no producción de toxina, por ejemplo dichos modelos son útiles en la toma de decisiones sobre la formulación, el envasado y almacenamiento de un producto basados en la probabilidad de riesgo (Salvador, 2013).

Finalmente, la clasificación más empleada en el campo científico de la microbiología predictiva es la propuesta por Whiting y Buchanan en (1993), los cuales clasifican modelos en primarios, secundarios y terciarios. (McDonald y Sun, 1999., József. Baranyi y Pin, 2001, y Sun, 2012).

1.6.1.1 Modelación de curvas de crecimiento y determinación de los parámetros cinéticos (modelos primarios).

Los modelos matemáticos, que describen la evolución del número de unidades formadoras de colonias viables en función del tiempo (crecimiento, supervivencia e inactivación) en cada una de las condiciones experimentales, son llamados modelos primarios. El objetivo de este tipo de modelos, es describir la cinética de crecimiento del microorganismo en un proceso; con el menor número posible de parámetros sin perder exactitud al momento de describir las etapas de crecimiento. (Salvador, 2013).

Los modelos primarios son empleados para poner a prueba la capacidad del mismo para explicar las curvas de crecimiento (o supervivencia) y luego estimar los parámetros cinéticos. Esto genera información específica del microorganismo tal como tiempo de generación (t_g), duración de la fase latencia (LDP), la velocidad de crecimiento (μ_{max}) y la población máxima (N_{max}). Según Whiting, 1995; Whiting y Buchanan, 1993, 1994 y citados por (Sun, 2012).

Descripción de modelos primarios.

El crecimiento de los microorganismos es descrito por los parámetros cinéticos; que son representados en tres etapas. La primera es la fase de latencia (LDP), la fase de crecimiento exponencial (μ_{max}) y finalmente, la fase estacionaria donde se alcanza la población máxima (N_{max}) (Sun, 2012).

El crecimiento de los microorganismos se ve afectado por las condiciones ambientales, la composición del alimento y por el estado fisiológico de las células; sin embargo, éstas no son las únicas fuentes de variación toda vez que la cepa siendo del mismo género, y esta puede crecer de modo diferente en las mismas condiciones intrínsecas y extrínsecas (József. Baranyi y Pin, 2001). Por tanto, se hace necesario ajustar, desarrollar y validar modelos versátiles que representen el comportamiento de los microorganismos en cada matriz.

Entre los modelos más ampliamente utilizados se encuentra la ecuación de **Gompertz modificada** la cual representa mediante un modelos no lineal sigmoideal, con cuatro coeficientes como se muestra en continuación (Labuza y Fu, 1993)., (Descremada *et al.*, 2008).

$$y = A + C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\}$$

- Donde:** **Log N** Recuento final (Log de UFC/g), variable dependiente.
t Tiempo transcurrido (variable independiente).
A Log_{10} UFC/g iniciales (Inoculo).
D Log_{10} la diferencia entre el número inicial y el número final de microorganismos en la fase estacionaria (cantidad de ciclos logarítmicos).
B Representa la pendiente de la curva y describe la velocidad o tasa de crecimiento.
M Representa el tiempo en el cual se alcanza la tasa de crecimiento más alta.

La simplicidad y facilidad de uso de esta ecuación ha permitido que sea ampliamente utilizada, por ejemplo para describir las curvas de crecimiento de cultivos indicadores, de lactobacilos en chorizo, de *Listeria monocytogenes* en pollo y en embutidos de hígado, así como para modelar el crecimiento de microorganismos causantes de deterioro en carnes cocidas empacadas al vacío y para describir la vida útil de productos cárnicos (Beldarraín, Villavicencio, Ramos, y Bruselas, 2007).

Realizados los ajustes al modelo primario es posible calcular los parámetros cinéticos derivados de la ecuación de Gompertz, elaborados por Buchanan en 1990 y citados por (Garcés Vega, 2003), mediante las ecuaciones que se describen a continuación.

Velocidad de crecimiento exponencial (μ_{\max}).

$$\frac{BC}{e} \text{ donde } e = 2,718$$

Tiempo de generación (t_g)

$$\frac{\log(2) e}{B * C}$$

Duración de la fase de latencia (LDP)

$$M - \frac{1}{B}$$

Población máxima alcanzada (M)

$$A + C$$

Otro modelo microbiológico ampliamente utilizado para predecir el crecimiento de los microorganismos es el modelo **logístico sigmoidal**, el cual emplea los mismos términos para determinar los parámetros cinéticos de crecimiento de la fase de latencia, la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación. La ecuación logística es representada por la ecuación (McDonald y Sun, 1999., József. Baranyi y Pin, 2001):

$$y = \frac{A + C}{\{1 + \exp[-B (t - M)]\}}$$

El cálculo de los parámetros cinéticos (Velocidad de crecimiento y fase de latencia) se realiza mediante las siguientes ecuaciones:

Velocidad de crecimiento: $\mu_{\max} = BC/4$

Fase de latencia: $LDP = M - 2/B$

El modelo logístico sigmoideal ha sido empleado para predecir el crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* en condiciones cambiantes de temperatura (J. Baranyi, Robinson, Kaloti, y Mackey, 1995); también ha sido empleada en el desarrollo de modelos que describen el efecto de la temperatura y la actividad de agua sobre el crecimiento de microorganismos *pseudomonads* spp. (Neumeyer, Ross, Thomson, y McMeekin, 1997); ha sido empleado por Garcés Vega, (2003), para modelar el efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento y producción de sustancias inhibitorias de bacterias ácido lácticas (*lactobacillus acidophilus*); así como por Slongo *et al.*, (2009), quien modeló el efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre crecimiento de bacterias ácido lácticas en jamón lonchado.

Otro de los modelos primarios de mayor aplicación es el **modelo de Baranyi** el cual se encuentra representado por la expresión matemática (Grijpspeerdt y Vanrolleghem, 1999., József. Baranyi y Pin, 2001):

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

Donde:

- y(t) Concentración de celular a tiempo t (log UFC/g)
- y₀ Logaritmo natural de la concentración celular a t = 0
- y_{max} Logaritmo natural de la máxima concentración de celular
- μ_{max} Velocidad máxima específica de crecimiento (d⁻¹)
- A(t) retraso gradual del crecimiento en el tiempo, tiene en cuenta el estado fisiológico y se calcula mediante la ecuación.

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \{ \exp(-\mu_{\max} t) + \exp(-h_0) - \exp[(\mu_{\max} t) - h_0] \}$$

Donde:

$$h_0 = \ln \alpha_0$$

$$\alpha_0 = \frac{z_t t}{k_2 + z_1(t)}$$

El modelo de *Baranyi* es un modelo empírico el cual permite modelar las cuatro partes de la curva del crecimiento microbiano: fase de latencia, fase de crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase de muerte - inactivación microbiana (Nuñez de villavicencio, 2011).

La versatilidad de este modelo ha permitido que sea empleado para modelar el comportamiento de los microorganismos, como los estudios realizados por (J Baranyi, Pin, y Ross, 1999), quienes desarrollaron herramientas para la comparación de modelos predictivos del crecimiento microbiano o los estudios realizados por (Métris, Le Marc, Elfwing, Ballagi, y Baranyi, 2005) quienes modelaron el tiempo de latencia y el tiempo de generación de *E. coli*. (Xiong, Xie, Edmondson, Linton, y Sheard, 1999) compararon el modelo de Baranyi con la ecuación de Gompertz para modelar la inactivación térmica de *Listeria monocytogenes*.

1.6.1.2 Modelación del efecto de los factores intrínsecos y extrínsecos en el crecimiento del microorganismo. (Modelos secundarios).

La esencia de la microbiología predictiva consiste en prever el comportamiento de la población microbiana (parámetros cinéticos de crecimiento) mediante el uso de modelos matemáticos, los cuales se encuentran en función de los factores propios del producto (pH, actividad de agua, concentración de sales, nitritos, entre otros) y condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad relativa, atmósfera, entre otros) dichas expresiones matemáticas son denominados modelos secundarios (Garcés Vega, 2003., T. A. McMeekin, 2007).

Dentro de esta categoría se encuentran el modelo de Arrhenius, modelos de raíz cuadrada, modelos de superficie de respuesta, modelos probabilísticos y modelos obtenidos mediante redes neuronales artificiales entre otros (Céspedes Molina, 2012).

Entre los modelos secundarios más empleados se encuentra el **modelo de Arrhenius** el cual se encuentra enunciado por la siguiente expresión matemática (Sun, 2012):

$$\ln \mu = \ln A \cdot \left(\frac{E_a}{RT} \right)$$

Donde:

- μ** Velocidad de crecimiento (h^{-1})
- A** factor preexponencial de la ecuación
- E_a** Energía de activación
- R** Constante de los gases (8,314 J/mol*°K)
- T** Temperatura absoluta (°K)

El modelo de Arrhenius presenta el inconveniente de que el ajuste del modelo no es adecuado cuando el crecimiento microbiano se mide por debajo o por encima de la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo de estudio (Nuñez de villavicencio, 2011). Sin embargo, este modelo ha sido empleado Beldarraín *et al.*, (2012) para predecir el comportamiento de *Staphylococcus aureus* en carne de hamburguesa. Así mismo, Limbo *et al.*, (2010) emplearon este modelo para predecir la vida útil de carne picada envasada en atmósfera modificada, en diferentes temperaturas de almacenamiento.

El **modelo de Belehradek o de raíz cuadrada**, es otro modelo secundario el cual describe la relación entre la velocidad de crecimiento microbiano y la temperatura, dicha expresión matemática se encuentra definida como (Gordon L, 2009., Sun, 2012):

$$\sqrt{\mu_{max}} = b \cdot (T - T_{min})$$

Este modelo a sufrido modificaciones incluyendo el efecto de otros parámetros como el pH, la actividad de agua y las bacterias ácido lácticas (Sun, 2012). Lo que ha permitido ampliar las aplicaciones de este modelo en la industria de alimentos. Por ejemplo Parveen

et al., (2013) utilizaron este modelo para desarrollar y validar de un modelo predictivo para el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* en las ostras de marisco después de la cosecha. Membré et al., (2005) utilizaron este modelo para evaluar el efecto de la temperatura sobre la tasa de crecimiento bacteriano. Igualmente (T Ross, Ratkowsky, Mellefont, y McMeekin, 2003) utilizaron este modelo para estimar y modelar el efecto de la temperatura, la actividad de agua, el pH y la concentración de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento de *E. coli*.

Por otra parte, otros modelos secundarios muy empleados son los **modelos polinomiales**, también llamados **modelos de superficie de respuesta** (Sun, 2012). Este tipo de modelos son atractivos debido a su facilidad de uso, además que permite valorar múltiples factores ambientales y sus interacciones sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de los microorganismos. La siguiente ecuación representa un modelo polinomial cuadrático (Toldrá, 2009).

$$\ln(z) = a_0 + \sum_i b_i x_i + \sum_i \sum_{i < j} c_{ij} x_i x_j + \sum_i d_i x_i^2 + e$$

Donde, el valor coeficiente z representa las variables cinéticas (velocidad de crecimiento, fase de latencia, o población máxima) del microorganismos de interés, y el coeficiente x equivale a los diferentes factores de estudio (Sun, 2012).

Los modelos de superficie de respuesta han sido empleados para evaluar las variables que afectan el crecimiento de los microorganismos y la acidificación en yogurt (Gardinib, Elisabetta, y Dellaglio, 1996), también han sido usados por Amos, Davey, y Thomas, (2001) para desarrollar modelos de predicción de la cinética de inactivación de *E. coli* en el proceso de producción de agua potable.

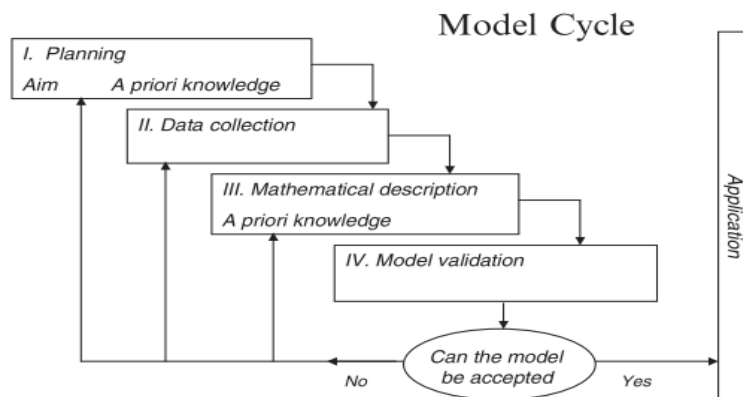
Específicamente en la industria cárnica se ha utilizado esta metodología para modelar el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* en productos cárnicos curados (García Gimeno et al., 2005); Así mismo recientemente, se han utilizado para evaluar el efecto de las altas presiones sobre la inactivación de *Salmonella* spp. en jamón curado (Bover-Cid, Belletti, Garriga, y Aymerich, 2012) y para desarrollar modelos que determinan el efecto

de la microbiota natural sobre el crecimiento de *Salmonella* en carne de cerdo fresca (C. Møller *et al.*, 2013).

Finalmente, los modelos secundarios pueden ser incorporados a un software, el cual con la tecnología de monitoreo adecuada puede estimar la vida útil de los productos o el riesgo de pérdida de la inocuidad que atente contra la seguridad alimentaria, sin recurrir a las técnicas tradicionales de recuento en placa de los microorganismos (T. A. McMeekin, 2007); esta integración de modelos primarios y secundarios se denomina como modelos terciarios – *Software* (McDonald y Sun, 1999), entre los más representativos se encuentran el **Pathogen Modeling Program** (PMP) desarrollado por Agricultural Research Center and Eastern Regional Research Center (USA), **Microfit** propuesto por Food Standards Agency and Institute of Research (UK), **Combase** propuesto por (UK, USDA, and Food Safety Center (Australia), entre otros representativos.

1.6.2 Desarrollo de modelos predictivos del crecimiento microbiano

Para el desarrollo de modelos predictivos del crecimiento microbiano es necesario realizar un diseño y planteamiento previos que permitan identificar los factores claves que afectan el crecimiento microbiano en la matriz de estudio; y luego realizar una recolección y análisis de los datos, para posteriormente efectuar la validación de las expresiones matemáticas obtenidas a partir de los datos experimentales (McDonald y Sun, 1999., Kilcast y Subramaniam, 2000., József. Baranyi y Pin, 2001). La figura 1, presenta el ciclo para el desarrollo de modelos predictivos (Costa y Kristbergsson, 2009).



Fuente: (Costa y Kristbergsson, 2009)., Predictive Modeling and Risk Assessment., Pág. 45.

Figura 1: Ciclo para desarrollar modelos microbiológicos predictivos

La planificación es el primer paso para el desarrollo de modelos predictivos, en donde se hace necesario determinar el objetivo, determinar las variables (independientes y dependientes) para el cumplimiento del objetivo, establecer el alcance del experimento (objetivo práctico), fijar las características del inóculo (estado fisiológico, tamaño, forma de inoculación) y del sustrato, así como el método a emplear para la toma de los datos experimentales, recuento de unidades formadoras de colonias viables (McDonald y Sun, 1999., Kilcast y Subramaniam, 2000., Costa y Kristbergsson, 2009).

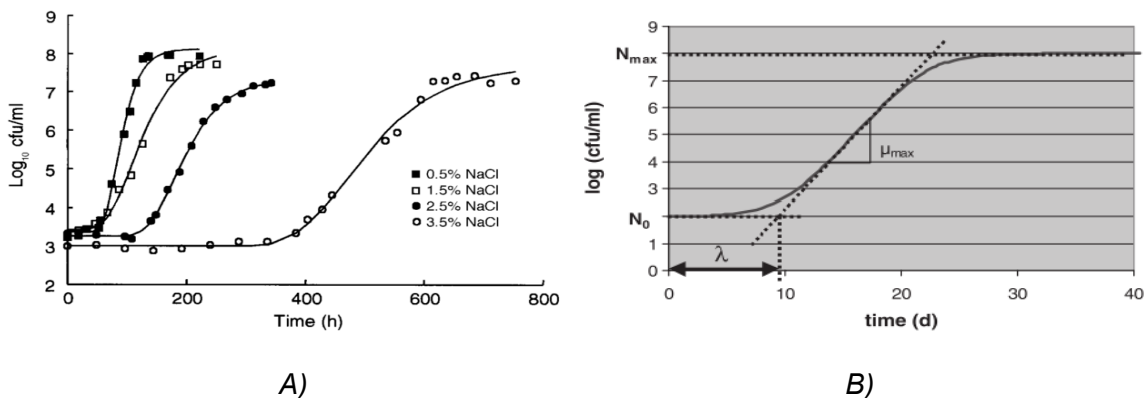
Otro parámetro importante en la planificación del estudio es el estudio es determinar el diseño de experimentos, el cual debe minimizar la variabilidad propia de los alimentos, y que a su vez permita obtener datos representativos de los crecimientos microbianos en las condiciones experimentales, es decir, si el modelo se va aplicar en una amplia gama de alimentos, entonces se hace necesario utilizar menos productos antimicrobianos o bacteriostáticos que inhiban el crecimiento de la población microbiana. Sin embargo, si el modelo se encuentra destinado a alimentos específicos, la elección de los factores de estudio deber ser lo más similar posible, con la finalidad de incluir la mayor cantidad de interacciones entre los factores (Kilcast y Subramaniam, 2000).

Establecidas las condiciones de estudio, comienza la etapa de generación de conocimiento (acumulación de datos experimentales); es decir la cuantificación del número de unidades formadoras de colonias viables en los puntos seleccionados para cada una de las condiciones experimentales. Dicho recuento puede ser efectuado mediante metodologías tradicionales o mediante densidad óptica, método que generalmente suele ser más sencillo y rápido, pero presenta la desventaja que al realizar la medición es posible contar células no viables (McDonald y Sun, 1999., Costa y Kristbergsson, 2009).

Una vez obtenidos los recuentos microbianos, por algunas de las técnicas mencionadas, se realiza una curva de crecimiento de cada una de las condiciones experimentales. Luego se procede a ajustar los datos experimentales a los modelos primarios descritos anteriormente, de tal forma que sea posible explicar el incremento de la población celular

en función del tiempo. Está ajuste es conocido como modelamiento matemático (Kilcast y Subramaniam, 2000), o descripción matemática (Costa y Kristbergsson, 2009).

La finalidad del paso anterior es establecer el modelo primario más efectivo para describir los datos experimentales con el cual se procede a calcular los parámetros cinéticos de crecimiento (velocidad máxima de crecimiento, fase de latencia, población máxima y tiempo de generación) del microorganismo de estudio para cada combinación de factores (Kilcast y Subramaniam, 2000). La figura 2, muestra el ajuste del modelo logístico sobre el crecimiento de *Aeromonas hydrophila*.



Fuente: A) (Kilcast y Subramaniam, 2000), *The stability and shelf-life of food.*, Pág. 59.
B) (Costa y Kristbergsson, 2009), *Predictive Modeling and Risk Assessment.*, Pág.31.

Figura 2: muestra A) ajuste del modelo de Gompertz sobre el crecimiento de *Aeromonas hydrophila* en diferentes concentraciones de sal. B) parámetros cinéticos de crecimiento estimado con el modelo logístico para una condición experimental.

Estimados los parámetros cinéticos se realiza el ajuste a los modelos secundarios (polinómicos, de raíz cuadrada, Arrhenius, entre otros), con la finalidad de predecir como varían dichos parámetros de crecimiento en función de los uno o más factores utilizados (*intrínsecos* y *extrínsecos*) (Kilcast y Subramaniam, 2000).

El ajuste de los modelos primarios y secundarios puede ser realizado mediante regresión lineal o no lineal dependiendo del carácter del modelo aplicado; es decir, el proceso consiste en ajustar un conjunto de valores a una función, basados en el principio de mínimos cuadrados. Este criterio tiene como objeto derivar valores de los parámetros que

minimizan la suma de cuadrados de error, es decir, de las diferencias entre los valores observados y predichos por el modelo ajustado (Costa y Kristbergsson, 2009).

Finalmente, la cuarta fase consiste en validar los modelos empíricos desarrollados, la cual puede realizarse interna o externamente.

La validación interna es aquella realizada con los datos obtenidos en las mismas condiciones que se utilizaron para desarrollar el modelo. Este tipo de validación es comúnmente empleada en medios de cultivo o bajo condiciones estáticas con el fin de determinar si el modelo puede describir suficientemente los datos experimentales (Kilcast y Subramaniam, 2000).

Por otro lado, cuando se emplean nuevos datos de los parámetros cinéticos, obtenidos en condiciones experimentales nuevas o de datos reportado por otras investigaciones, el procedimiento recibe el nombre de validación externa (Costa y Kristbergsson, 2009).

Los procedimientos de validación sea interna o externa, conllevan a una validación matemática y luego en el producto, es decir, la validación matemática cuantifica la precisión del modelo para explicar nuevos datos experimentales en condiciones similares a las empleadas para desarrollar el modelo (Costa y Kristbergsson, 2009).

Cuando la etapa de validación matemática se supera exitosamente, es posible establecer una ratificación del producto, la cual consiste en comparar los recuentos microbianos observados en el producto con los valores predichos por el modelo, de manera que sean lo suficientemente seguras para ser utilizadas como herramienta en la industria (Kilcast y Subramaniam, 2000).

La calidad de los modelos ajustados o desarrollados se realiza mediante los índices matemáticos y estadísticos referenciados por (J Baranyi *et al.*, 1999)., los cuales han sido ampliamente utilizados en el desarrollo y validación de modelos microbiológicos en la industria de alimentos. (Sutherland *et al.*, 1995., Neumeyer, Ross, Thomson, *et al.*, 1997., Neumeyer, Ross, y McMeekin, 1997., Xiong *et al.*, 1999., Devliegher *et al.*, 2000., Tom Ross, Dalgaard, y Tienungoon, 2000., Geeraerd *et al.*, 2004., Améquita, Weller, Wang,

Thippareddi, y Burson, 2005., García Gimeno *et al.*, 2005., Mataragas *et al.*, 2006., Valero, Pérez-Rodríguez, Carrasco, García-Gimeno, y Zurera, 2006., Drosinos, Mataragas, y Metaxopoulos, 2006., Dominguez y Schaffner, 2007., Phua y Davey, 2007., Antwi, Bernaerts, Impe, y Geeraerd, 2007., Antwi, Theys, Bernaerts, Impe, y Geeraerd, 2008., Descremada *et al.*, 2008., Slongo *et al.*, 2009., Juneja, Melendres, Huang, Subbiah, y Thippareddi, 2009., Beldarraín *et al.*, 2012., Bover-Cid *et al.*, 2012., Parveen *et al.*, 2013., S. Møller *et al.*, 2013. A continuación se realiza una descripción detallada de cada uno de los índices, los cuales son empleados en el desarrollo de esta investigación.

El primer paso para determinar la calidad de los modelos es una **evaluación gráfica** de los datos cinéticos experimentales con la finalidad de identificar valores que podrían afectar el ajuste de los modelos y estimar la fiabilidad de los mismos (J Baranyi *et al.*, 1999). A continuación se procede a determinar los siguientes parámetros:

Raíz del error cuadrático medio (RMSE).

El RMSE, representa la idoneidad del modelo predictivo para describir los datos experimentales. Cuando el valor es más cercano a cero, mejor es el ajuste. Este parámetro estadístico se encuentra definido por (J Baranyi, Ross, McMeekin, y Roberts, 1996., Salvador, 2013):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(\mu_{predicha} - \mu_{observada})^2}{n}}$$

Este índice estadístico se expresa como la raíz cuadrada de la sumatoria de las diferencias cuadráticas de los valores predichos ($\mu_{predicha}$) y los valores observados ($\mu_{observada}$ diferencia residual) dividido entre el número total de datos n .

Coeficiente de determinación o de regresión múltiple (R^2).

Este índice es utilizado como una medida del ajuste total conseguido, el cual mide la variación alrededor de la media, que es expresada y explicada por el modelo. El valor más cercano a 1 significa una mejor predicción del modelo (Rodríguez Pérez, 2003).

Factor de sesgo (“Bias factor” B_f) y exactitud (accuracy factor A_f).

Estos índices se desarrollan para evaluar la bondad del ajuste de los modelos. Dichos índices son llamados factor de sesgo y factor de exactitud; los cuales proporcionan fiabilidad a los modelos aplicados (J Baranyi *et al.*, 1996., Salvador, 2013).

Bias factor B_f

$$B_f = 10^{\left(\frac{\sum \log\left(\frac{\mu_{\text{predicho}}}{\mu_{\text{observado}}}\right)}{n}\right)}$$

Donde: μ_{predicho} es el valor de la tasa máxima específica de crecimiento predictiva (h^{-1}); $\mu_{\text{observado}}$ es el valor de la tasa máxima específica de crecimiento observada (h^{-1}); n es el número de datos o valores.

Un factor sesgo > 1 indica un modelo seguro para el caso de la tasa específica de crecimiento cuyo valor observado es inferior al estimado por el modelo predictivo, en este sentido el modelo proporciona un margen de seguridad. En cambio un valor de sesgo < 1 para la fase de adaptación proporcionado por un modelo significa que la predicción estimada es segura, puesto que la fase de adaptación observada es mayor que la predictiva (J Baranyi *et al.*, 1999., Rodríguez Pérez, 2003., Costa y Kristbergsson, 2009., Salvador, 2013).

Factor de exactitud A_f

El factor de exactitud se encuentra definido por la ecuación (J Baranyi *et al.*, 1999., József. Baranyi y Pin, 2001).

$$A_f = 10^{\sum \left| \log\left(\frac{\mu_{\text{predicho}}}{\mu_{\text{observado}}}\right) \right| / n}$$

Donde μ_{predicho} es el valor de la tasa máxima específica de crecimiento predictiva (h^{-1}); $\mu_{\text{observado}}$ es el valor de la tasa máxima de crecimiento observada (h^{-1}); n es el número de datos o valores.

El factor de exactitud se encuentra definido como el promedio de la distancia entre cada punto y la fase de equivalencia, como una medida de la proximidad del promedio entre las predicciones y las observaciones (J Baranyi *et al.*, 1999., József. Baranyi y Pin, 2001., Salvador, 2013).

El valor máximo alcanzado por A_f significa menos exactitud en la estimación; es decir, un valor de A_f de 1,7 indica que las predicciones, en promedio, difieren un 70% de las observaciones (valores experimentales). Si no hay desviaciones estructurales (sesgo = 1, ambas desviaciones positivas y negativas en promedio, modelo es exacto). La falta de exactitud puede ser mostrada por el A_f (J Baranyi *et al.*, 1999., Costa y Kristbergsson, 2009., Rodríguez Pérez, 2003., Salvador, 2013).

1.6.3 Limitaciones de los modelos predictivos.

Una de las limitaciones de los modelos predictivo es que en muchos de estos no se contemplan las interacciones entre el microorganismo de interés y los propios del producto (Costa y Kristbergsson, 2009). Sin embargo, se ha despertado el interés científico por modelar estos comportamientos, como el realizado por (Pin y Baranyi, 1998)., quienes desarrollaron modelos para cuantificar las interacciones de los microorganismos del deterioro en carne refrigerada.

Por otra parte, el desarrollo de los modelos generalmente es realizado en medios de cultivo o en alimentos homogéneos, lo que desprecia la heterogeneidad propia de los alimentos lo que limita la aplicación de las expresiones matemáticas desarrolladas. Por tanto se hace necesario en el momento de la elaboración del modelo, especificar claramente los límites del mismo (Costa y Kristbergsson, 2009).

Desde el punto de vista estadístico igualmente se presentan limitaciones, debido a que la mayoría de los modelos presentan dificultad para explicar el comportamiento de los microorganismos en condiciones extremas, lo que genera grandes variaciones entre las replicas obligando realizar transformaciones de los datos para homogenizar la varianza.

1.7 Aplicaciones de la microbiología predictiva en la industria de alimentos.

Los microbiología predictiva tienen la capacidad de predecir el crecimiento microbiano generando rápidamente información relacionada que son utilizadas en la toma de decisiones en tiempo real, la utilizada en estos modelos se aprovecha en la estimación de los riesgos biológicos dentro del sistema Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control – HACCP; así como realizar una evaluación cuantitativa del riesgo, lo que permite la selección de puntos críticos en el control o dentro de la cadena de distribución de los alimentos (Sun, 2012).

Así mismo, esta disciplina permite realizar estimaciones de la vida útil de los alimentos, y contribuye en la optimización de los procesos, determinando la relación de tiempo y temperatura necesaria para obtener alimentos inocuos y de alta calidad. Igualmente la microbiología predictiva hace su aporte en la investigación y el desarrollo de nuevos productos, permitiendo pronosticar posibles escenarios de riesgo microbiológico asociado a cambios en la formulación o en las condiciones de proceso y distribución del producto final (Sun, 2012).

(Salvador, 2013) resume las aplicaciones de la microbiología predictiva especificando el impacto dentro de cada sistema de la siguiente manera, (tabla 1).

Tabla 2: posibles aplicaciones de la microbiología predictiva.

Análisis de peligros y puntos críticos de control
<ul style="list-style-type: none">- Análisis preliminar de los peligros.- Identificación y establecimiento de puntos críticos de control.- Acciones correctivas.- Evaluar la interacción entre las variables del proceso.
Evaluación de riesgos
<ul style="list-style-type: none">- Estimación de los posibles cambios en los niveles de un determinado microorganismos en la cadena de producción y distribución de los alimentos.- Evaluación de la exposición hacia un microorganismo patógeno.
Estudios de vida útil
<ul style="list-style-type: none">- Predicción del crecimiento de posibles microorganismos patógenos y alterantes en alimentos.

Investigación y desarrollo de productos
<ul style="list-style-type: none">- Evaluación del efecto de la alteración microbiana de un producto.- Efecto del procesado sobre un producto en específico.- Evaluación del efecto de circunstancias externas al control de la producción alimentaria.
Educación
<ul style="list-style-type: none">- Educación de personal científico y no científico.
Diseño de experimentos
<ul style="list-style-type: none">- Número de muestras a preparar.- Definición de los intervalos entre cada factor a analizar.

Finalmente la versatilidad de la microbiología predictiva le ha permitido generar un sello distintivo al convertir los datos en conocimiento (T. a McMeekin *et al.*, 2006) lo que ha despertado el interés de la comunidad científica, generando estudios cada vez más específicos y estructurados con un mayor impacto dentro de la industria de los alimentos.

2. CAPÍTULO 2: Efecto de la cadena de frío sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, la calidad fisicoquímica y la alteración de jamones cocidos lonchados empacados al vacío

Buelvas Salgado, G.A.**, Patiño Gómez, J. H.***, Restrepo Florez, C. E.****

Resumen

Introducción. El abombamiento de los empaques, la sinéresis, los cambios de color, el limo superficial y la aparición de lechosidad, son deterioros comunes en jamones cocidos lonchados empacados al vacío (JCLEV), defectos de calidad que pueden causar rechazo por parte de los consumidores. **Objetivo.** Evaluar el efecto de las condiciones de almacenamiento en refrigeración de tiendas de barrio, mini mercados y supermercados sobre la calidad fisicoquímica y el deterioro sensorial visible de JCLEV; producto del metabolismo de bacterias ácido lácticas (BAL). **Materiales y métodos.** Para el desarrollo de esta investigación se evaluaron 6 marcas comerciales de JCLEV teniendo en cuenta dos tiempos de muestreo, 25 días antes de fecha de vencimiento (FV) y 15 días después, estimándose esta última a los 45 días a partir de la fecha de elaboración, estudiando los criterios microbiológicos de calidad establecidos en la norma (NTC 1325 de 2008), los recuentos de BAL y los parámetros fisicoquímicos (pH, acidez, a_w , humedad y cloruros). **Resultados.** Los JCLEV a tiempo t_0 (25 días antes de FV) presentaron una acidez entre 0.41 a 0.53 g ácido láctico/g de muestra, al igual que recuento de BAL en todas las marcas. Empleando el criterio propuesto por otros autores, que afirman que un producto cárnico cocido se encuentra alterado por acidificación cuando la cantidad de ácido láctico

** Ingeniero Agroindustrial, Aspirante a Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Asistente Técnico de Proyectos en Fundación INTAL

*** MsC, Director Fundación INTAL, Itagüi – Antioquia, director@fundacionintal.org

**** MsC, Directora Técnica fundación INTAL, Itagüi – Antioquia, crestrepo@fundacionintal.org

Correspondencia: Buelvas Salgado, G. A. asistecnico@fundacionintal.org

Artículo recibido 15/07/2012, Artículo aprobado 15/11/2012.

excede de 3-4 mg/g o pH ($\leq 5,8$); se encontró que dichos jamones estaban fisicoquímicamente deteriorados por acidificación a t_0 , sin cambios sensoriales visibles.

Conclusión. Debido a que los JCLEV no son productos fermentados, las BAL pueden ser empleadas como un indicativo del deterioro fisicoquímico, la calidad de los procesos de elaboración e inadecuadas condiciones de almacenamiento, que influyen negativamente sobre la estabilidad sensorial y fisicoquímica de los JCLEV.

Palabras claves: Jamón cocido, empacado a vacío, bacterias ácido lácticas, deterioro

Abstract

Introduction. Inflated packagesm syneresis, color changes, surface silt and the appearing of milkiness are common damages of vaccuun packed sliced cooked hams (VPSCH), quality defects that can cause rejection by the consumers. **Objetive.** Evaluating the effect of the refrigerated storage conditions in neighborhood stores, minimarkets and supermarkes, on the physical-chemical and on the sensorial quality and on the visible sensorial decay of VSPCH, due to the acid-lactic bacteria's (ALB) metabolism. **Materials and methods.** To develop this research work 6 commercial brands of VPSCH were evaluated, taking into account two sampling times: 25 days after the expiration date (ED) and 15 days the expiration date. For the latter, the results are estimated for a total period of 45 days talking into account the date of manufacture of product, evaluating the microbiological quality criteria (NTC 1325, 2008), the accounts of ALB and the physical-chemical standards (pH, acidity, a_w , humidity, chlorides). **Results.** Those with higher counts JCLEV BAL time t_0 (25 days before FV) had an acidity from 0.41 to 0.53 g lactic acid/g of sample. Using the criterion proposed by other authors, claiming that a packed cooked meat product is altered by acidification when the amount of lactic acid exceeds 3-4 mg / g pH (≤ 5.8), it was found that these hams were physicochemically damaged by acidification at t_0 , no visible sensory changes. **Conclusion.** Due to the fact VPSCH are not fermented products, ALB can be an indication of physical-chemical deterioration, of the quality of the manufacture process and of the inadequate storage conditions, which have negative effects on the sensorial and the physical-chemical stability of VPSCH.

Key words: cooked ham, vacuum packaging, acid lactic bacteria, deterioration.

Resumo

Introdução. O abombamento dos empacotamentos, a sinéreses, as mudanças de cor, o limo superficial e a aparição de algo leitoso são deteriorações comuns em presuntos cozidos embalados ao vácuo (JCLEV), defeitos de qualidade que podem causar rejeição por parte dos consumidores. **Objetivo.** Avaliar o efeito das condições de armazenamento em refrigeração de lojas de bairro, mini mercados e supermercados, sobre a qualidade físico-química e a deterioração sensorial visível de JCLEV, produto o metabolismo de bactérias ácido láctico (BAL). **Materiais e métodos.** Para o desenvolvimento desta investigação se avaliaram 6 marcas comerciais de JCLEV tendo em conta dois tempos de amostragem, 35 dias antes de data de vencimento (FV) e 15 dias depois de data de vencimento (FV); para este último os resultados se estimam para um total de 45 dias tendo em conta a data de elaboração do produto, avaliando os critérios microbiológicos de qualidade (NTC 1325 de 2008), as recontagens de BAL e os parâmetros físico-químicos (pH, acidez, a_w , umidade, cloretos). **Resultados.** Aqueles com maiores contagens JCLEV tempo t_0 BAL (25 dias antes FV) tinha uma acidez 0.41-0.53 g de ácido láctico / g de amostra. Usando o critério proposto por outros autores, afirmar que um produto de carne cozinhado embalado é alterada por acidificação, quando a quantidade de ácido láctico superior a 3-4 mg / g de pH ($\leq 5,8$), verificou-se que estes eram presuntos físico-quimicamente danificados pela acidificação em t_0 , não há alterações visíveis sensoriais. **Conclusão.** Devido a que os JCLEV não são produtos fermentados, as BAL podem ser empregadas como um indicativo da deterioração físico-químico, a qualidade dos processos de elaboração e inadequadas condições de armazenamento, que influem negativamente sobre a estabilidade sensorial e físico-química dos JCLEV.

Palavras: presunto cozido, embalado a vácuo, bactérias ácido lácticas, deterioração.

Introducción

En Colombia, existen aproximadamente 314 empresas nacionales dedicadas a la producción de cárnicos procesadas, donde solo el jamón lonchado representó en ventas 28 millones de dólares para el año 2002 (Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en Bogotá, 2005).

El sector cárnico ha presentado grandes pérdidas económicas, las cuales son ocasionadas mayoritariamente por la deficiencia en la cadena de frío durante la producción, transporte, almacenamiento y comercialización. Situación que potencializa el crecimiento de microorganismos resistentes al tratamiento térmico o aquellos que pueden penetrar secundariamente durante la manipulación en las salas de lonchado y empacado, presentándose entonces problemas de estabilidad microbiológica (Tirado, Paredes, Velázquez, y Torres, 2005).

Los microorganismos presentes son capaces de replicarse a grandes velocidades en condiciones de refrigeración, Flores, (2011), almacenó carne de res empacada al vacío por 14 días, como resultado encontró que la población microbiana estaba dominada por bacterias ácido lácticas (BAL) heterofermentativas facultativas, principalmente del genero *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus plantarum*.

Referente a las BAL existe una controversia, ya que, algunas investigaciones promueven el uso de estas en carne y los productos cárnicos como bioconservantes y otras afirman que son perjudiciales para los atributos sensoriales de los mismos. Las BAL han sido utilizadas como una opción para inhibir el crecimiento de la flora patógena (bioconservación); como los estudios reportados por Jacobsen, Budde, y Koch AG, (2003). sobre producción *in situ* de ácido láctico en filetes de carne de cerdo en los que se encontró que es posible inhibir el crecimiento de la flora patógena y de descomposición como *Escherichia coli*, *Serratia sp.*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas putida*, *Brochothrix thermosphacta*. Por otra parte, Fuente, Norma, Barboza, Eleazar (2010) reportaron que es posible evitar efectos negativos en la carne, como color, textura y sabor mediante el empleo de bacterias lácticas. López y Jiménez (2008) reportaron que *Lactobacillus casei*, disminuyó la concentración bacteriana de coliformes, y *Staphylococcus aureus*, en carne de res, observando un efecto bacteriostático. Por razones como las anteriores las BAL son reconocidas como seguras, además, son microorganismos propios del producto que muchas veces benefician al mismo (Vásquez, Suárez, y Zapata, 2009).

Sin embargo, en productos como salchichas y emulsiones cárnicas envasadas al vacío y otras carnes procesadas almacenadas en temperaturas de refrigeración, los

microorganismos pertenecientes al grupo de las BAL, como *Lactobacillus sakei* y *L. Curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. Carnosum*, *L. Gasicomitatum*, *Weissell spp* y *Carnobacterium spp* (Chenoll, Macian, Elizaquivel, y Aznar, 2007), son considerados como especies bacterianas alterantes (Ossa, Coral, y Vanegas, 2010; Restrepo, Arango, Amézquita, y Restrepo, 2001), ya que, su actividad metabólica puede provocar acidez, decoloración, producción de gas, pérdida de sabores y olores, exudado lechoso, hinchazón del empaque, cambios del pH (Zárate, 2007), sin afectar la inocuidad del producto pero si su calidad sensorial (de la Fuente y Barbosa, 2010; Velázquez, 2012).

A pesar de lo anterior en la legislación colombiana para productos cárnicos procesados cocidos (NTC-1325, 2008); entre los parámetros microbiológicos solo contempla ciertos rangos de valores máximos permisibles para identificar el nivel de buena calidad, como son: coliformes totales (100UFC/g), *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva (<100 UFC/g), *Listeria monocytogenes* (/25), *Salmonella* (/25), Esporas *Clostridium* sulfito reductor (<10 UFC/g), *Escherichia coli* (<10 UFC/g), siendo consideradas las bacterias ácido lácticas como propias de productos madurados y fermentados como (salami, peperoni, entre otros) que proporcionan beneficios sobre la calidad del producto final.

En la actualidad los consumidores son más exigentes respecto a la calidad de los productos cárnicos elaborados (Cousté, 2001); por lo tanto, el **objetivo** de este estudio fue evaluar el efecto de las condiciones de refrigeración utilizadas en tiendas de barrio, mini mercados y supermercados, sobre el crecimiento de BAL y las respectivas reacciones de deterioro fisicoquímico producto de la proliferación de estos microorganismo durante el almacenamiento en refrigeración; así como de deterioros sensoriales visibles.

Materiales y métodos

2.1 Muestreo. Se adquirieron seis marcas de JCLEV de cerdo (producto cárnico procesado, cocido, embutido, moldeado, previamente elaborado con músculo entero o troceado, con la adición de sustancias de uso permitido, que no requieren de procesos fermentativos para resaltar atributos sensoriales o aumentar su estabilidad durante el almacenamiento) que se denominaron por M1 M2,..., M6, comprados en cadenas de

supermercados, mini mercados y tiendas de barrio, de Medellín; los cuales se mantuvieron en cava de refrigeración en la fundación INTAL “Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria” a una temperatura de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 45 días (aproximadamente 15 días después de la FV), simulando condiciones de refrigeración doméstica. Por otro lado, características como la marca, ingredientes, formulación, no fueron parámetros definitivos para la selección de los JCLEV.

El criterio de selección, fueron jamones de cerdo categoría estándar (NTC-1325 del 2008), que mantuvieran un rango parecido en tiempo de la fecha de caducidad (25 ± 2 días antes FV), ninguna de las muestras sobrepasó la fecha de caducidad.

2.1.2 Criterio de muestreo. Se emplearon dos tiempos de muestreo, el primero inmediatamente después de adquiridos los JCLEV. El segundo una vez terminado el periodo de almacenamiento 45 días (aproximadamente 15 días después de la FV), o antes si los JCLEV presentan deterioro sensorial visible (pérdida de vacío, abombamiento en el empaque, cambios de color, limo superficial, aparición de lechocidad). En ambos tiempos de muestreo se analizaron los requisitos microbiológicos para productos cárnicos procesados cocidos (NTC-1325, 2008).

2.2 Recuento de microorganismos. Inicialmente se realizó para verificar el cumplimiento de los requisitos microbiológicos para productos cárnicos procesados cocidos, en conformidad con la NTC-1325 (2008), específica para productos cárnicos procesados no enlatados. Evaluando los recuentos de aerobios mesófilos, según NTC-4519. (2008). Coliformes según NTC-4458. (2009), *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, de acuerdo NTC-4779. (2007). Esporas de *Clostridium* sulfito reductor (ECSR), según la norma NTC-4834. (2000). y la determinaciones de *Salmonella*, conforme a la norma NTC-4574. (2007). *Listeria monocytogenes*, según NTC-4666. (1999). y *Escherichia coli* 0157 conforme a la norma NTC-4899 (2001). Además de lo anterior se realizó el recuento de bacterias ácido lácticas, según la metodología planteada por Ossa *et al.* (2010).

2.2.1 Recuento de Bacterias ácido lácticas. Se siembra 1 mL de las diluciones estimadas en placa de Petri en profundidad, se adicionan 13 mL de agar MRS (Man

Rogosa Sharpe, Sharlau – España) y finalmente se incubó a 37°C por 48 horas. Las placas que presentaban entre 25 y 250 colonias se realizaron pruebas de confirmación, identificando su morfología (cocos Gram positivos), pruebas de catalasa y oxidada (Reuter, 1985).

2.3 Parámetros fisicoquímicos. Se evaluaron los parámetros, acidez, pH, humedad y actividad de agua (a_w), cloruros en tres replicas para cada muestra de JCLEV.

La **acidez** titulable se determinó por titulación con NaOH 0.1N utilizando fenolftaleína como indicador y expresada en porcentaje de ácido láctico por 100 g de muestra. El **pH** se determinó usando un titulador automático marca Hanna pH 211 por inmersión del electrodo en la muestra, con previa calibración en soluciones de pH de 4 y 7. La **humedad**, se determinó según el método gravimétrico directo AOAC-925.09. (1990), evaluando la pérdida de peso por evaporación de agua en estufa BINDER FD 53-ULE2 empleando una balanza humidímetro marca Ohaus MB 35. La actividad de agua (a_w) se determinó mediante un higrómetro de punto de rocío a 25°C (Aqualab Decagón modelo CX3). Los **cloruros** se determinaron por titulación con $AgNO_3$ 0,1 N y fueron expresados en porcentaje de NaCl por 100 g de muestra, según método Mohr (Kirk. 1996).

2.4 Diseño de experimentos. Se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado en dos tiempos de almacenamiento ($t_0 = 25$ días antes de FV y $t_1 = 45$ días de almacenamiento (aproximadamente 15 días después de la FV), utilizando dos factores fijos, el primer factor la marca, en seis niveles correspondientes a cada marca (M1, M2, ..., M6) y el segundo factor es la procedencia de las muestras, en tres niveles ($P_0 =$ Tienda de barrio, $P_1 =$ Mini mercados, $P_2 =$ Supermercados). A cada uno de los tiempos se asignaron 18 muestras de JCLEV de las marcas comerciales en condiciones similares. Las mediciones de las variables fueron realizadas por triplicado y los resultados del experimento fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizándose el método LSD (mínimas diferencias significativas) como método de comparaciones múltiples, con un nivel de significación del 5% ($\alpha=0.05$). El ANOVA se realizó con el paquete estadístico STATGRAPHICS plus versión Centurión XVI ("Statgraphics Centurion XVI," 2009).

Resultados

3.1 Recuentos microbiológicos: Los resultados microbiológicos para el primer tiempo de muestreo ($t_0 = 25$ días antes de FV) de JCLEV, procedentes de supermercados, mini mercados y tiendas de barrio son reportados en la tabla 1.

Tabla 1: Valoración de los requisitos microbiológicos en los jamones cocidos lonchados empacados al vacío.

TIPO DE PRODUCTO		RECUENTOS MICROBIOLÓGICOS (\log_{10}) PARA PRODUCTOS CÁRNICOS PROCESADOS COCIDOS – NTC 1325 2008							
PROCEDECENCIA	Marca	Aerobios Mesófilos	Coliformes totales	S. aureus	ECSR *	Salmonella	Listeria	E coli	BAL
	Supermercado	M1	5,677±(0,172) ^{fg}	3,041±(0,0) ^d	2,1	0	Ausente	Ausente	10
M2		5,4815±(0,112) ^{ef}	0 ^a	0	0	Ausente	Ausente	0	2,54±(0,06) ^d
M3		6,094±(0,164) ^{gh}	1,791±(0,5273) ^c	0	0	Ausente	Ausente	0	4,45±(0,03) ^f
M4		0,0±(0,0) ^a	0 ^a	0	0	Ausente	Ausente	0	0 ^a
M5		3,260±(0,059) ^{cd}	0 ^a	0	0	Ausente	Ausente	0	0 ^a
M6		3,660±(0,4742) ^d	0 ^a	0	0	Ausente	Ausente	0	0 ^a
Mini mercado	M1	5,093±(0,076) ^e	2,915±(0,218) ^d	0	0	Ausente	Ausente	0	3,98±(0,005) ^e
	M2	4,9720±(0,037) ^e	0,1854±(0,3211)	0	0	Ausente	Ausente	0	1,02±(0,89) ^b
	M3	5,003±(0,077) ^e	1,856±(0,1934) ^c	0	0	Ausente	Ausente	0	3,64±(0,03) ^e
	M4	2,946±(0,098) ^{bc}	0 ^a	0	0	Ausente	Ausente	0	0 ^a
	M5	0,3333±(0,577) ^a	0 ^a	0	0	Ausente	Ausente	0	0 ^a
	M6	0,3333±(0,577) ^a	0 ^a	0	0	Ausente	Ausente	0	0 ^a
Tienda de barrio	M1	6,164±(0,204) ^{gh}	0 ^a	0	0	Ausente	Ausente	0	1,65±(0,32) ^c
	M2	5,982±(0,821) ^{fg}	2,0122±(0,901) ^c	0	0	Ausente	Ausente	0	3,61±(0,26) ^e
	M3	6,535±(0,3224) ^h	0,880±(0,763) ^b	0	0	Ausente	Ausente	0	2,22±(0,05) ^d
	M4	3,4526±(0,23) ^{cd}	0 ^a	0	0	Ausente	Ausente	0	0 ^a
	M5	3,453±(0,137) ^{cd}	0 ^a	0	0	Ausente	Ausente	0	0 ^a
	M6	2,416±(0,068) ^b	0 ^a	0	0	Ausente	Ausente	0	0 ^a

Los superíndices diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las marcas para cada condición de almacenamiento. Valor promedio \pm Desviación estándar SD. *Esporas de Clostridium sulfito reductor (ECSR).

Al comparar los resultados de la tabla 1 con los requisitos microbiológicos para productos cárnicos procesados cocidos (NTC-1325, 2008), se encuentra que tres de las seis marcas comerciales de JCLEV, (M1, M2 y M3), de las tres procedencias no cumplen con los criterios de calidad para aerobios mesófilos superando el límite máximo permitido de calidad, (5 \log_{10} UFC/gr) lo que puede indicar una posible contaminación cruzada del

producto terminado para estas marcas. Las marcas M4, M5 y M6 de las tres procedencias se encuentran dentro del límite permitido.

En el caso de los coliformes totales, *Staphylococcus aureus*, coagulasa positivo y *E. coli* se presentó que solo la marca M1 procedente de supermercados, superaba el límite máximo permitido de calidad $2,69 \log_{10}$ UFC/g, $2 \log_{10}$ UFC/g y $1 \log_{10}$ UFC/g respectivamente; además, esta marca procedente de mini mercados supera también el límite máximo permitido de coliformes totales. El resto de marcas analizadas se encontraron dentro de los requisitos establecidos. Para el caso de *Salmonella*, *Listeria* y Esporas de *Clostridium* Sulfito Reductor (ECSR), no se presentó crecimiento en ninguna de las muestras evaluadas.

3.2 Relación entre las BAL, las propiedades fisicoquímicas y el deterioro de JCLEV.

El análisis de varianza realizado para determinar el efecto de las condiciones de almacenamiento en refrigeración sobre el recuento de BAL y las propiedades fisicoquímicas de JCLEV provenientes de mini mercados (MM), supermercados (SM) y tiendas de barrio (TB), almacenados en refrigeración durante 45 días, mostró que tanto la procedencia como la marca, el tiempo y sus interacciones ejercen efectos significativos ($p \leq 0,05$), estos resultados, así como los de la prueba de rangos múltiples son presentados en tabla 2.

Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas y recuento de BAL de seis marcas comerciales de JCLEV (M1, M2, ..., M6) obtenidas en supermercados (SM), mini mercados (MM) y tiendas de barrio (TB) por un periodo de almacenamiento de 25 días antes de FV y 15 días después de FV (45 días a partir de fecha de fabricación).

PROCEDENCIA	Marca	Log ₁₀ BAL		%X _{bh}		A _w	
		t ₀	t ₁	t ₀	t ₁	t ₀	t ₁
Supermercado	M1	3,64±0,22 ^{gh}	7,62±0,22 ^m	66,43±0,46 ^{bcde}	70,21±0,387 ^{ghijkl}	0,991±0,002 ⁰	0,98±0,002 ^{ghijkl}
	M2	2,55±0,06 ^{ef}	7,63±0,05 ^m	65,70±4,12 ^{bc}	67,11±2,014 ^{bcdef}	0,981±0,001 ^{klmn}	0,97±0,003 ^{bcdefg}
	M3	4,45±0,03 ^{ij}	7,63±0,03 ^m	59,03±2,90 ^a	66,56±0,441 ^{bcdef}	0,984±0,002 ^{mn}	0,96±0,006 ^{ab}
	M4	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	68,91±0,00 ^{defghijk}	71,35±0,122 ^{hijklm}	0,981±0,001 ^{klmn}	0,97±0,002 ^{abc}
	M5	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	68,35±0,73 ^{cdefghi}	75,37±1,105 ⁿ	0,978±0,003 ^{hijklm}	0,97±0,012 ^{bcdefg}
	M6	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	66,76±1,84 ^{bcdef}	71,76±1,029 ^{jklm}	0,979±0,001 ^{ijklmn}	0,97±0,002 ^{bcd}
Mini mercado	M1	3,99±0,00 ^{hi}	7,63±0,004 ^m	66,91±0,26 ^{bcdef}	69,09±0,000 ^{cdefghijkl}	0,980±0,002 ^{klmn}	0,97±0,004 ^{cdefgh}
	M2	1,03±0,73 ^{bc}	7,63±0,72 ^m	70,50±0,65 ^{hijklm}	69,20±1,421 ^{efghij}	0,985±0,003 ^{no}	0,98±0,001 ^{lmn}
	M3	3,65±0,03 ^{hg}	7,15±0,02 ^{klm}	64,78±0,75 ^b	68,44±0,751 ^{cdefgh}	0,976±0,004 ^{ghijkl}	0,96±0,006 ^{ab}
	M4	0,00±0,00 ^a	1,30±0,22 ^{bc}	68,93±0,10 ^{defghijk}	72,91±0,350 ^{lmn}	0,979±0,002 ^{ijklmn}	0,96±0,007 ^a
	M5	0,00±0,00 ^a	4,78±0,22 ^j	69,00±0,10 ^{defghijk}	72,20±0,966 ^{jklmn}	0,973±0,002 ^{cdefghi}	0,97±0,006 ^{efghij}
	M6	0,00±0,00 ^a	3,04±0,22 ^g	66,13±0,74 ^{bcd}	73,40±0,531 ^{mn}	0,971±0,003 ^{cdefgh}	0,97±0,001 ^{bcd}
Tienda de barrio	M1	1,65±0,27 ^{cd}	6,96±0,27 ^{akl}	56,63±1,88 ^a	70,21±0,387 ^{ghijkl}	0,977±0,001 ^{hijkl}	0,98±0,002 ^{ghijkl}
	M2	3,61±0,22 ^{fg}	6,64±0,28 ^k	67,23±0,15 ^{bcdefg}	69,20±1,421 ^{efghij}	0,974±0,003 ^{efghijk}	0,97±0,003 ^{bcdefg}
	M3	2,23±0,04 ^{de}	7,46±0,04 ^{lm}	69,83±0,47 ^{fghijkl}	68,74±0,384 ^{defghi}	0,981±0,002 ^{klmn}	0,97±0,002 ^{abc}
	M4	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	69,84±0,34 ^{fghijkl}	71,78±0,295 ^{ijklm}	0,968±0,004 ^{abcde}	0,98±0,003 ^{fghijk}
	M5	0,00±0,00 ^a	1,00±1,41 ^b	69,72±2,81 ^{fghijkl}	72,04±0,355 ^{klm}	0,969±0,000 ^{bcdefg}	0,98±0,001 ^{lmn}
	M6	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	69,42±0,28 ^{efghijk}	70,88±1,035 ^{hijklm}	0,972±0,000 ^{cdefgh}	0,97±0,001 ^{bcdef}

PROCEDENCIA	Marca	pH		% acidez		% cloruros	
		t ₀	t ₁	t ₀	t ₁	t ₀	t ₁
Supermercado	M1	6,08±0,14 ^{ijk}	5,55±0,042 ^{bcd}	0,52±0,08 ^{klm}	0,30±0,028 ^{bc}	2,07±0,16 ^{de}	1,89±0,076 ^{abc}
	M2	6,10±0,04 ^{jk}	5,67±0,054 ^{cdef}	0,50±0,01 ^{kl}	0,46±0,002 ^{hij}	2,47±0,01 ^{ijkl}	2,42±0,045 ^{hij}
	M3	5,71±0,26 ^{defg}	5,21±0,012 ^a	0,46±0,03 ^{jk}	0,42±0,026 ^{ghi}	1,89±0,07 ^{abc}	1,89±0,059 ^{abc}
	M4	6,09±0,17 ^{kj}	5,56±0,005 ^{bcd}	0,33±0,01 ^{cde}	0,45±0,023 ^{hij}	2,59±0,02 ^{kl}	2,45±0,043 ^{ijk}
	M5	5,65±0,18 ^{cdef}	5,55±0,125 ^{bcd}	0,36±0,01 ^{def}	0,41±0,015 ^{fghi}	2,38±0,07 ^{ghij}	2,61±0,092 ^l
	M6	5,95±0,16 ^{ghi}	6,33±0,009 ^{kl}	0,32±0,04 ^{cd}	0,22±0,023 ^a	1,81±0,09 ^{ab}	2,32±0,050 ^{fghi}
Mini mercado	M1	6,07±0,03 ^{ij}	5,63±0,022 ^{cde}	0,59±0,04 ^{no}	0,46±0,025 ^{hij}	2,31±0,01 ^{fghi}	2,27±0,126 ^{fgh}
	M2	6,00±0,03 ^{hi}	5,40±0,048 ^{abc}	0,47±0,04 ^{ijk}	0,29±0,022 ^{bc}	2,59±0,17 ^{kl}	1,80±0,062 ^a
	M3	5,70±0,10 ^{defg}	5,21±0,012 ^a	0,59±0,05 ^{no}	0,42±0,026 ^{ghi}	2,20±0,09 ^{ef}	1,89±0,059 ^{abc}
	M4	5,75±0,13 ^{defgh}	5,86±0,062 ^{efghi}	0,53±0,01 ^{lm}	0,50±0,037 ^{kl}	2,78±0,03 ^m	2,48±0,077 ^{kl}
	M5	5,91±0,13 ^{fghi}	6,29±0,008 ^{kl}	0,57±0,01 ^{mn}	0,25±0,022 ^{ab}	1,96±0,02 ^{bcd}	2,39±0,098 ^{ghij}
	M6	5,69±0,32 ^{defg}	6,42±0,008 ^l	0,48±0,05 ^{kl}	0,23±0,016 ^a	2,44±0,03 ^{ijk}	1,95±0,081 ^{abcd}
Tienda de barrio	M1	5,68±0,04 ^{def}	5,55±0,042 ^{bcd}	0,50±0,05 ^{kl}	0,30±0,028 ^{bc}	2,22±0,21 ^{ef}	1,89±0,076 ^{abc}
	M2	5,55±0,32 ^{bcd}	5,67±0,054 ^{cdef}	0,40±0,02 ^{fgh}	0,46±0,002 ^{hij}	1,97±0,09 ^{cd}	2,42±0,045 ^{hij}
	M3	5,69±0,28 ^{defg}	5,33±0,005 ^{ab}	0,63±0,01 ^o	0,38±0,005 ^{efg}	1,99±0,03 ^{cd}	1,87±0,026 ^{abc}
	M4	5,34±0,25 ^{ab}	6,33±0,017 ^{kl}	0,78±0,04 ^p	0,31±0,005 ^{bcd}	2,88±0,04 ^m	1,96±0,031 ^{bcd}
	M5	5,88±0,12 ^{efghi}	6,31±0,071 ^{kl}	0,46±0,01 ^{ij}	0,29±0,025 ^{bc}	2,39±0,03 ^{ghij}	2,44±0,038 ^{ijk}
	M6	5,90±0,09 ^{fghi}	6,32±0,012 ^{kl}	0,51±0,03 ^{kl}	0,26±0,009 ^{ab}	1,92±0,02 ^{abcd}	2,25±0,089 ^{fg}

Los superíndices diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (p≤0,05) entre las marcas para condición de almacenamiento. Valor promedio ± Desviación estándar.

Discusión

Los resultados descritos en la tabla 2, mostraron un incremento significativo ($p \leq 0,05$) de las BAL y la humedad, acompañado de un descenso del pH, a_w , acidez y cloruros en la mayoría de las marcas de JCLEV respecto al tiempo de almacenamiento (ver tabla 2). Comportamiento atribuido a la actividad metabólica de las BAL (Rodríguez, 2003).

A tiempo t_0 (25 días antes de FV), después de los aerobios mesófilos; las BAL son la población microbiana con mayor crecimiento sin alcanzar un valor crítico ($6 \log_{10}$ UFC/gr) donde se generen alteraciones al producto final; sin embargo, a t_1 (15 días después de FV), todas las muestras evaluadas a nivel sensorial presentaron, pérdida de vacío, líquido dentro del empaque (sinéresis), y cambio de color (Chenoll *et al.*, 2007; de la Fuente y Barbosa, 2010), siendo más pronunciadas estas alteraciones, en los productos con mayores recuentos de BAL (marcas M1, M2, M3); comportamiento similar en las tres procedencias.

Para el caso de las marcas (M1, M2 y M3) el incremento de las BAL fue más prominente, sin importar su lugar de almacenamiento; a t_1 dichas marcas superan el límite crítico establecido para las BAL, $6 \log_{10}$ UFC/gr (Chenoll *et al.*, 2007; de la Fuente y Barbosa, 2010), lo que provocó un descenso del pH, hasta valores de 5,21; por efecto de la actividad metabólica de las BAL, la cual genera grandes cantidades de ácidos orgánicos (ácido láctico), alcanzando su máxima concentración cuando el crecimiento alcanza 10^7 UFC/g en la superficie de JCLEV, este ácido se encuentra acompañado de la síntesis de ácidos grasos de cadena corta los cuales ocasionan cambios en el olor y rechazo sensorial (Chenoll *et al.*, 2007).

Por su parte al comparar los resultados obtenidos en a t_0 con el criterio descrito por Rodríguez (2003), quien afirmó que, un JCLEV se encuentra alterado cuando la cantidad de ácido láctico excede de 3-4 mg/g o presenta un pH $\leq 5,8$, se determinó que todos los JCLEV son rechazados por acidificación a t_0 . Dicha acidificación provocó posteriormente, las alteraciones sensoriales visibles durante el almacenamiento; el descenso del pH y la inhibición del crecimiento de otras poblaciones microbianas (Matagaras, Dronis, Vaidanis, y Metaxopoukos, 2006). convirtiendo a este grupo de microorganismos en flora

dominante. Investigaciones recientes han mostrado a *Lactobacillus sake* y *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*, como los principales microorganismos responsables de la alteración a 4°C y 12°C, debido a la recontaminación en la sala de lonchado (Matagaras *et al.*, 2006).

Las alteraciones de los JCLEV se atribuyen a las condiciones de fabricación, los ingredientes, la excesiva manipulación después del tratamiento térmico, el empaque, los canales de distribución, las deficiencias en la cadena de frío y por último a las inadecuadas condiciones de almacenamiento en refrigeración en los supermercados, mini mercados y tiendas de barrio, ya que, en la mayoría de supermercados se sobrepasan las temperaturas óptimas de conservación ($2\pm 1^\circ\text{C}$) de JCLEV, alcanzando temperaturas próximas a los $12\pm 2^\circ\text{C}$ (Tirado *et al.*, 2005).

En cuanto a los mini mercados y tiendas de barrio, es muy común que las condiciones de almacenamiento presenten perfiles de temperatura fluctuantes, es decir, cercanas a la congelación o en ocasiones sin refrigeración, este tipo de cambios en las condiciones de almacenamiento, provoca una interacción entre el producto y el empaque que puede acelerar el deterioro del JCLEV, ya que, para retardar alteraciones como la rancidez y la decoloración, es necesario que los empaque no permitan la entrada de oxígeno y luz (Gerrero, Gou, y Arnau, 1999), pero al momento de llegar a temperaturas de congelación, es necesario que el material de empaque tampoco permita la entrada de humedad (Lin y Sebranek, 1979), requerimientos técnicos de empackado, que en la mayoría de casos no se cumple, como las marcas (M1, M2, M3), siendo estos productos más propensos al crecimiento de la flora microbiana alterante (Bacterias ácido lácticas) y así mismos a alteraciones fisicoquímicas y posteriormente sensoriales.

Otro aspecto a considerar es la composición química del jamón y la disponibilidad de nutrientes del mismo como, su bajo contenido de sal (2% en promedio), la presencia de nitritos (150mg/kg), (Matagaras *et al.* 2006), un pH alrededor de 6,0 y una alta actividad de agua (0,945); son condiciones no favorables para inhibir el incremento de la población de los microorganismos asociados con el deterioro, Por todas las razones anteriores el

JCLEV es considerado como uno de los productos cárnicos más perecederos (López y Jiménez, 2008).

Esté mismo crecimiento poblacional provoca el metabolismo de la glucosa, D-lactato, etanol o acetato y se produce dióxido de carbono, el cual trae como consecuencia la pérdida de vacío del empaque, comportamiento generalmente atribuido al género *Leuconostoc* (López y Jiménez, 2008). Dadas estas condiciones en la mayoría de los casos comienza un aumento de la humedad y un descenso del a_w del producto por efecto de la pérdida de agua (sinéresis); dicha sinéresis según Gonzáles, Suárez, y Martínez (2009), incrementa la adhesividad y la dureza instrumental acortando la vida de anaquel. Además el crecimiento exponencial de los microorganismos, genera cambios de color (tonalidades verdosas), limo en la superficie del producto generalmente asociado al crecimiento de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (Pérez y Andújar, 2000; Sofos, 1994).

Para contrarrestar los problemas anteriores la industria cárnica ha empleado la adición de conservantes dentro de los JCLEV, para retardar el crecimiento de los microorganismos deteriorantes, además funciones tecnológicas que estos cumplen, como es el caso del cloruro de sodio (NaCl), producto que en concentraciones del 5% se usa para inhibir el crecimiento de la flora anaeróbica; pero la demanda actual se concentra en desarrollar productos bajos en sal, lo que provoca que se empleen concentraciones inferiores al 3%. Los productos analizados todos se encuentran por debajo de este valor, lo que genera que el crecimiento de BAL, sea más acelerado (Gonzáles *et al.*, 2009).

Para finalizar, la legislación colombiana no contempla a este grupo de microorganismo como deteriorantes de este tipo de productos (NTC-1325, 2008), debido a que las bacterias ácido lácticas son consideradas propias de madurados y fermentados como (salami, peperoni, entre otros) que proporcionan beneficios sobre la calidad del producto final productos (Borch y Molin, 1989). Pero para los jamones cocidos lonchados empacados al vacío que no requieren de procesos fermentativos para resaltar atributos sensoriales o aumentar su estabilidad durante el almacenamiento, son contraproducentes para las características sensoriales y fisicoquímicas del jamón. Como los resultados

reportados por Ossa *et al.* (2010), quien caracterizó la microbiota de jamones de cerdo asociada al deterioro por abombamiento del empaque, encontrando que el deterioro está relacionado con la presencia de BAL, encontradas en las zonas de tajado y en el producto terminado, de este último se presentaron mayoritariamente *Lactobacillus*. (Zárate, 2007) en la Universidad de Callao, evaluó el efecto de la concentración de cloruro de sodio y del pH sobre el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*, en embutidos cocidos envasados al vacío, en los cuales encontró que este microorganismo es considerado como la especie bacteriana alterante con mayor actividad de putrefacción de salchichas y emulsiones cárnicas envasadas al vacío y otras carnes procesadas bajo temperaturas de refrigeración.

De acuerdo a lo anterior, las BAL pueden ser empleadas como un indicativo del deterioro fisicoquímico, la calidad de los procesos de elaboración e inadecuadas condiciones de almacenamiento, que influyen negativamente sobre la estabilidad sensorial y fisicoquímica de los JCLEV (Espinoza, Leija, Amaya, Vela, y Rodríguez, 2003), debido a que la fermentación no contribuye a resaltar los atributos sensoriales y estabilidad del producto.

Conclusiones

- Todos los jamones desde el punto fisicoquímico se encuentran alterados 25 días antes de la fecha de vencimiento, sin presentar deterioros sensoriales visibles, en las condiciones actuales de almacenamiento; atribuido a la producción de ácido láctico de las bacterias ácido lácticas presentes en el mismo.
- La cadena de frío y los controles que actualmente se aplican en los puntos de distribución, venta y en las empresas para evitar el deterioro de los productos son ineficientes ya que, la presencia de las BAL acortan la vida de anaquel de los JCLEV, provocando pérdida de vacío, cambios de color y sinéresis.
- Las bacterias ácido lácticas pueden ser empleadas como un indicativo del deterioro fisicoquímico, la calidad de los procesos de elaboración e inadecuadas condiciones de almacenamiento, ya que influyen negativamente sobre la estabilidad sensorial y fisicoquímica de los JCLEV.

Referencias bibliográficas

- AOAC-925.09. (1990). Official Methods of Analysis. Quantitative Chemistry. Solids/Total solids, Moisture.
- Borch, E., y Molin, G. (1989). The aerobic growth and product formation of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochotrix* and *Carnobacterium* in batch cultures. *Appl. Microbiology and Biotechnology*, 30, 8188.
- Cousté, V. L. (2001). Aplicación de HACCP en la elaboración de jamón crudo. *INVENIO*.
- Chenoll, E., Macian, M. C., Elizaquivel, P., y Aznar, R. (2007). Lactic acid bacteria associated with vacuum-packaged cooked-meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. *J. Appl. Microbiol.*, 102, 498-508.
- de la Fuente, N. M., y Barbosa, J. E. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Ciencia y Salud. Universidad Guanajuato. México*, 20(1), 43-42.
- Espinoza, A., Leija, M. d. I. A., Amaya, C. A., Vela, M. M., y Rodríguez, J. A. (2003). Determinación microbiológica de vida de anaquel de alimentos proteicos. *Universidad Autónoma de Nuevo León*.
- Flores, C., Leal, M., Ruíz, J., Sánchez, E., Moreno, M., Castro, G., y Barboza, Y. (2011). Storage time and identification of lactic bacteria in vacuum packed ground beef meat. *Revista científica., FCV - LUZ. Facultad de medicina Universidad de Zulia. Maracaibo. Venezuela*.(5), 425-433.
- Fuentes, S., Norma, M., Barboza, C., Eleazar, J., (2010) Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*. 20, 42 - 52.
- Gerrero, L., Gou, P., y Arnau. (1999). Estudio de la actitud de los consumidores frente al jamón cocido loncheado envasado en atmosfera modificada. En H. G. Almeida TCA., Damasio MH y da silva MAAP (Ed.), *Avances en análisis sensorial* (pp. 167-178). Sao Pablo: CYTED.
- González, M., Suárez, H., y Martínez, O. (2009). Influence of cooking process and storage temperatura on physicochemical, microbiological and sensorial characteristic of sliced ham. *Revista Colombiana de ciencias peciarias RCCP.*, 336-348.
- Jacobsen, T. Budde, BB. Koch, AG. (2003). Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology.*, 95, 242-249.

- Kirk, S. Sawyer, R. Egan, H. (1996). Metodo Mohr. Determinación de cloruros en muestra. Composición y análisis de alimentos de Pearson, segunda edición; Compañía editorial continental SA de CV, México.
- Lin, H. S., y Sebranek, J. G. (1979). Effect of sodium nitrite concent and packaging conditions on color stability and rancidity development in sliced bologna. *J. Food Sci.*, 44, 1451-1454.
- López, A., y Jiménez, R. (2008). Bioconservación de carne de res y cerdo. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química* (47).
- Matagaras, M., Dronisos, E. H., Vaidanis, A., y Metaxopoukos, I. (2006). Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under coonstant and dynamic temperatura storage conditions. *J. Food Sci.*, 71(6), 157-167.
- NTC-1325. (2008). Industria alimentaria. Productos cárnicos procesados no enlatados. Bogotá, Colombia: Instituto de Normas Técnicas Colombianas.
- NTC-4458 (2007). Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos. Bogotá, Colombia: Instituto de Normas Técnicas Colombianas.
- NTC-4519 (2009). Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos técnica de recuento de colonias a 30°C. Bogotá, Colombia: Instituto de Normas Técnicas Colombianas.
- NTC-4574. (2007). Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la detección de salmonella spp. Bogotá, Colombia: Instituto de Normas Técnicas Colombianas.
- NTC-4666. (1999). Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la determinación de *Listeria monocytogenes*. Parte . Método de detección. Bogotá, Colombia: Instituto de Normas Técnicas Colombianas.
- NTC-4779. (2007). Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de Estafilococos cuagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Bogotá, Colombia: Instituto de Normas Técnicas Colombianas.

- NTC-4834. (2000). Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de clostridium sulfito reductores e identificación de *Clostridium perfringes*. Técnica de recuento de colonias. Bogotá, Colombia: Instituto de Normas Técnicas Colombianas.
- NTC-4899. (2001). Microbiología de alimentos y alimentos para consumo humano y animal. Método para la determinación de *Escherichia coli* 0157. Bogotá, Colombia: Instituto de Normas Técnicas Colombianas.
- Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en Bogotá. El sector de los procesados cárnicos en Colombia. (2005 Feb). *Notas sectoriales*. Acceso 7 Mar 2010, de <http://www.oficinascomerciales.es/icex/cma/contentTypes/common/records/viewDocument/000.bin?doc=456268>.
- Ossa, J., Coral, A., y Vanegas, M. (2010). Microbial of cooked pork hams associated of blown pack Spoilage. *Universidad de los Andes, junio 23, 2078, 2086*.
- Pérez, D., y Andújar, G. (2000). Cambios de coloración de los productos cárnicos. *Revista Cubana Alimentos y Nutrición, 14 (2), 114-123*.
- Restrepo, D., Arango, C., Amézquita, y Restrepo, R. (2001). Industria de carne: Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Reuter, G. (1985). Elective and selective media for lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol., 2, 55-58*.
- Rodríguez, M. R. (2003). *Desarrollo y validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos*. (Tesis Doctoral), Universidad de Cordoba.
- Sofos, J. N. (1994). Chap. 14. Microbial growth and its control in meat, poultry and fish. En G. Britain (Ed.), *Quality Attributes and their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products*: Blackie Academic & Professional.
- Statgraphics Centurion XVI (Version 19.0.07). (2009): StatPoint Technologies, Inc.
- Tirado, J., Paredes, D., Velázquez, G., y Torres, J. A. (2005). Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados. *Ciencia y Tecnología Alimentaria, 5, 66 – 76*.
- Vásquez, S. M., Suárez, H., y Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev. Chil. Nutr., 36(1)*.

- Velázquez, E. (2012). *Aislamiento de Leuconostoc spp. con capacidad para deteriorar jamón cocido, rebanado y empacado al vacío y su inactivación mediante alta presión hidrostática y ondas de choque*. (Maestría), Universidad Autónoma de Querétaro.
- Zárate, E. (2007). Efecto de la concentración de cloruro de sodio y del pH sobre el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* en embutidos cocidos empacados al vacío usando modelos matemáticos. *Ciencia y Tecnología. Universidad nacional de Callao. Vicentenario de Investigación* (9)

3. CAPÍTULO 3: Desarrollo de un modelo predictivo del crecimiento *Leuconostoc mesenteroides* para estimar vida útil de jamones cocidos lonchados empacados al vacío

Buelvas Salgado, G.A M.Sc.¹, Patiño Gómez, J. H. PhD.², Nuñez de Villavicencio, M M.Sc.³, Gómez Álvarez L. M.², Cano Salazar J. A. PhD.²

Resumen

ANTECEDENTES: El *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides*) ha sido considerado como uno de los principales alteradores de diversos productos cárnicos tales como jamón cocido, salami, productos curados, salchichas tipo viena y frankfurt. Responsable del abombamiento de los empaques, sinéresis, cambios de color, limo superficial y aparición de lechosidad, provocando rechazo por parte de los consumidores de jamones cocidos lonchados empacados al vacío (JCLEV). **OBJETIVOS:** Modelar el crecimiento del *L. mesenteroides* en función de la temperatura de almacenamiento (refrigeración) y la concentración de sal (NaCl) en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis para predecir la vida útil de JCLEV. **MÉTODOS:** Se utilizó caldo TSB, al cual se le adicionó concentraciones de 1,5 a 3,5% de NaCl. Luego fueron sellados con una capa de \pm 1cm de parafina. Para los tratamientos de anaerobios los tubos se colocaron en jarras de anaerobiosis con sobres de anaerogen (Oxoid). Inmediatamente se incubaron a $2\pm 1^\circ\text{C}$, $8\pm 1^\circ\text{C}$ y $14\pm 1^\circ\text{C}$. El efecto combinado de los factores sobre el crecimiento del *L. mesenteroides* se determinó a través de un diseño de superficie de respuesta D-óptimo, calculando los parámetros cinéticos de crecimiento y ajustando a los modelos de

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Universidad Nacional de Colombia., Sede Medellín, Medellín, Colombia.

² Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria (INTAI), Itagüi – Antioquia.

³ Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Habana - Cuba (IIIA).

*Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: gabuelvass@unal.edu.co

Gompertz y logística sigmoideal, luego estos se emplearon para validar en productos cárnicos JCLEV el modelo secundario desarrollado. Posteriormente se procedió a estimar el tiempo de vida útil e igualmente se comparó la exactitud de las estimaciones. Los resultados fueron analizados mediante la modelación no lineal para los modelos primarios y de superficie de respuesta para los modelos secundarios, a través del paquete estadístico SPSS y Desing Expert 8.0. **RESULTADOS:** Se desarrolló y validó un modelo predictivo de la velocidad de crecimiento del *L. mesenteroides* en función del tiempo y así mismo realizar estimaciones sobre la vida útil. En cuanto a la fase de adaptación, el modelo estimado presentó dificultades para explicar el comportamiento de las células, por esto las predicciones de este parámetro deben ser interpretadas con prudencia **CONCLUSIÓN:** Fue posible, predecir la velocidad de crecimiento del *L. mesenteroides* y de esta manera estimar como las condiciones de almacenamiento influyen sobre la población microbiana y la vida útil de los JCLEV.

Palabras clave: Microbiología predictiva, *Leuconostoc mesenteroides*, Jamón cocido lonchado empacado al vacío.

Abstract

BACKGROUND: *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides*) had been considered some meat products such cooked ham, salami, cured products, frankfurter and wiener sausage main alterative. It's responsible for swollen packaging, syneresis, color changes, silt, white color, producing consumer rejection for vacuum packed sliced cooked ham (JCLEV). **OBJECTIVES:** *L. mesenteroides* growth modeling as storage temperature (refrigeration) and salt (NaCl) concentration function at aerobic and anaerobic conditions in order to predict shelf life of JCLEV. **METHODS:** TSB culture broth was used, added with NaCl 1,5 to 3,5 %. Then they were sealed with 1 cm paraffin layer. Anaerobic treatments were placed on anaerobic jars. They were incubated at $2\pm 1^\circ\text{C}$, $8\pm 1^\circ\text{C}$ y $14\pm 1^\circ\text{C}$. *L. mesenteroides* growth combined effect was determined through D-optimum surface response design calculating growth kinetic parameters, fitted to Gompertz and sigmoid logistic that were used to validate the secondary model developed for JCLEV meat products. Later shelf life was determined and then accuracy estimation will be determined. The results were analyzed using nonlinear modeling for primary models and

surface response for secondary models, using SPSS and Design Expert 8.0 software.

RESULTS: A predictive model was developed and validated to predict microbial population increasing as time function and predict shelf life. About adaptation phase there were difficulties to explain cell behavior so this parameter prediction must be carefully understood. **CONCLUSION:** it was possible to predict *L. mesenteroides* growth phase and then estimate storage conditions influence on microbial population and JCLEV shelf life.

Keywords: Predictive microbiology, *Leuconostoc mesenteroides*, vacuum packed sliced cooked ham,

Introducción

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son consideradas como los principales microorganismos responsables de los procesos de alteración de productos cárnicos (1, 2). Entre éstas, cabe destacar las especies *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus curvatus*, en productos cocidos envasados en atmósfera anaeróbica, también se destacan lactobacilos heterofermentativos y *Leuconostoc* en productos cocidos envasados al vacío (3, 4). En ciertas ocasiones puede ocurrir que algunos de estos microorganismos inicialmente tengan una función protectora, debido a que, tienen la capacidad de controlar microorganismos patógenos y alterantes (5); pero secundariamente éstos mismos degradan los carbohidratos y producen metabolitos finales que son organolépticamente indeseables, atentando contra la vida útil del producto (6, 7).

Se han realizado diversos estudios con el fin de determinar el origen y tipo de microorganismos alterantes de productos cárnicos a lo largo de la línea de producción, como el desarrollado por Samelis *et al.* (4) en jamón cocido envasado al vacío. Los resultados mostraron a *Lactobacillus sake* y *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* como los principales microorganismos responsables de la alteración a 4°C y 12°C, debido a la recontaminación en la sala de lonchado. En la actualidad estos esfuerzos continúan ya que se siguen presentando defectos de calidad, como es el caso del abombamiento de carne empacada a vacío y en jamones de cerdo en el mismo empaque (8); este fenómeno es atribuido a una recontaminación con BAL transmitidas por el aire, siendo las principales

fuentes de contaminación los manipuladores y las superficies de trabajo en contacto con los alimentos (9).

Especialmente el *L. mesenteroides* ha sido aislado frecuentemente como microorganismo responsable de alteración en diversos tipos de productos cárnicos tales como jamón cocido, salami, productos curados, salchichas cocidas tipo viena y Frankfurt (3, 10-13) y concretamente, la subespecie *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* (14-16).

Atendiendo a lo anterior se busca proponer una herramienta tecnológica que les permita a los industriales del sector cárnico emitir juicios acerca de la calidad de los JCLEV en el almacenamiento en refrigeración, reajustar formulaciones y mejorar las temperaturas de refrigeración dentro de la cadena de frío, por tanto, el objetivo de este estudio fue modelar el crecimiento del *L. mesenteroides* en función de la temperatura de almacenamiento (refrigeración) y la concentración de sal (NaCl) para predecir la vida útil de jamones cocidos lonchados empacados al vacío.

Materiales y métodos

Aislamiento e identificación de los microorganismos alterantes: De forma aséptica, se tomaron (25g de muestra) de JCLEV, categoría estándar conforme a la NTC-1325 (29), almacenados en refrigeración 25±4 días antes de fecha de vencimiento, se diluyó en 250 mL de agua peptona estéril (Dilución 10⁻²). A partir de ellas se prepararon las diluciones necesarias y se sembró 1 mL de ellas en placa de Petri en profundidad, luego se adicionó 13 mL de agar MRS y finalmente se incubó a 37°C por 48 horas. Para posteriormente realizar el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/g de muestra) (17).

De las colonias más representativas se tomó una azada de una colonia característica y se sembró en agar nutritivo Man Rogosa Sharpe – Sharlau (MRS), luego se incubó a 36°C por 24 horas en anaerobiosis, para obtener cultivos puros de los crecimientos característicos. Posteriormente a fin de conocer las características de las colonias, se describió su forma, propiedades ópticas, color, borde, consistencia y elevación. Para ubicarlas en género se realizaron pruebas de tinción de Gram, catalasa y oxidasa (8, 18). Además para identificar la especie se realizaron pruebas bioquímicas a través del método

miniaturizado y automatizado “VITEK - BioMérieux Hazelwood”, el cual consiste en una estandarización del inóculo por método MacFarland; para luego introducir el inóculo en el equipo donde se analiza el metabolismo de 64 carbohidratos; basado en cambios de color de los sustratos o en la producción de gas de los cultivos inoculados en los pocillos de la tarjeta plástica, que contiene los hidratos de carbono en forma deshidratada; permitiendo así identificar género y especie del microorganismo aislado (19).

Conservación de cepas: Las cepas aisladas e identificadas en cultivos puros, fueron conservadas hasta su utilización en congelación a -18°C , en un caldo BHI (Brain Heart Infusion, Sharlou) al 70% y 30% de glicerol.

Preparación del final del inóculo: Para la preparación del inóculo, se tomó una azada del cultivo puro y se inoculó en 10 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusión –Sharlou), luego se incubó por 18 horas a 35°C donde se alcanzó una concentración inicial de 10^8 , culminado el tiempo de incubación se realizaron tres pases sucesivos alcanzando una concentración de inóculo aproximada de 10^5 .

Procedimiento experimental: Para el estudio se empleó caldo TSB (Caldo Tripticasa de soya), al cual se le adicionó diferentes concentraciones de sal en un rango entre 1,5 y 3,5% de (NaCl). Los caldos se dispusieron en tubos a razón de 10 mL y se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 min.

Los medios incubados se sellaron con una capa de $\pm 1\text{cm}$ de parafina y en los tratamientos de anaerobiosis se colocaron los tubos en jarras de anaerobiosis. Luego se incubaron a tres valores de temperatura $2\pm 1^{\circ}\text{C}$, $8\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $14\pm 1^{\circ}\text{C}$. Se eligieron estos valores por ser las temperaturas representativas de las neveras en las tiendas y refrigeradores domésticos. A diferentes tiempos se realizaron los recuentos microbianos de UFC/gr de muestra.

El efecto combinado de los factores sobre el crecimiento de *L. Meseteroides* aislado de JCLEV se determinó a través de un diseño de superficie de respuesta D-óptimo, con dos factores numéricos (temperatura y concentración de sales) y un factor categórico

(atmosfera: aerobia o anaerobia). El experimento consto en total de 19 corridas experimentales, cuatro de las cuales son réplicas de varios puntos del diseño y se realizaron siguiendo el orden aleatorio.

A cada una de las combinaciones de los factores en las 19 corridas experimentales se les realizó un seguimiento durante 50 horas de incubación. Cada 3 horas se extrajo una muestra que se coloca en agar MRS y se incubó a 32°C, durante 72 horas. Los valores de los recuentos microbianos se transformaron a logaritmo, para homogenizar la varianza y luego se construyó la curva de crecimiento, es decir \log_{10} de UFC/gr de muestra vs tiempo de incubación del *L. mesenteroides* para cada una de las corridas experimentales.

Modelos matemáticos: Se emplearon dos modelos matemáticos para predecir el crecimiento microbiano en función del tiempo, para cada una de las combinaciones de los factores durante las 50 horas de incubación sobre el desarrollo de *L. mesenteroides*.

1. Ecuación modificada de Gompertz (20)

$$N_t = A + C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde: N_t es el \log_{10} de los recuentos microbianos obtenidos para cualquier tiempo (t). **A**: log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente o tiende a cero (equivale aproximadamente al log de los niveles iniciales de bacterias), **C**: diferencia entre la máxima línea asintótica de la curva de crecimiento y la línea asintótica menor (equivale a $N_{\max} - N_0$) (log UFC/ml). **M**: tiempo al cual el crecimiento es máximo (días). **B**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo (días^{-1}).

2. Ecuación logística modificada (Gibson y otros 1987)

$$N_t = \frac{A+C}{\{1+\exp[-B(t-M)]\}} \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde: N_t , **A**, **B**, **M** y **C** coinciden con los de la ecuación de Gompertz.

Los parámetros cinéticos de crecimiento como la velocidad específica de crecimiento (μ_{max}), duración de la fase de latencia (LDP) y población máxima (N_{max}), se calculan para ambos modelos empleando las siguientes ecuaciones:

Ecuación de Gompertz: Velocidad de crecimiento: $\mu_{max} = BC/e$ ($e = 2,718$); Fase de latencia: $LDP = M - 1/B$; Población máxima: $N_{max} = A + C$.

Ecuación logística: Velocidad de crecimiento: $\mu_{max} = BC/4$; Fase de latencia: $LDP = M - 2/B$.

Los índices estadísticos utilizados para establecer la calidad de los modelos son explicados por Ross (21) y otros autores (22, 23) y recientemente Matagaras *et al.* (24). El coeficiente de correlación múltiple o de determinación (R^2), la raíz cuadrada del error de los residuales del modelo (RrMSE) y la prueba F. Para el procesamiento de los resultados se realizó el ajuste de los modelos de regresión no lineal empleando el algoritmo de programación cuadrática secuencial, imponiendo restricciones para que los parámetros estimados sean obligatoriamente mayores o iguales que cero ($A \geq 0$, $C \geq 0$, $M \geq 0$ y $B \geq 0$) evitándose así valores negativos de los mismos, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 21 (25).

Desarrollo de un modelo secundario: Para determinar el efecto combinado de los factores intrínsecos (concentración de sal) y extrínsecos (Temperatura de almacenamiento) en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de *L. mesenteroides* aislado de JCLEV; una vez obtenida la estimación de estos a partir del ajuste del modelo primario seleccionado: velocidad de crecimiento (μ_{max}), duración de la fase de latencia (LDP), y población máxima (N_{max}), se empleó la metodología de superficie de respuesta, mediante la cual es posible obtener el modelo de mejor ajuste y determinar el efecto de los factores estudiados y sus interacciones sobre las variables respuesta empleando para ello el sistema Design Expert 8 (26).

Los índices estadísticos empleados para establecer la calidad de los modelos primarios (Raíz cuadrada del error cuadrado medio de los residuales del modelo – RrMSE, R^2 , y

Valor P) y para los secundarios (Factor de sesgo – B_f , Factor de exactitud A_f y Veracidad del ajuste – Gof) fueron los recomendados en trabajos anteriores (21, 24, 27, 28), a continuación se describen los utilizados en los modelos secundarios.

1. **Factor de sesgo B_f :** El B_f calcula la diferencia de medias entre los valores observados y predichos. Se evalúa si el modelo es "acertado" o "no peligroso". Cuando $B_f > 1$ para el modelo que estima la LPD puede considerarse "no-peligroso", mientras que el modelo que estima μ_{max} se considera "no-peligroso" cuando $B_f < 1$. Si $B_f = 1$, entonces en promedio hay un acuerdo perfecto entre los valores predichos o estimados por el modelo y los datos experimentales observados.

$$B_f = 10^{\left\{ \sum_{i=1}^n \log\left(\frac{\text{predichos}_i}{\text{observados}_i}\right) / n \right\}} \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde: n es el número de datos, valores predichos es la μ_{max} (d^{-1}) y LDP (d) obtenidos por el modelo; Valores observados es la μ_{max} (d^{-1}) y LDP (d) obtenidos experimentalmente.

2. **Factor de exactitud A_f :** Muestra la exactitud del modelo, es decir, la proximidad de los valores predichos con los valores observados. Si $A_f = 1$ existe un ajuste perfecto entre los valores predichos y observados. A_f se puede calcular por la ecuación:

$$A_f = 10^{\left[\sum_{i=1}^n \left| \log\left(\frac{\text{predichos}_i}{\text{observados}_i}\right) \right| / n \right]} \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde: los valores predichos y observados son los valores mencionados anteriormente.

3. **El coeficiente de regresión múltiple (R^2) y la Veracidad del ajuste (Gof),** este último se calcula tomando en consideración la raíz del cuadrado medio del error del modelo y se ingresa a la siguiente ecuación:

$$Gof = \sqrt{\frac{RSS}{DF}}$$

Ecuación 5.

Donde: RSS es la suma de cuadrados de los residuos y DF son los grados de libertad.

Validación del modelo: La validación del modelo predictivo se realizó *in-vivo*, es decir, se formuló un JCLEV según los criterios de la NTC-1325 (29), para un producto cárnico cocido categoría estándar, igualmente se tomaron los valores fisicoquímicos de humedad y concentración de sal obtenidos en la caracterización de JCLEV comerciales 66,66% y un % del NaCl del 2,88% respectivamente, para simular las condiciones experimentales empleadas en el desarrollo del modelo. Una vez elaborados los productos se empacó en dos estructuras de empaque (PET Flexible y PET – EVOH) para simular las condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Terminado este proceso las unidades experimentales se almacenaron en dos condiciones de refrigeración, en el rango de las empleadas en el desarrollo del modelo y diferentes a las ya empleadas, 4°C y 10°C durante 64 días de almacenamiento. Realizando conteos periódicos para graficar el crecimiento del *L. mesenteroides*. Finalmente se compararon los valores observados en las corridas experimentales y en los ensayos de validación, contra los valores predichos por el modelo de superficie de respuesta desarrollado. Igualmente se determinaron los índices de sesgo y precisión, empleando la ecuación modificada de Gompertz para verificar numéricamente el ajuste del modelo desarrollado.

Estimación de vida útil: Se determinó empleando la ecuación Monod-Hinshelwood, debido a que está ecuación considera que el tiempo en el cual ocurre o se desarrolla la alteración de los alimentos está directamente relacionado con el tiempo de generación del microorganismo predominante (30), la cual depende de μ_{max} y se calcula: $T_g = \mu_{max}/2$ (31).

$$t_s = \frac{\log N_s - \log N_0}{\log 2} T_g$$

Ecuación 6.

Donde: t_s es el tiempo necesario para que se desarrolle la alteración; N_s (UFC/g), es la población de seguridad; N_0 (UFC/g), es la población inicial presente en el producto; T_g , es el tiempo de generación de la población alterante específica (días).

Resultados y discusión

Resultados del aislamiento e identificación de las cepas

Las unidades formadoras de colonias (UFC/g de jamón) predominantes, aisladas de JCLEV se caracterizaron a nivel macroscópico y microscópico por ser, pequeñas, de color beige, con borde regular, bacilo Gram positivos, anaerobio facultativo, que no producen catalasa ni oxidasa. La identificación permitió confirmar que las colonias de este microorganismo son características del grupo de BAL.

Una vez confirmada su pertenencia al grupo de BAL se les practicó test “VITEK - BioMérieux Hazelwood” para tipificar la cepa predominante; los resultados son presentados en la tabla 1.

Tabla 1: Detalles bioquímicos de la tipificación de BAL aislado de JCLEV a través del test VITEK.

DETALLES BIOQUÍMICOS TEST VITEK																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	-	37	dGAL	-
38	dRIB	-	39	ILATk	-	42	LAC	-	44	NAG	-	45	dMAL	+	36	BACI	-
47	NOVO	+	50	NC6.5	-	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	-	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	-	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

La tabla 1 muestra el comportamiento metabólico de la cepa predominante de BAL, frente a 64 carbohidratos; en donde los signos (+) identifican cambios de color o producción de gas (19). Permitiendo este, confirmar con un 88% de probabilidad el género y la especie de las colonias aisladas en el JCLEV; las cuales pertenecen a la especie de *L. mesenteroides* sub especie *dextranicum*. Por tanto, se seleccionó a *L. mesenteroides* como la cepa de estudio para el desarrollo y el ajuste a los modelos cinéticos de crecimiento.

Resultados de los recuentos microbiano en las condiciones de almacenamiento

La figura 1, muestra los resultados de los recuentos de *L. mesenteroides* en las diferentes condiciones de almacenamiento *in-vitro* durante el tiempo (50 horas); encontrando que el crecimiento del *L. mesenteroides* es más pronunciado en la medida en que se incrementa la temperatura de almacenamiento, alcanzando mayor número de UFC/g en menor cantidad de horas. De igual forma, la inclusión de sal (NaCl) dentro del medio de cultivo, es posible que retarde el crecimiento microbiano y por lo tanto influya sobre la variables cinéticas de crecimiento, discutidas más adelante.

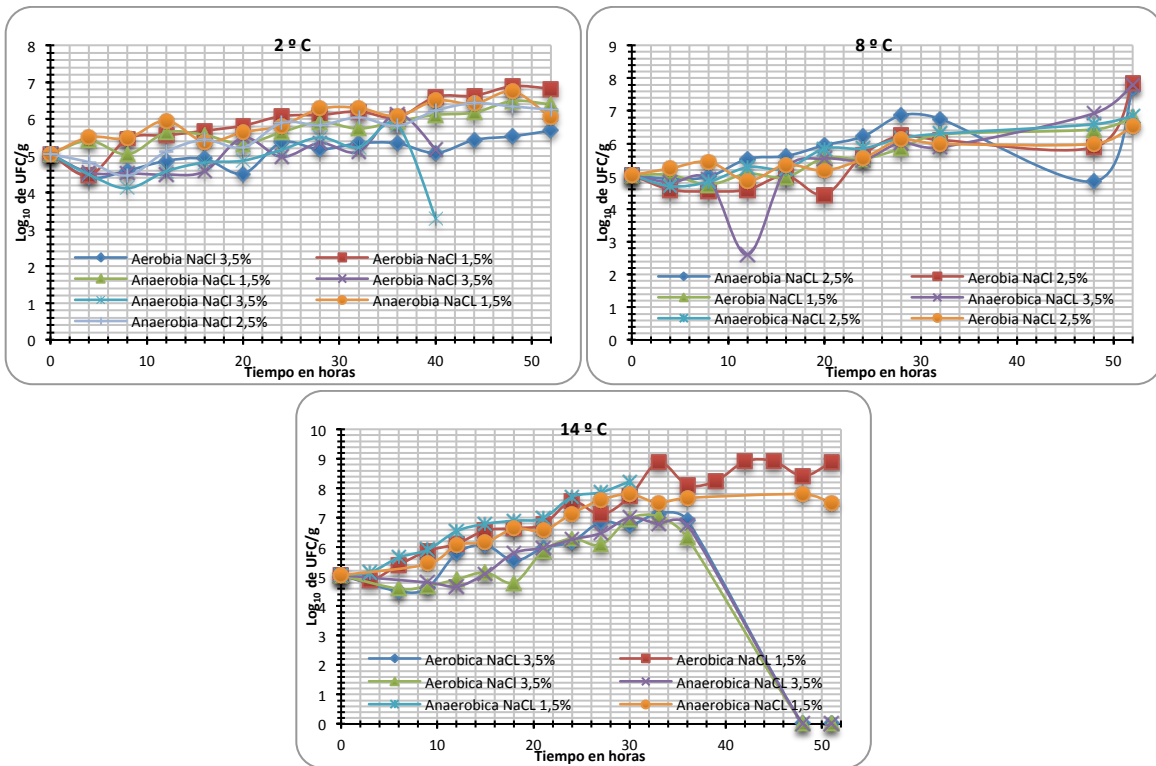


Figura 1: Comportamiento de los valores medios del crecimiento de *L. mesenteroides* a diferentes condiciones de almacenamiento *in-vitro* ($2\pm 1^{\circ}\text{C}$, $8\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $14\pm 1^{\circ}\text{C}$) y concentración de sales en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, durante el tiempo.

Resultados del ajuste de los modelos primarios

La tabla 2, muestra los índices estadísticos de los ajustes realizados para la ecuación modificada de Gompertz y la ecuación logística sigmoideal a los datos de crecimiento *in-vitro* de *L. mesenteroides*. Como se observa, en todos los casos, para ambas ecuaciones los modelos estimados son significativos ($p \leq 0,05$), con valores de R^2 elevados, por

encima del 0,842 y los valores de la raíz cuadrada del error de los residuales (RrMSE) son bajos y muy similares. Esto garantiza la calidad de los ajustes realizados a las ecuaciones en las condiciones experimentales estudiadas, confirmando que los modelos explican los datos experimentales del crecimiento *in-vitro* del *L. mesenteroides*, siendo así adecuados para calcular los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano.

Tabla 2: Índices estadísticos de modelos primarios estimados ajustados a los datos experimentales.

Corrida	Tratamiento			Gompertz			Logística		
	Temperatura	Concent. Sales	Atmósfera	Valor -p Prob > F	R ²	RrMSE	Valor -p Prob > F	R ²	RrMSE
7	2,00	1,50	Aerobia	0,0099	0,900	0,2511	0,0097	0,902	0,2486
6	2,00	3,50	Aerobia	0,0134	0,865	0,2311	0,0130	0,869	0,2279
10	2,00	3,50	Aerobia	0,0174	0,876	0,3009	0,0185	0,870	0,3107
11	8,00	1,50	Aerobia	0,0033	0,967	0,1592	0,0030	0,969	0,1526
9	8,00	2,50	Aerobia	0,0133	0,906	0,4095	0,0150	0,895	0,4335
19	8,00	2,50	Aerobia	0,0080	0,911	0,2123	0,0086	0,904	0,2205
3	14,00	1,50	Aerobia	0,0034	0,952	0,3332	0,0033	0,953	0,3314
2	14,00	3,50	Aerobia	0,0172	0,862	0,3889	0,0199	0,842	0,4180
4	14,00	3,50	Aerobia	0,0125	0,899	0,3317	0,0131	0,894	0,3396
8	2,00	1,50	Anaerobia	0,0046	0,899	0,1645	0,0044	0,904	0,1605
16	2,00	1,50	Anaerobia	0,0094	0,905	0,2048	0,0094	0,905	0,2048
18	2,00	2,50	Anaerobia	0,0112	0,886	0,2569	0,0112	0,887	0,2579
12	2,00	3,50	Anaerobia	0,0132	0,907	0,2127	0,0147	0,897	0,2246
15	8,00	2,00	Anaerobia	0,0052	0,947	0,2189	0,0050	0,949	0,2148
1	8,00	2,50	Anaerobia	0,0034	0,965	0,1743	0,0035	0,964	0,1758
14	8,00	3,50	Anaerobia	0,0082	0,942	0,2780	0,0083	0,942	0,2795
13	14,00	1,50	Anaerobia	0,0026	0,981	0,1767	0,0027	0,981	0,1777
17	14,00	1,50	Anaerobia	0,0044	0,960	0,2166	0,0040	0,963	0,2060
5	14,00	3,50	Anaerobia	0,0050	0,954	0,1929	0,0066	0,954	0,2201

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al comparar los índices estadísticos analizados, ambos modelos presentan desviaciones y R² similares indicando que tienen la misma calidad de ajuste sobre los datos experimentales, lo que no permite seleccionar una ecuación de mejor ajuste. Por lo que, para el cálculo de los parámetros cinéticos de crecimiento (μ_{max} , LDP y N_{max}) se emplearon ambas ecuaciones, resultados que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Cálculo de los parámetros cinéticos para el modelo de Gompertz y el modelo logístico sigmoidal que describen el crecimiento de *L. mesenteroides* para cada tratamiento.

Modelo de Gompertz										
Tratamientos				Parámetros estimados				Parámetros cinéticos		
Corrida	Temperatura	Concent. Sales	Atmósfera	A	C	B	M	μ_{max}	LDP	N_{max}
	°C	%								
7	2,00	1,50	Aerobia	0,043	13,28	0,008	0,000	0,0390	-51,2600	13,319
6	2,00	3,50	Aerobia	0,298	10,87	0,008	0,000	0,0278	12,3320	5,6411
10	2,00	3,50	Aerobia	4,655	2,095	0,081	28,124	0,0624	15,7783	6,7500
11	8,00	1,50	Aerobia	4,967	1,856	0,125	23,974	0,0853	15,9740	6,8230
9	8,00	2,50	Aerobia	4,688	2,856	0,120	26,633	0,1260	18,2997	7,5440
19	8,00	2,50	Aerobia	5,170	1,397	0,171	25,301	0,0878	19,4530	6,5670
3	14,00	1,50	Aerobia	4,548	4,761	0,065	14,261	0,1142	20,3900	9,3090
2	14,00	3,50	Aerobia	4,751	2,563	0,108	16,169	0,1017	6,8992	7,3134
4	14,00	3,50	Aerobia	4,851	1,808	0,419	20,307	0,1700	17,9204	6,6590
8	2,00	1,50	Anaerobia	5,078	23,06	0,011	145,32	0,0557	-11,9500	14,8600
16	2,00	1,50	Anaerobia	3,458	9,353	0,010	51,144	0,0344	-48,8560	12,811
18	2,00	2,50	Anaerobia	4,380	3,957	0,028	30,463	0,0616	9,5316	6,3398
12	2,00	3,50	Anaerobia	4,660	1,523	0,106	25,179	0,0593	15,7450	6,1830
15	8,00	2,00	Anaerobia	0,000	18,23	0,007	18,228	0,0695	8,4882	7,2396
1	8,00	2,50	Anaerobia	4,954	2,476	0,098	18,405	0,0892	8,2009	7,4300
14	8,00	3,50	Anaerobia	4,698	10,03	0,025	60,895	0,0921	20,8950	7,9400
13	14,00	1,50	Anaerobia	0,000	13,61	0,023	0,347	0,1500	57,9924	12,1500
17	14,00	1,50	Anaerobia	5,060	2,712	0,135	13,591	0,1342	6,1368	7,7708
5	14,00	3,50	Anaerobia	4,834	2,036	0,217	17,973	0,1625	13,3647	6,8700

Modelo logístico sigmoidal									
Tratamiento				Parámetros estimados				Parámetros cinéticos	
Corrida	Temperatura	Concent. Sales	Atmósfera	A	C	B	M	μ_{max}	LDP
	°C	%							
7	2,00	1,50	Aerobia	0,612	8,576	0,020	0,000	0,0428	-68,010
6	2,00	3,50	Aerobia	0,903	6,755	0,019	0,000	0,0254	8,8754
10	2,00	3,50	Aerobia	4,626	1,891	0,151	30,519	0,0713	17,2740
11	8,00	1,50	Aerobia	4,912	2,076	0,163	28,570	0,0845	16,3001
9	8,00	2,50	Aerobia	4,630	2,778	0,192	29,052	0,1333	18,6353
19	8,00	2,50	Aerobia	5,142	1,405	0,245	27,465	0,0860	19,3017
3	14,00	1,50	Aerobia	3,833	5,303	0,084	16,073	0,1117	21,7200

2	14,00	3,50	Aerobia	4,476	3,282	0,116	21,363	0,0950	4,1018
4	14,00	3,50	Aerobia	4,804	1,881	0,441	21,411	0,2073	16,8759
8	2,00	1,50	Anaerobia	5,073	12,636	0,039	101,346	0,1422	2,4000
16	2,00	1,50	Anaerobia	2,533	8,733	0,016	51,126	0,0349	-73,8740
18	2,00	2,50	Anaerobia	3,856	3,819	0,043	28,386	0,0583	7,8961
12	2,00	3,50	Anaerobia	4,641	1,443	0,190	27,687	0,0685	17,1607
15	8,00	2,00	Anaerobia	0,492	9,384	0,022	10,156	0,0677	5,4952
1	8,00	2,50	Anaerobia	4,871	2,248	0,168	20,075	0,0944	8,1702
14	8,00	3,50	Anaerobia	4,257	20,649	0,039	94,264	0,2013	42,9819
13	14,00	1,50	Anaerobia	0,000	11,469	0,039	6,814	0,2100	43,9600
17	14,00	1,50	Anaerobia	4,914	2,821	0,179	16,039	0,1265	4,8927
5	14,00	3,50	Anaerobia	4,796	2,025	0,316	19,796	0,1599	13,4669

En la tabla 3, se muestran los valores de A, C, B y M estimados por el modelo de Gompertz y logístico sigmoidal, a partir de los cuales se calcularon las variables de crecimiento. Para la velocidad de crecimiento (μ_{max}) del *L. mesenteroides*, se identificó que esta aumenta en la medida que se incrementa la temperatura, sin importar la concentración de sales del medio y la atmosfera. Estos resultados son de esperar ya que este es un microorganismo anaerobio facultativo logrando crecer en concentraciones de oxígeno mínimas o nulas, además tolera concentraciones de sal hasta del 6,5%. El resultado *in-vitro* es coherente con el deterioro de los jamones, ya que, este microorganismo es capaz de crecer a estas temperaturas de almacenamiento y con altas concentraciones de sal.

Efecto de las condiciones ambientales sobre el crecimiento del *L. Mesenteroides*

La tabla 4, muestra los coeficientes significativos de los efectos principales y las interacciones de las condiciones ambientales sobre los parámetros cinéticos de crecimiento del *L. mesenteroides*, así como los índices estadísticos correspondientes a cada modelo estimado.

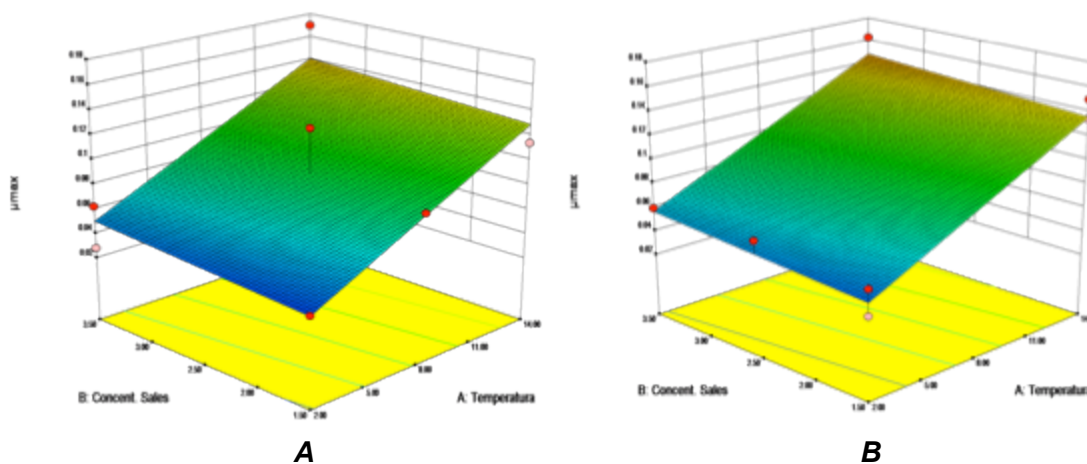
Tabla 4: Coeficientes significativos de los efectos principales y las interacciones de los modelos de regresión estimados.

COEFICIENTE DE LA REGRESIÓN	Gompertz			Logística	
	μ_{max}	LDP	N_{max}	μ_{max}	LDP
Modelo de ajuste	Lineal	Cuadrático	Lineal	Lineal	Cuadrático
β_0	0,093	8,94	8,30	0,11	7,82
β_A	0,045	14,93	NS	0,045	16,05
β_B	NS	NS	-1,99	NS	NS
β_C	NS	NS	NS	NS	NS
β_{AB}	-	-17,63	-	-	-19,79
β_{AC}	-	NS	-	-	NS
β_{BC}	-	NS	-	-	NS
R^2	81,53	68,53	48,30	50,65	61,49
Modelo (p-valor)	0,0001	0,0145	0,0170	0,0122	0,0412
Bondad de ajuste (p-valor)	0,9676	0,8572	0,1986	0,9431	0,8471

Significativo para $p \leq 0,05$; NS Coeficientes no significativos

A =Temperatura, **B** = Concentración de sales **C** = Aerobiosis/Anaerobiosis

Aunque en todos los casos se muestra un efecto significativo ($p \leq 0,05$) de los factores estudiados sobre los parámetros cinéticos, solo los resultados de la velocidad de crecimiento (μ_{max}) y fase de latencia (LDP) estimados mediante la ecuación de Gompertz tienen valores de R^2 y bondad de ajuste que pudieran ser considerados para emplearlos como modelos predictivos. En la figura 2 se muestran las superficies de respuesta obtenidas para estos parámetros cinéticos o variables respuesta.



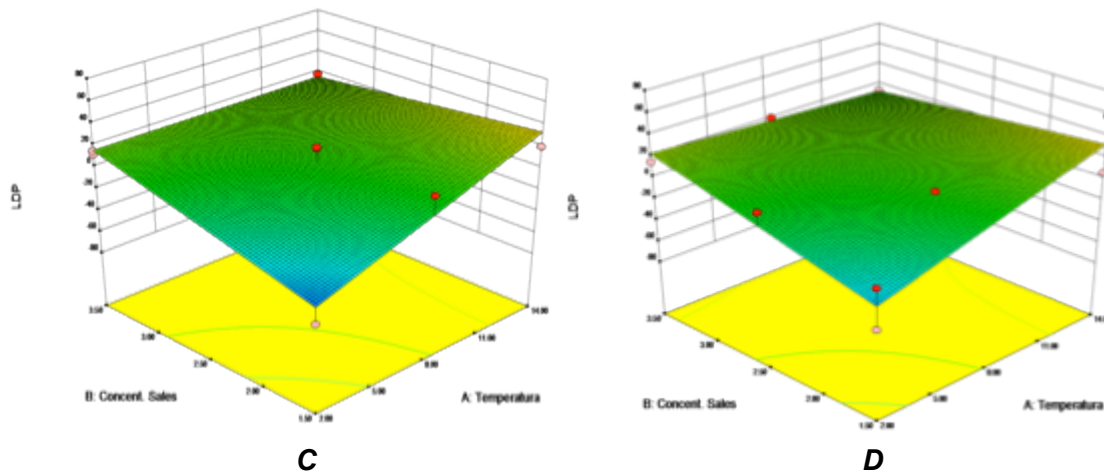


Figura 2: Superficies de respuesta estimadas para los parámetros de la ecuación de Gompertz (A: μ_{\max} Atmósfera Aerobia, B: μ_{\max} Atmósfera Anaerobia, C: LDP Atmósfera Aerobia y D: LDP Atmósfera Anaerobia).

Modelos secundarios

Los errores estadísticos para los modelos de superficie de respuesta de los parámetros de velocidad de crecimiento y fase de latencia del *L. mesenteroides* para la ecuación de Gompertz, presentaron un R^2 del 81,53% y 68,53%. Al igual que un factor de sesgo, índice de exactitud y veracidad del ajuste de 1,0578, 1,0591 0,0004052 para la velocidad de crecimiento y 0,97, 1,0300 y 276,30 para la fase de latencia.

Respecto a la fase exponencial o velocidad de crecimiento, explicada por el modelo, se observa una menor Gof (0,0004052), es decir, la desviación del modelo a los datos experimentales, es muy cercana a cero lo que indica un mayor ajuste entre las observaciones y las estimaciones. La exactitud del modelo se representa con un valor de A_f (1,0591) muy cercano a la unidad. Lo que permitirá realizar predicciones más acertadas del comportamiento del *L. mesenteroides* en función de la temperatura de almacenamiento, siendo este el único parámetro que afecta significativamente ($p \leq 0,05$) el crecimiento de este microorganismo durante su almacenamiento, reafirmando la importancia de la cadena de frío de los JCLEV y en general de todos los productos cárnicos.

Por otra parte, por los resultados del modelo que describe la fase de adaptación (**LDP**) se tiene que este presenta mayores dificultades para explicar el comportamiento de las células, esto puede deberse a que la fase de latencia depende del estado fisiológico de las células, tamaño del inóculo y de las condiciones previas del crecimiento (32, 33), por esto las predicciones de este parámetro de crecimiento deben ser interpretadas con prudencia. Además el valor Gof (276,30), confirma esta afirmación, siendo un valor muy distante de cero, lo que indica que el ajuste del modelo a los datos experimentales es deficiente. Lo anterior es de esperar, ya que los modelos de crecimiento fueron construidos en medios de cultivos ricos en nutrientes, lo que proporciona condiciones favorables para inicio del crecimiento de los microorganismos (23).

Considerando estos resultados se propone un modelo predictivo de superficie de respuesta para la velocidad del crecimiento (μ_{\max}) de *L. mesenteroides*, estimada mediante la ecuación de Gompertz por presentar los mejores índices estadísticos. Los modelos codificados y decodificados que representan la superficie de respuesta en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis respectivamente son:

Aerobiosis	Anaerobiosis
Modelo codificado	
$\mu_{\max} = 0,0897 + 0,045A$	$\mu_{\max} = 0,0962 + 0,045A$
Modelo decodificado	
$\mu_{\max} = 0.0149 + 0.00755*Temperatura$	$\mu_{\max} = 0.021399+0.00755*Temperatura$
Donde: A=Temperatura	

Validación del modelo

La validación del modelo predictivo de superficie de respuesta se realizó mediante la comparación de los valores observados y predichos, en las condiciones *in-vitro* utilizadas para desarrollar el modelo, al igual que en las condiciones *in-vivo* utilizadas para validar el mismo (tabla 5).

Tabla 5: Valores observados y predichos para μ_{\max} y los intervalos de confianza para los ajustes realizados con el modelo de Gompertz.

TRATAMIENTOS				μ_{\max}		IC al 95% de los valores predichos	
RUM	TEMPERATURA °C	CONCENT. SALES %	ATMÓSFERA	OBS	PRED	LI μ_{\max}	LS μ_{\max}
Condiciones <i>in-vitro</i> utilizadas para desarrollar el modelo							
7	2	1,5	Aerobia	0,0390	0,0388	-0,0001	0,0937
6	2	3,5	Aerobia	0,0278	0,0504	0,0025	0,0983
10	2	3,5	Aerobia	0,0624	0,0504	0,0025	0,0983
11	8	1,5	Aerobia	0,0853	0,0841	0,0493	0,1420
9	8	2,5	Aerobia	0,1260	0,0899	0,0446	0,1351
19	8	2,5	Aerobia	0,0878	0,0899	0,0446	0,1351
3	14	1,5	Aerobia	0,1142	0,1293	0,0446	0,1351
2	14	3,5	Aerobia	0,1017	0,1410	0,0930	0,1889
4	14	3,5	Aerobia	0,1700	0,1410	0,0930	0,1889
8	2	1,5	Anaerobia	0,0557	0,0452	-0,0021	0,0925
16	2	1,5	Anaerobia	0,0344	0,0452	-0,0021	0,0925
18	2	2,5	Anaerobia	0,0616	0,0510	0,0047	0,0973
12	2	3,5	Anaerobia	0,0593	0,0568	0,0087	0,1049
15	8	2	Anaerobia	0,0695	0,0934	0,0552	0,1490
1	8	2,5	Anaerobia	0,0892	0,0963	0,0552	0,1490
14	8	3,5	Anaerobia	0,0921	0,1021	0,0552	0,1490
13	14	1,5	Anaerobia	0,1500	0,1358	0,0879	0,1836
17	14	1,5	Anaerobia	0,1342	0,1358	0,0879	0,1836
5	14	3,5	Anaerobia	0,1625	0,1474	0,0879	0,1836
Condiciones <i>in-vivo</i> empleadas para la validación del modelo							
1	4	2,88	Flexible	0,0892	0,0619	0,0159	0,1079
2	4	2,88	EVOH	0,0853	0,0683	0,0224	0,1142
3	10	2,88	Flexible	0,1142	0,1072	0,0616	0,1527
4	10	2,88	EVOH	0,1342	0,1136	0,0679	0,1593

IC, Intervalos de confianza, LI, Límite inferior, LS, Límite Superior.

Los resultados de la validación *in-vivo*, productos cárnicos, son presentados en la figura 3. Donde se muestra el ajuste del modelo predictivo de crecimiento (Gompertz) bajo condiciones constantes de temperatura: (A. 4°C - Aerobio, B. 4°C - Anaerobio, C. 10°C - Aerobio, D. 10°C - Anaerobio).

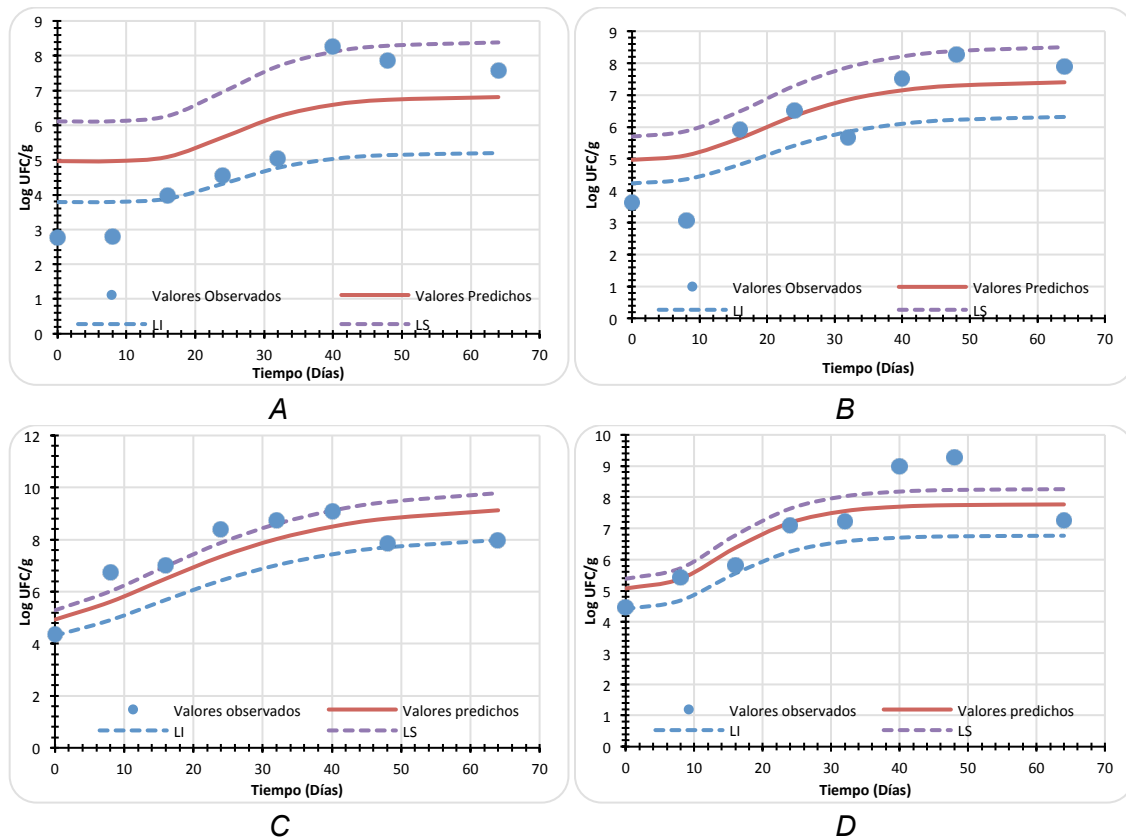


Figura 3: Validación in-vivo del modelo predictivo de crecimiento de (Gompertz) para *L. mesenteroides* en JCLEV. (A. 4°C - Aerobio, B. 4°C - Anaerobio, C. 10°C - Aerobio, D. 10°C - Anaerobio).

Los índices estadísticos de la comparación entre la μ_{max} observada y la μ_{max} predicha del modelo secundario desarrollado se presentan en la tabla 6, encontrándose que el modelo secundario es capaz de explicar el 96,68% de los valores observados.

Tabla 6: Índice estadísticos de la precisión del modelo secundario para predecir el crecimiento del *L. mesenteroides* en JCLEV.

TRATAMIENTO			INDICES ESTADISTICOS				
Temperatura °C	Empaque	% de NaCl	No. Tiempos de muestreo	R ²	A _f	B _f	Y=bx
4	Flexible	2,88	8	0,830	1,0907	1,0907	1,0009
4	EVOH	2,88	8	0,792	1,1841	1,1841	0,9973
10	Flexible	2,88	8	0,844	1,0221	0,9783	0,9783
10	EVOH	2,88	8	0,844	1,0001	1,0001	0,9668

Los resultados obtenidos muestran que el modelo desarrollado para la velocidad de crecimiento del *L. mesenteroides spp* en JCLEV, bajo las condiciones experimentales evaluadas, presenta valores de A_f entre 1,0001 y 1,1841 y de B_f entre 0,9783 y 1,1841 respectivamente, siendo para ambos casos valores cercanos a la unidad, lo que indica que el ajuste de los puntos experimentales a los valores predichos por el modelo es adecuado (figura 3), lográndose hacer estimaciones acertadas del crecimiento de la población en función del tiempo y las condiciones extrínsecas e intrínsecas del JCLEV. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Matagaras *et al.* (24), quien reportó valores de A_f de 0,98 y 1,19 así como B_f de 1,05 y 1,22. Además Ross (34) afirma que valores de B_f entre 0,9 a 1,0 o 1,0 a 1,05 se consideraran adecuados, mientras que para B_f entre 0,7 a 0,9 o 1,06 a 1,15 son considerados aceptables al momento de realizar predicciones de la estimación de los parámetros cinéticos de crecimiento de los microorganismos.

Estimación de la vida útil

Tomando como los valores predichos los estimados a través de la ecuación 6, y como valores observados el tiempo real en que la población de *L. Mesenteroides* alcanzó el valor de seguridad (10^7) (35-37). Los resultados son presentados en la tabla 7.

Tabla 7: Estimación de la vida útil para los JCLEV.

TRATAMIENTO		VIDA UTIL (Días)		Diferencia entre VU_0 y VU_p (%)	
TEMPERATURA	ATMOSFERA	$VU_{OBSERVA}$	$VU_{PREDICHA}$	D	%D
4	AEROBIO	38	37	1	2,63
4	ANAEROBIO	37	49	-12	32,43
10	AEROBIO	16	22	-6	37,50
10	ANAEROBIO	23	17	6	26,09

Se realizó una comparación entre la $VU_{OBSERVADA}$ y la $VU_{PREDICHA}$ ajustando a un modelo con pendiente uno e intercepto cero, con la finalidad de determinar la dispersión de los datos predichos de los valores experimentales observados. Los resultados mostraron que el modelo presentó un R^2 del 96% lo que indica que el modelo de Monod es capaz de estimar con precisión la vida útil del producto explicando acertadamente las estimaciones de los valores experimentales, siendo un modelo preciso. A nivel comercial, los JCLEV

tienen una vida útil alrededor de 30 días en condiciones de refrigeración. Sin embargo está se ve afectada por las condiciones de almacenamiento, la disponibilidad de nutrientes, el empaque, la carga microbiana residual y demás factores que incentivan el deterioro; comportamiento acorde con los resultados obtenido, ya que, al incrementar la temperatura de almacenamiento la vida útil predicha igualmente disminuye en ambos tipos empaques evaluados.

Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos durante el desarrollo del modelo en función de los parámetros intrínsecos, extrínsecos y el efecto de cada uno de estos, sobre los parámetros cinéticos de crecimiento estimados para el modelo de Gompertz, se tiene que:

La temperatura es el único de los factores estudiados que influye significativamente ($p \leq 0,05$) sobre la velocidad de crecimiento (μ_{max}) de *L. mesenteroides*, observándose que, independientemente del contenido de sal y la atmósfera aerobia o anaerobia, la μ_{max} aumenta linealmente con el incremento de la temperatura (tabla 4, figura 2 A y B). Sobre la duración de la fase de latencia (LDP) se presentó un efecto significativo ($p \leq 0,05$) de la temperatura y de su interacción con la concentración de sales (tabla 4, figura 2 C y D), no así del ambiente gaseoso, en los cuales el comportamiento de este parámetro es similar. Como puede apreciarse, los menores valores de LDP ocurren cuando se emplea la mayor temperatura y la mayor concentración de sal, lo que pudiera deberse al efecto de la elevada temperatura, cuando la temperatura es baja (2°C), la alta concentración de sal retarda el inicio del crecimiento aumentando la duración de la fase de latencia.

Estos resultados coinciden con los reportados para el efecto de estos mismos factores por Rodríguez (2), quien estudió además la influencia del pH y el NaNO_2 , sobre el crecimiento del mismo microorganismo. Así mismo, Drosinos *et al.* en (2006) (43) modeló el crecimiento de *L. mesenteroides* empleando como factores la temperatura y el pH, observando que la μ_{max} incrementó en la medida que aumenta la temperatura.

A diferencia, por otra parte, de lo reportado por Korkeala *et al.* (38), quienes observaron un crecimiento de BAL inoculadas en caldo MRS con porcentajes de sal entre 1 y 2% y

una inhibición cuando emplearon más de 3% de sal, así mismo Zhang y Holley (13), bajo las mismas condiciones, observaron la inhibición del crecimiento de BAL con concentraciones entre 2,5 y 5,5% de cloruro sódico. Igualmente Kajak y Kołożyn-Krajewska, (2006) (44) encontró que concentraciones del 2% de sal inhiben el crecimiento de los microorganismos en productos cárnicos curados. Los diferentes comportamientos observados de la fase de latencia se deben al tipo de cepa, a el tamaño del inóculo, a las condiciones ambientales del estudio y a la flora microbiana competitiva propia del producto, factores que condicionan la duración de la fase de latencia y el crecimiento del microorganismo (46).

Teniendo en cuenta que la fase de latencia, es el periodo de adaptación durante el cual las células bacterianas se modifican a sí mismas, con el fin de aprovechar el nuevo entorno e iniciar el crecimiento exponencial; se hace necesario comprender y modelar como las condiciones de proceso y almacenamiento retardan las crecimiento de microorganismos alterantes con el fin de previenen la pérdida de calidad durante el almacenamiento (46). En el campo científico se reportan investigaciones que evidencian la relación entre la fase de latencia, las condiciones de proceso y las vida útil de los producto cárnicos, como la desarrollada por Slongo, et al, (2009) (45), quien utilizó la ecuación de Gompertz, para modelar el crecimiento de bacterias ácido lácticas en Jamón lonchado, tratado con altas presiones hidrostáticas y almacenado a 8 °C. Encontrando, recuentos de unidades formadoras de colonias viables en todos los tratamientos; sin embargo, el proceso aplicado incremento la fase de LPD desde los 11 días (muestra control) hasta los 55 días (muestra tratada con 400MPa durante 5 min) permitiendo extender la vida útil del producto desde 19 días hasta los 85 días respectivamente. Mostrando la importancia de modelar la fase de latencia en la vida útil de estos productos.

El *L. mesenteroides* es un microorganismo anaerobio facultativo capaz de crecer en ambos ambientes gaseosos, razón por la cual no fue posible demostrar el efecto del empleo de estos, sobre los parámetros cinéticos de la curva de crecimiento estimada. Otros autores reportan un menor crecimiento en productos cárnicos envasados en atmósferas modificadas en comparación con la atmósfera aerobia o el vacío, cuyo empleo contribuye al incremento de la vida comercial de los productos (39-41). Por su parte,

Devliegher et al., (2000) (42), desarrollo y valido un modelos para la estimación de la vida útil de productos cárnicos cocidos empacados en atmosfera modificada, empleando como factores de estudio, la temperatura, la concentración de gases, la actividad de agua y el Na-Lactato; sobre el crecimiento de *Lactobacillus sake* (bacteria ácido láctica representativa). Encontrando un efecto significativo de la temperatura y la concentración del Na-Lactato sobre la μ_{max} y el LDP, así como, un efecto sinérgico entre el Na-Lactato y la atmosfera gaseosa retardando el crecimiento del microorganismo.

Conforme los resultados obtenidos, se puede decir que el modelo secundario desarrollado es capaz de explicar el comportamiento de la velocidad de crecimiento del *L. mesenteroides* en las condiciones experimentales estudiadas. Sin embargo, es necesario continuar con el proceso de validación para verificar la exactitud del modelo en todo el campo de estudio.

Por otra parte, en las estimaciones de vida útil se puede afirmar que el modelo de Monod es capaz de estimar la vida útil del producto en las condiciones experimentales estudiadas, R^2 del 96%, sin embargo al aplicar el valor D, que explica la diferencia entre la $VU_{OBSERVADA}$ y la $VU_{PREDICHA}$, se establece que el porcentaje en que la vida útil calculada sobreestima o subestima el valor real de la vida útil, encontrándose valores máximos cercanos al 30%, ver tabla 13, por lo que el modelo debe ser revalidado, los resultados obtenidos son similares a los informados por Matagaras *et al.* (24), quien desarrolló un modelo de predicción para Bacterias ácido lácticas realizando la comparación entre diferentes criterios de perdida calidad tales como: el tiempo en el cual se presentaron defectos visuales, la concentración máxima de metabolitos secundarios y la población máxima de BAL, reportando valores de % D desde 9,26 y hasta 58,06. El modelo de Monod pudiera constituir una herramienta útil para calcular estimaciones del tiempo de vida útil de productos alterables por el crecimiento poblacional de los microorganismos que causan el deterioro de los mismos.

Conclusiones

1. La temperatura de almacenamiento es el factor que influye mayoritariamente sobre el crecimiento de *L. mesenteroides*, es decir, en la medida que se incrementa la

temperatura de almacenamiento en refrigeración igualmente se incrementa la población microbiana, y así mismo la posibilidad de que se presenten defectos o pérdida de calidad crítica en los JCLEV.

2. El modelo de superficie de respuesta permite predecir la fase de crecimiento del *L. mesenteroides* y de esta manera estimar cómo las condiciones de almacenamiento influyen sobre la población microbiana.
3. El modelo que describe la fase de adaptación presenta dificultades para explicar el comportamiento de las células, esto puede deberse a que la fase de latencia depende del estado fisiológico de las células, tamaño del inoculo y de las condiciones previas del crecimiento (Robinson *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 2000^a), por esto las predicciones de este parámetro de crecimiento deben ser interpretadas con prudencia.
4. La validación del modelo de superficie de respuesta desarrollado presentó índices estadísticos de exactitud y presión para las condiciones de aerobiosis y anaerobiosis adecuados A_f y B_f entre los valores de 1.0001 y 1,1841 así como 0,9783 y 1,1841 respectivamente lo que indica modelo es capaz de explicar los cambios en la población microbiana de *L. Mesenteroides*, pero debe continuarse el proceso de validación.
5. El empleo de la ecuación de Monod para realizar estimaciones de vida útil en función del incremento de la población microbiana alterante, mostró resultados aceptables subestimado o sobrestimado la vida útil en un máximo del 30% por lo que debe ser revalidado, es una herramienta que pudiera ser empleada en conjunto con el modelo secundario desarrollado, para estimar cómo las condiciones de almacenamiento en refrigeración afectan la calidad del producto y así mejorar la cadena de frío. Reduciendo de esta manera costos para los industriales del sector cárnico.

Agradecimientos

Al Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria (INTAL) en Medellín- Antioquia y el Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia en La Habana - Cuba, por direccionar y coordinar los recursos e instalaciones necesarios para ejecutar esta investigación.

Referencias Bibliográficas

1. Devlieghere F, Debevere J, Van Impe J. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. *Int J Food Microbiol.* 1998;41:231-8.
2. Rodríguez MR. Desarrollo y validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos: Universidad de Córdoba; 2003.
3. Björkroth KJ, Vandamme P, Korkeala HJ. Identification and characterisation of *Leuconostoc carnosum*, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:3313- 9.
4. Samelis J, Kakouri A, Georgiadou KG, Metaxopoulos J. Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *J Appl Microbiol.* 1998;84:649-60.
5. Vásquez SM, Suárez H, Zapata S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev Chil Nutr.* 2009;36(1).
6. Holzapfel WH. Culture media for non-sporulating Gram-positive food spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol.* 1992;17:113-33.
7. Holzapfel WH, Gerber ES, editors. Predominance of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake* in the spoilage association of vacuum-packaged meat products. 32nd European Meeting of Meat Research Workers; 1986; Ghent.
8. Ossa J, Coral A, Vanegas M. Microbial of cooked pork hams associated of blown pack Spoilage. Universidad de los Andes. 2010;junio 23:2078, 86.
9. Bolton DJ, Moschonas G, Sheridan JJ. Control of Blown Pack Spoilage in Vacuum Packaged Meat. Agriculture and food development authoty. 2009:Report number 101 October

10. Korkeala H, Suortti T, Mäkelä P. Ropy slime formation in vacuum packaged cooked meat products caused by homofermentative lactobacilli and a *Leuconostoc* species. *Int J Food Microbiol.* 1988;7:339-47.
11. Holley R, Lamoureux M, Dussault F. Identification of lactic spoilage bacteria from vacuum-packed cooked luncheon meat and induction of repairable injury by mild thermal stress. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie.* 1996;29(114- 122).
12. Samelis J, Metaxopoulos J. The microbiology of traditional greek contry- style sausage during manufacture followed by storage at 3o and 12o C in air. *Ital. J Food Sci.* 1998;2:155-63.
13. Zhang G, Holley RA. Development and PFGE monitoring of dominance among spoilage lactic acid bacteria from cured meats. *Food Microbiol.* 1999;16:633-44.
14. Björkroth J, Korkeala H. RNA gene restriction patterns as a characterization tool for *Lactobacillus sake* strains producing ropy slime. *Int J Food Microbiol.* 1996;30:293-302.
15. Huis In't Veld JHJ. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int J Food Microbiol.* 1996;33:1-18.
16. Susiluoto T, Korkeala H, Björkroth J. *Leuconostoc gasicomitatum* is the dominating lactic acid bacterium in retail modified-atmosphere-packaged marinated broiler meat strips on sell-by-day. *Int J Food Microbiol.* 2003;80:89-97.
17. Reuter G. Elective and selective media for lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 1985;2:55-8.
18. Sneath P, Mair N, Sharpe M, Holt J. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Baltimore, USA: Williams and Wilkins; 1986.
19. Salminen S, Wright AV, Ouwehand AC. Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects. *Lactic Acid Bacteria Classification and Physiology.* Nueva York: Marcel Dekker, Inc.; 2004.
20. Gibson A, Bratchell N, Roberts T. The effect of sodium chloride and temperature on rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J Appl Bacteriol* 1987;62:479-90.
21. Ross T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J Appl Bacteriol.* 1996;81(501- 508).

22. Giannuzzi L, Pinotti A, Zaritzky N. Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *Int J Food Microbiol.* 1998;39(101-110).
23. te Giffel MC, Zwietering MH. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 1999;46:135-49.
24. Matagaras M, Dronisos EH, Vaidanis A, Metaxopoukos I. Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. *J Food Sci.* 2006;71(6):157-67.
25. IBM® SPSS® Statistics. 21.0.0.0 ed: International Business Machines Corp. y otros 2007, 2012; 2012.
26. Design Expert 8. Versión 8.0.6 ed. Minneapolis: Stat-Easy Inc.; 2010.
27. Castillejo AM. Elaboración de modelos predictivos de crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus*. Validación en productos cárnicos envasados al vacío: Universidad de Córdoba; 2002.
28. Castillejo AM, García-Gimeno RM, Zurera G, Barco E, Rodríguez MR. Assessment of mathematical models for predicting *Staphylococcus aureus* growth in cooked meat products. *J Food Prot.* 2002;65:659-65.
29. NTC-1325. Industria alimentaria. Productos cárnicos procesados no enlatados. Bogotá, Colombia: Instituto de Normas Técnicas Colombianas; 2008.
30. McMeekin TA, Ross T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *Int J Food Microbiol.* 2002;78:133-53.
31. Cabeza H, Enrique A. Aplicaciones de la microbiología predictiva para la determinación de la vida útil de los alimentos: Universidad de Pamplona. Available from: <http://sites.google.com/site/enalcahe>.
32. Robinson TP, Ocio MJ, Kaloti A, Mackey BM. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 1998;44:83-92.
33. 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.
34. Ross T. Predictive food microbiology models in the meat industry. Meat and Livestock Australia Sydney, Australia. 1999:196.
35. García-Gimeno RM, Zurera G. Determination of ready to eat vegetable salad shelf life. *Int J Food Microbiol.* 1997;36:31-8.

36. García-Gimeno RM, Castillejo AM, Barco E, Zurera G. Determination of packaged green asparagus shelf life. *Food Microbiol.* 1998;15:191-8.
37. Korkeala H, Bjorkroth K. Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages. *J Food Prot.* 1997;60:724-31.
38. Korkeala H, Alanko T, Tiusanen T. Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 1992;33:27-32.
39. Pikul J, Holownia K, Cegielska-Radziejewska R, Kijowski J. Effect of packaging method and refrigerated storage time on the quality and shelf life of breaded poultry products. *Chlodnictwo* 1997;32.
40. Cegielska-Radziejewska R, Pikul J. Modified atmosphere packaging as a way of prolonging shelf-life of sliced poultry sausages stored in refrigerated conditions. *Chlodnictwo.* 2000;35:37-41.
41. Cegielska-Radziejewska R, Pikul J. Effect of gas atmosphere, storage temperature and time on the quality and shelf-life of sliced poultry sausage. *Archiv fuer Gefluegelkunde.* 2001;65:274-80.
42. Devliegher, F., Geeraerd, A. H., Versyck, K. J., Bernaert, H., Van Impe, J. F., & Debevere, J. (2000). Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *International journal of food microbiology*, 58(1-2), 93–106.
43. Drosinos, E. H., Mataragas, M., & Metaxopoulos, J. (2006). Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat science*, 74, 690–696.
44. Kajak, K., & Kołożyn-Krajewska, D. (2006). Construction of predictive models of growth of microorganisms in salted and cured meat products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1-2), 152–159.
45. Slongo, A. P., Rosenthal, A., Quaresma Camargo, L., Deliza, R., Falcao de Arango, M., & Simone Pereira, M. (2009). Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 303–306.
46. Swinnen, I. a M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, a H., & Van Impe, J. F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International journal of food microbiology*, 94(2), 137–59.

46. Van Derlinden, E., Mertens, L., & Van Impe, J. F. (2013). The impact of experiment design on the parameter estimation of cardinal parameter models in predictive microbiology. *Food Control*, 29(2), 300–308.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- La cadena de frío y los controles que actualmente se ejercen en las empresas del sector cárnico para evitar el deterioro de los JCLEV son ineficientes, ya que, todas las marcas evaluadas desde el punto fisicoquímico se encuentran alterados 25 días antes de la fecha de vencimiento, por la producción de ácido láctico de las BAL acortando su vida de útil, provocando pérdida de calidad sensorial. Por tanto las BAL pueden ser empleadas como un indicativo, del deterioro fisicoquímico, la calidad de los procesos de elaboración e inadecuadas condiciones de almacenamiento, ya que influyen negativamente sobre la estabilidad sensorial y fisicoquímica de los JCLEV.
- Las UFC/g predominantes en las marcas de JCLEV se caracterizaron por ser pequeñas, de color beige, con borde regular, bacilo Gram positivos, anaerobio facultativo, que no producen catalasa ni oxidasa. Pertenecientes a la especie de *Leuconostoc mesenteroides*.
- La temperatura de almacenamiento es el factor que influye mayoritariamente sobre el crecimiento de *L. mesenteroides*, es decir, en la medida que se incrementa la temperatura de almacenamiento en refrigeración igualmente se incrementa la población microbiana, y así mismo la posibilidad de que se presenten defectos o pérdida de calidad crítica en los JCLEV.
- El modelo de superficie de respuesta permite predecir la fase de crecimiento del *L. mesenteroides* y de esta manera estimar cómo las condiciones de almacenamiento influyen sobre la población microbiana.

- El modelo que describe la fase de adaptación presenta dificultades para explicar el comportamiento de las células, esto puede deberse a que la fase de latencia depende del estado fisiológico de las células, tamaño del inoculo y de las condiciones previas del crecimiento (Robinson *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 2000^a), por esto las predicciones de este parámetro de crecimiento deben ser interpretadas con prudencia.
- La validación del modelo de superficie de respuesta desarrollado presentó índices estadísticos de exactitud y precisión para las condiciones de aerobiosis y anaerobiosis adecuados A_f y B_f entre los valores de 1.0001 y 1,1841 así como 0,9783 y 1,1841 respectivamente lo que indica modelo es capaz de explicar los cambios en la población microbiana de *L. Mesenteroides*, pero debe continuarse el proceso de validación.
- El empleo de la ecuación de Monod para realizar estimaciones de vida útil en función del incremento de la población microbiana alterante, mostró resultados aceptables subestimado o sobrestimado la vida útil en un máximo del 30% por lo que debe ser revalidado, es una herramienta que pudiera ser empleada en conjunto con el modelo secundario desarrollado, para estimar cómo las condiciones de almacenamiento en refrigeración afectan la calidad del producto y así mejorar la cadena de frío. Reduciendo de esta manera costos para los industriales del sector cárnico.

4.2 RECOMENDACIONES

Continuar mejorando la calidad de la estimación obtenida por los modelos incluyendo otros factores intrínsecos y extrínsecos; así como evaluar el comportamiento de los modelos en condiciones de temperatura fluctuantes con el fin de aumentar el rango de aplicación.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Améquita, A., Weller, C. L., Wang, L., Thippareddi, H., & Burson, D. E. (2005). Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. *International journal of food microbiology*, Vol. 101, Pág. 123–144.
- Amos, S. a., Davey, K. R., & Thomas, C. J. (2001). A Comparison of Predictive Models for the Combined Effect of UV Dose and Solids Concentration on Disinfection Kinetics of *Escherichia Coli* for Potable Water Production. *Process Safety and Environmental Protection*, Vol. 79(3), Pág. 174–182.
- Antwi, M., Bernaerts, K., Impe, J. F. Van, & Geeraerd, A. H. (2007). Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono- and coculture. *Journal of food microbiology*.
- Antwi, M., Theys, T. E., Bernaerts, K., Impe, J. F. Van, & Geeraerd, A. H. (2008). International Journal of Food Microbiology Validation of a model for growth of *Lactococcus lactis* and *Listeria innocua* in a structured gel system: Effect of monopotassium phosphate, 125.
- Beldarraín, T., Nuñez de Villavicencio, M., Aloyda Guerra, M., & Bruselas, A. (2012). Comparison of arrhenius and ratkovsky mathematical model to predict the behavior of *staphylococcus aureus* in hamburger (pág. 1–11).
- Baranyi, J, Pin, C., & Ross, T. (1999). Validating and comparing predictive models. *International journal of food microbiology*, Vol. 48(3), Pág. 159–66.
- Baranyi, J, Ross, T., McMeekin, T. ., & Roberts, T. . (1996). Effects of parameterization on the performance of empirical models used in predictive microbiology. *Food Microbiology*, Vol. 13(1), Pág. 83–91.
- Baranyi, J., Robinson, T. P., Kaloti, A., & Mackey, B. M. (1995). Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International journal of food microbiology*, Vol. 27(1), Pág. 61–75.

- Baranyi, József., & Pin, C. (2001). Modelling microbiological safety. In *Woodhead publishing* (Pág. 1 –19).
- Beldarraín, T., Villavicencio, M. N. D., Ramos, M., & Bruselas, A. (2007). Modelo predictivo del efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento de *E. Coli* y *alcaligenes sp.* *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, Vol. 17(3), Pág. 31–37.
- Bover-cid, S., Belletti, N., Garriga, M., & Aymerich, T. (2011). Response surface methodology to investigate the effect of high pressure processing on *Salmonella* inactivation on dry-cured ham. *Food research International*, Pág. 1–7.
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., & Aymerich, T. (2012). Response surface methodology to investigate the effect of high pressure processing on *Salmonella* inactivation on dry-cured ham. *Food Research International*, Vol. 45(2).
- Brugalla Vila, M. (2008). Aplicación de la microbiología predictiva en la industria alimentaria.
- Caballero Torres, Á. E. (2008). *Temas de higiene de los alimentos* (Pág. 1 – 387). La Habana.
- Cardelli, C., & Labuza, T. (2001). Application of Weibull hazard analysis to the determination of the shelf life of roasted and ground coffee. *LWT-Food Science and Technology*, Vol. 34, Pág. 271 – 278.
- Céspedes Molina, G. A. (2012). Predicción del comportamiento de *Escherichia coli* en leche cruda al elevar la temperatura hasta la pasteurización aplicando microbiología predictiva. Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito.
- Chenoll, E., Macián, M. C., Elizaquível, P., & Aznar, R. (2007). Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 102, Pág. 498–508.
- Coll Cárdenas, F., Giannuzzi, L., Noia, M. A., & Zaritzky, N. (2001). El modelado matemático: Una herramienta útil para la industria alimenticia. *Ciencia Veterinaria.*, Pág. 22–28.
- Costa, R., & Kristbergsson, K. (2009). *Predictive Modeling and Risk Assessment*. (K. Kristbergsson, Ed.) Pág. 1 – 225.

- Descremada, L., En, E., Valbuena, E., Barreiro, J., Sánchez, E., Castro, G., & Kutchinskaya, V. (2008). Growth Prediction of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in Sterile Skimmed Milk as a Function of Temperature, XVIII, Pág.745–758.
- Devliegher, F., Geeraerd, A. H., Versyck, K. J., Bernaert, H., Van Impe, J. F., & Debevere, J. (2000). Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *International journal of food microbiology*, Vol. 58(1-2), Pág. 93–106.
- Devlieghere, F., Van Belle, B., & Debevere, J. (1999). Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *International journal of food microbiology*, Vol. 46(1), Pág. 57–70.
- Dominguez, S. A., & Schaffner, D. W. (2007). Development and validation of a mathematical model to describe the growth of *Pseudomonas* spp . in raw poultry stored under aerobic conditions. *International journal of food microbiology*, Vol. 120, Pág. 287–295.
- Doyle, M. P. (2009). *Food microbiology and food safety* (Pág. 1 – 374). New York, NY: Springer.
- Drosinos, E. H., Mataragas, M., & Metaxopoulos, J. (2006). Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat science*, Vol. 74, Pág. 690–696.
- Flores rondón, C., Leal, M., Ruiz ramírez, J., Sánchez, E., Moreno, M., & Castro, G. (2011). Tiempo de almacenamiento e identificación de bacterias ácido lácticas en carne de res picada empacada al vacío. *Revista Científica, FCV-LUZ*, XXI, 425–433.
- Garcés Vega, F. J. (2003). Modelamiento del efecto de la temperatura y el ph en el crecimiento y producción de sustancias inhibitorias de bacterias del lactobacillus acidophilus. Universidad de la Sabana - Bogota.
- García Alvarez, D. A., & Jerez Navas, J. R. (2004). Modelamiento del efecto de la temperatura y el ph en el crecimiento y producción de blis del lactobacillus casei y optimización de los parámetros propuestos.
- García Gimeno, R. M., Hervás Martinez, C., Rodríguez Pérez, R., & Zurera Cosano, G. (2005). Modelling the growth of *Leuconostoc mesenteroides* by Artificial Neural Networks. *International journal of food microbiology*, Vol. 105, Pág. 317–332.

- Gardinib, F., Elisabetta, M., & Dellaglio, F. (1996). Use of Response Surface Methodology to Evaluate some Variables Affecting the Growth and Acidification Characteristics of Yoghurt Cultures. *int. Dairy journal*, Vol. 6, Pág. 625–636.
- Geeraerd, a H., Valdramidis, V. P., Devlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J., & Van Impe, J. F. (2004). Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International journal of food microbiology*, Vol. 91(3), Pág. 229–44.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme , nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *International journal of food microbiology* Vol. 80, Pág. 251–259.
- Gonzalez, M., Suárez, H., & Martinez, O. (2010). Influencia del proceso de cicción y temperatura de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del jamón de cerdo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, Vol. XX (574), Pág. 336–348.
- González, M., Suárez, H., & Martínez, O. (2009). Relación entre las características fisicoquímicas y sensoriales en jamón de cerdo. *revista de la facultad de química farmacéutica*, Vol. 16 (104), Pág. 183–189.
- Gordon L, R. (2009). *Food packaging and Shelf life* (Pág. 1 – 408). Taylor and Francis Group, LLC.
- Grijpspeerd, K., & Vanrolleghem, P. (1999). Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth. *Food microbiology*, Vol. 16(Peleg 1997), Pág. 593–605.
- Gudmundsson, G., & Kristbergsson, K. (2009). Shelf-Life Prediction of Chilled Foods. In *Predictive Modeling and Risk Assessment* Pág. 101–119.
- Guerra, S., Lagazio, C., Manzocco, L., Barnaba, M., & Cappuccio, R. (2008). Risks and pitfalls of sensory data analysis for shelf life prediction: Data simulation applied to the case of coffee. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 41, Pág. 2070 – 2078.
- Herrera Cabeza, E. A. (2011). Aplicación de la Microbiología Predictiva para la determinación de la vida útil de los alimentos.
- Hough, G., & Fiszman, S. (2005). *Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos* (Pág.. 1 – 114). Programa CYTED.

- Hougha, G., Calle, M. L., Serrat, C., & Curia, A. (2007). Number of consumers necessary for shelf life estimations based on survival analysis statistics. *Food Quality and Preference*, Vol. 18, Pág. 771 – 775.
- Juneja, V. K., Melendres, M. V., Huang, L., Subbiah, J., & Thippareddi, H. (2009). Mathematical modeling of growth of *Salmonella* in raw ground beef under isothermal conditions from 10 to 45 degrees C. *International journal of food microbiology*, Vol. 131(2-3), Pág. 106–110.
- Kajak, K., & Kolożyn-Krajewska, D. (2006). Construction of predictive models of growth of microorganisms in salted and cured meat products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Vol. 7(1-2), Pág. 152–159.
- Kilcast, D., & Subramaniam, P. (2000). *The stability and shelf-life of food* (Pág. 1 – 344). New york: Woodhead Publishing Limited Abington.
- Koseki, S., Mizuno, Y., & Yamamoto, K. (2007). Predictive modelling of the recovery of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked ham after high pressure processing, Vol. 119, Pág. 300–307.
- Labuza, T. P., & Fu, B. (1993). Growth kinetics for shelf-life prediction: Theory and practice. *Journal of Industrial Microbiology*, Vol. 12(3-5), Pág. 309–323.
- Limbo, S., Torri, L., Sinelli, N., Franzetti, L., & Casiraghi, E. (2010). Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Science*, Vol. 84(1), Pág. 129–136.
- Man, C. M. D. (South B. U. 2000). Determining shelf-life (Pág. 2 – 17). London: South Bank University.
- Masana, M. O., & Baranyi, J. (2000). Growth/no growth interface of *Brochothrix thermosphacta* as a function of pH and water activity. *Food Microbiology*, 17(5).
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., Vaidanis, a., & Metaxopoulos, I. (2006). Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and Its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. *Journal of Food Science*, Vol. 71(6), Pág. 157–167.
- McDonald, K., & Sun, D. W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International journal of food microbiology*, Vol. 52(1-2), Pág. 1–27.

- McMeekin, T. a, Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M., Ross, T., ... Zwietering, M. H. (2006). Information systems in food safety management. *International journal of food microbiology*, Vol. 112(3), Pág. 181–194.
- McMeekin, T. a, & Ross, T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International journal of food microbiology*, Vol. 78(1-2), Pág. 133–53.
- McMeekin, T. A. (2007). Predictive microbiology: Quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat science*, Vol. 77(1), Pág. 17–27.
- McMeekin, T., Bowman, J., McQuestin, O., Mellefont, L., Ross, T., & Tamplin, M. (2008). The future of predictive microbiology: strategic research, innovative applications and great expectations. *International journal of food microbiology*, Vol. 128(1), Pág. 2–9.
- McMeekin, T., Olley, J., Ratkowsky, D., Corkrey, R., & Ross, T. (2013). Predictive microbiology theory and application: Is it all about rates? *Food Control*, Vol. 29(2), Pág. 290–299.
- Membré, J.-M., Leporq, B., Vialette, M., Mettler, E., Perrier, L., Thuault, D., & Zwietering, M. (2005). Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *International journal of food microbiology*, Vol. 100(1-3), Pág. 179–186.
- Métris, A., Le Marc, Y., Elfwing, A., Ballagi, A., & Baranyi, J. (2005). Modelling the variability of lag times and the first generation times of single cells of *E. coli*. *International journal of food microbiology*, Vol. 100(1-3), Pág. 13–19.
- Michael, N., Grady, O., & Kerry, J. P. (2008). Smart Packaging Technologies and Their Application in Conventional Meat Packaging Systems. In *Meat Biotechnology* (Pág. 425–451).
- Molinero Sánchez, F. (2005). Modificaciones tecnológicas para mejorar la seguridad y calidad del jamón curado. Universidad de Girona.
- Møller, C., Ilg, Y., Aabo, S., Christensen, B. B., Dalgaard, P., & Hansen, T. B. (2013). Effect of natural microbiota on growth of *Salmonella* spp. in fresh pork - a predictive microbiology approach. *Food microbiology*, Vol. 34(2), Pág. 284–95.

- Møller, S., Bertram, H., Andersen, U., Lillevang, S., Rasmussen, A., & Hansen, T. (2013). Physical sample structure as predictive factor in growth modeling of *Listeria innocua* in a white cheese model system. *Food microbiology*, Vol. 36(1), Pág. 90–102.
- Neumeyer, K., Ross, T., & McMeekin, T. a. (1997). Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage *pseudomonads*. *International journal of food microbiology*, Vol. 38(1), Pág. 45–54.
- Neumeyer, K., Ross, T., Thomson, G., & McMeekin, T. A. (1997). Validation of a model describing the effects of temperature and water activity on the growth of psychrotrophic *pseudomonads*. *International journal of food microbiology*, Vol. 38(1), Pág. 55–63.
- NTC 1325. (2008). Norma técnica Colombiana. Industrias alimentarias. productos cárnicos procesados no enlatados. Colombia.
- Nuñez de villavicencio, M. (2011). *La vida útil de los alimentos. Métodos de estimación* (Pág. 2 – 154). Instituto de investigaciones para la industria alimenticia.
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat science*, Vol. 78(1-2), 77–89.
- Ossa Canencio, J., Restrepo, S., Coral Durago, A., & Vanegas Lopez, M. (2010). Caracterización de la microbiota en la cadena de producción de jamón de cerdo cocido asociado al deterioro por abombamiento del empaque.
- Ossa, J., Coral, A., & Vanegas, M. (2010). Microbiota de jamones de cerdo cocidos asociada al deterioro por abombamiento del empaque Microbial of cooked pork hams associated of blown pack spoilage. *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia cordoba*, Vol. 15(2), 2078–2086.
- Parra, F. (2009). Aplicación de la evaluación de riesgos microbiológicos en la industria de alimentos. In *Universidad de Minesota (EE UU)* (Pág. 1 – 7).
- Parveen, S., DaSilva, L., DePaola, A., Bowers, J., White, C., Munasinghe, K. A., Tamplin, M. (2013). Development and validation of a predictive model for the growth of *Vibrio parahaemolyticus* in post-harvest shellstock oysters. *International journal of food microbiology*, Vol. 161(1), Pág. 1–6.
- Perez, D., & Andujar, G. (2000). Cambios de coloración de los productos cárnicos. *Revista cubana de alimentos*, Vol. 14(2), Pág. 114–123.

- Phua, S. T. G., & Davey, K. R. (2007). Predictive modelling of high pressure (≤ 700 MPa)–cold pasteurisation ($\leq 25^{\circ}\text{C}$) of *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in three liquid foods. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, Vol. 46(5), Pág. 458–464.
- Pin, C., & Baranyi, J. (1998). Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms. *International journal of food microbiology*, Vol. 41(1), Pág. 59–72.
- Posada-Izquierdo, G. D., Pérez-Rodríguez, F., López-Gálvez, F., Allende, A., Selma, M. V., Gil, M. I., & Zurera, G. (2013). Modelling growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut lettuce submitted to commercial process conditions: chlorine washing and modified atmosphere packaging. *Food microbiology*, Vol. 33(2), Pág. 131–138.
- Restrepo Molina, D. A., Arango Mejía, C. M., Amézquita Campuzano, A., & Restrepo Digiammarco, R. A. (2001). *Industrialización de carnes* (Pág. 1 – 279). Universidad Nacional de Colombia en la ciudad de Medellín.
- Robertson, G. L. (2000). Shelf Life of Packaged Foods, Its Measurement and Prediction. In *Food Packaging: Principles and Practices* (Pág. 1 – 25).
- Rodriguez Perez, M. del R. (2003). Desarrollo y validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos. Tesis doctoral Universidad de Cordoba.
- Rondón, E., Ortega, F., & Pacheco Delahaye, E. (2004). Estimación de la vida útil de un análogo comercial de mayonesa. *Revista de la Facultad de Agronomía*, Vol. 21(1), Pág. 1 – 7.
- Ross, T, Ratkowsky, D. a, Mellefont, L. a, & McMeekin, T. a. (2003). Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology*, Vol. 82(1), Pág. 33–43.
- Ross, Tom, Dalgaard, P., & Tienungoon, S. (2000). Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Journal of food microbiology*, Vol. 62, Pág. 231–245.
- Salcido, F., De, N. M., Corona, B., & Eleazar, J. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta universitaria*, Pág. 42 – 52.

- Salter, M. a, Ratkowsky, D. a, Ross, T., & McMeekin, T. a. (2000). Modelling the combined temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using nonlinear logistic regression. *International journal of food microbiology*, Vol. 61(2-3), Pág. 159–67.
- Salvador, J. (2013). Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a diferentes tratamientos conservantes de alimentos. tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Shimoni, E., & Labuza, T. (2000). Modeling pathogen growth in meat products: future challenges. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 11, Pág. 394 – 402.
- Slongo, A. P., Rosenthal, A., Camargo Quaresma, L. M., Deliza, R., Falcao de Arango, M. G., & Simone Pereira, M. (2009). Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 42, Pág. 303–306.
- Sun, D. wen. (2012). *Handbook of Food Safety Engineering* (Pág. 1 – 855). Wiley Blackwell Online Library.
- Sutherland, J. P., Bayliss, A. J., & Braxton, D. S. (1995). Predictive modelling of growth of *Escherichia coli* 0157 : H7 : the effects of temperature , pH and sodium chloride. *International journal of food microbiology*, Vol. 25, Pág. 29–49.
- Tarté, R. (2009). *Ingredients in Meat Products*. (R. Tarté, Ed.) (Pág.. 11 – 420). New York, NY: Springer New York.
- Tirado, J., Paredes, D., Velázquez, G., & Torres, J. (2005). Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, Vol. 5, Pág. 66–76.
- Toldrá, F. (2001). *Meat Biotechnology* (Pág. 1–494). Springer.
- Toldrá, F. (2009). *Safety of Meat and Processed Meat*. (F. Toldrá, Ed.) (Pág. 1 – 700). New York, NY: Springer New York.
- Toldrá, F., & Nollet, L. M. L. (2006). *Advanced Technologies for Meat processing*. (L. M. L. N. and F. Toldrá., Ed.) (1st ed., Pág. 5 – 502). New york: Taylor & Francis.
- Tran, H. (2004). *Lactic Acid Bacteria* (Seppo Salm., Pág. 1 – 628). New york: Marcel Dekker, Inc. All Rights Reserved.
- Valdramidis, V. P., Belaubre, N., Zuniga, R., Foster, a M., Havet, M., Geeraerd, a H., Kondjoyan, a. (2005). Development of predictive modelling approaches for surface

- temperature and associated microbiological inactivation during hot dry air decontamination. *International journal of food microbiology*, Vol. 100(1-3), Pág. 261–74.
- Valero, a., Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., García-Gimeno, R. M., & Zurera, G. (2006). Modeling the Growth Rate of *Listeria Monocytogenes* Using Absorbance Measurements and Calibration Curves. *Journal of Food Science*, Vol. 71(7), Pág. 257–264.
- Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A. S., Linton, R. H., & Sheard, M. A. (1999). Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food microbiology*, Vol. 16, Pág. 269–279.
- Yanqing, H., Yun, J., Xinglian, X., Xinsheng, S., Baocai, X., & Guanghong, Z. (2011). Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. *Meat Science*, Vol. 88(4), Pág. 682–688.
- Zúñiga Velázquez, E. (2012). Aislamiento de *leuconostoc* spp. Con capacidad para deteriorar jamón cocido, rebanado y empacado al vacío, y su inactivación mediante alta presión hidrostática y ondas de choque. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Querétaro.

6. ANEXOS

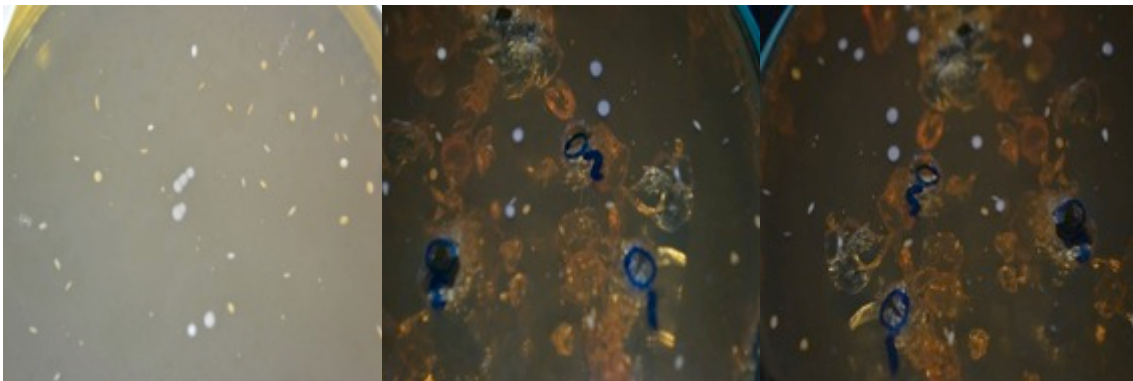
6.1 Jamones cocidos lonchados empacados al vacío 25 días antes de FV.



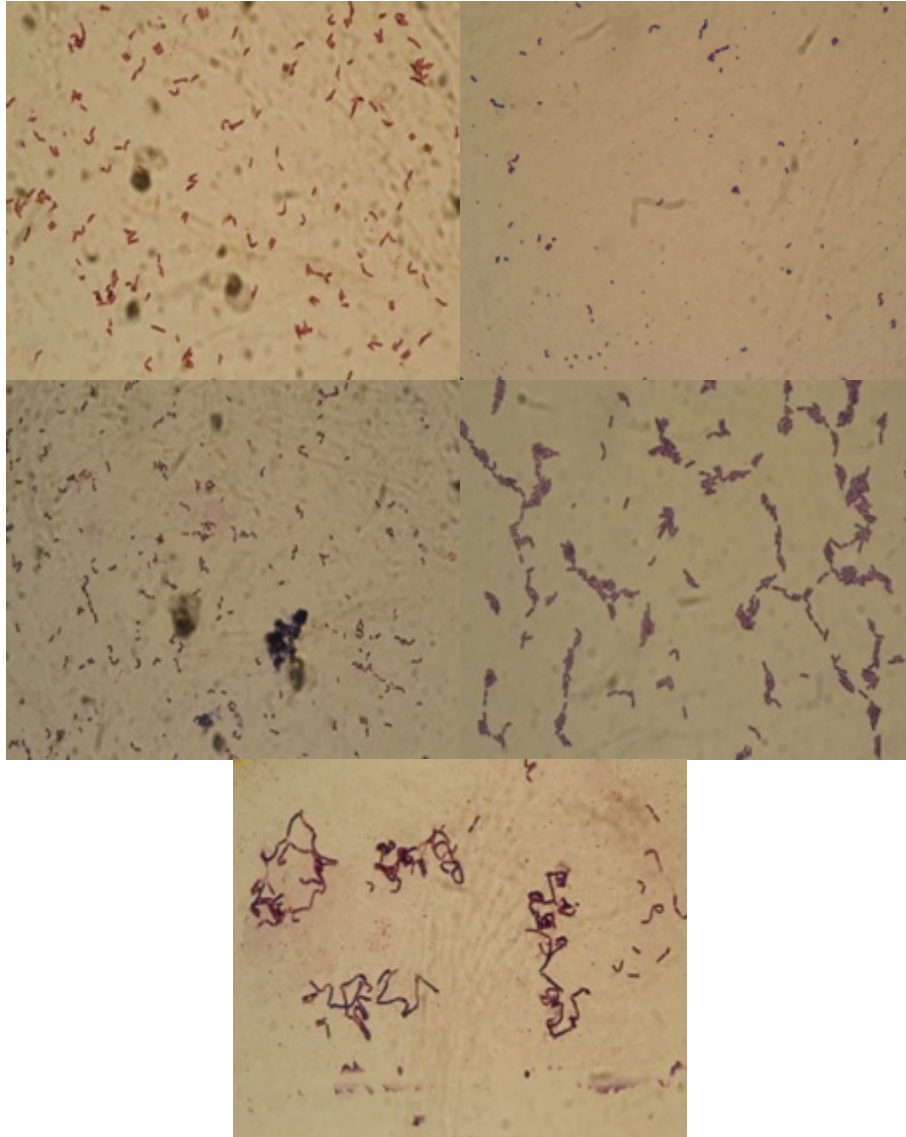
6.2 Jamones cocidos lonchados empacados al vacío 15 días después de FV.



6.3 Identificación macroscópica.



6.4 Identificación microscópica.



6.5 Pruebas bioquímicas de identificación.

TECNIMICRO LABORATORIO DE ANÁLISIS S.A.S

Nº de cliente:
Equipo Nº: VK2C

Informe de examen

Editado 11-jul-2012 08:09 COT
Editado por: Jose Palomino

Examen: 76635-1

Bionúmero: 01000000211031

Organismo seleccionado: Leuconostoc mesenteroides ssp dextranicum

Comentarios:	Características Microscópicas: Bacilos cortos gram positivos. Características Macroscópicas: Colonias pequeñas, de color beige y borde regular

Información de identificación	Tarjeta: GP	Nº de lote: 242243140	Fecha caduc.: 10-ago-2013 12:00 COT
	Finalizado: 11-jul-2012 01:39 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 8,25 horas
Organismo seleccionado	88% Probabilidad Leuconostoc mesenteroides ssp dextranicum		
Organismo SRF	Bionúmero: 01000000211031 Nivel de confianza: Discriminación débil		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Low Discrimination Organism			
Gemella morbillorum	Gas prod.(1),VANCO_R(1),		
Leuconostoc mesenteroides ssp dextranicum	Gas prod.(99),VANCO_R(99),		
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			
Gemella morbillorum	NOVO(15),NAG(78),APPA(85),ADH1(10),POLYB(96),dTRE(22),		
Leuconostoc mesenteroides ssp dextranicum	NAG(82),BACI(96),ADH1(1),AGLU(82),		

Detalles bioquímicos																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	-	37	dGAL	-
38	dRIB	-	39	ILATk	-	42	LAC	-	44	NAG	-	45	dMAL	+	46	BACI	-
47	NOVO	+	50	NC6.5	-	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	-	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	-	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

José Palomino 11/07/12

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 05.01
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

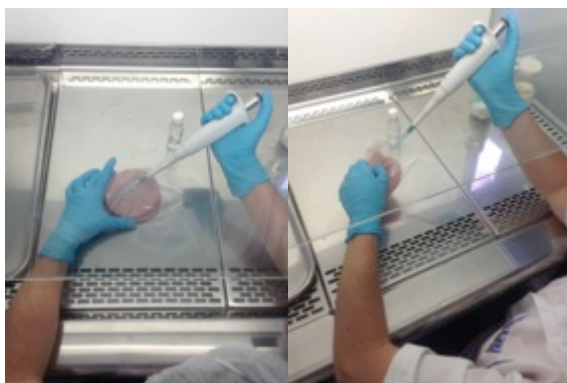
Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

6.6 Procedimiento experimental para la validación del modelo secundario.

1. Lonchado y empacado del JCLEV.



2. Inoculación de *L. mesenteroides* en el JCLEV.



3. Empacado al vacío y almacenamiento en refrigeración (4 y 10°C).



6.7 Artículo aprobado para publicación Revista LASALLISTA de investigación.



Medellín, 1 de diciembre de 2012



EL EDITOR DE LA REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACIÓN

HACE CONSTAR QUE

Los siguientes artículos fueron aprobados para publicación en la Revista LASALLISTA de Investigación Vol. 9, No. 2 de Julio a Diciembre de 2012. La revista está clasificada en categoría A2 del Índice Bibliográfico Nacional Publindex de Colciencias.

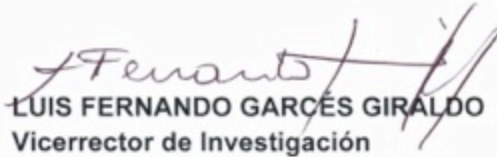
1. Efecto del pH y la temperatura en la hidrólisis enzimática de subproductos de la industria bovina. Autores: Salazar-Posada, C., López-Padilla, A., Cano-Salazar, J.A
2. Application of the matrixes engineering on the development of minimally processed Hass avocado (Persea americana Mill) with additions of vitamin C and Calcium. Autores: Henríquez Arias, L. E, Patiño Gómez, J. H, Cano Salazar, J.A
3. Efecto de la cadena de frío sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, la calidad fisicoquímica y la alteración de jamones cocidos lonchados empacado al vacío. Autores: Buelvas Salgado, G.A., Patiño Gómez, J. H., Restrepo Flores, C.E.

Cra.51 118sur-57 Caldas-Antioquia-Colombia / PBX (574)300 0200 / FAX Ext.184 / NIT 890.984.812-5 / Apartado 50130 de Medellín

www.lasallista.edu.co

4. Obtención del complejo ciclodextrina-curcumina y su uso como reemplazante de tartrazina. Autores: Alzate Ceballos, J.A., López Padilla, A., Caicedo, J.A., Cano Salazar, J.A.
5. Efectos del empaqueo en atmósferas modificadas para la conservación de arepa de maíz. Autores: Restrepo Flórez, C.E., Montes Álvarez, L.M., Cano Salazar J.A.
6. Evaluación de un producto a base ácidos orgánicos frente a *E. coli* y *Salmonella* spp, en la desinfección de lechuga fresca. Autores: Gómez Álvarez, L. M., Jaimes Suárez, S., Montes Álvarez J.
7. Evaluación del proceso de extracción de aceite de aguacate hass (*Persea americana* Mill) utilizando tratamiento enzimático. Autores: Buelvas Salgado, G. A., Patiño Gómez, J. H., Cano Salazar, J.A.

Atentamente,


LUIS FERNANDO GARCÉS GIRALDO
Vicerrector de Investigación

6.8 Constancia del sometimiento a la revista VITAE el Artículo 2.

The image shows two screenshots. The top one is a Gmail interface with an email from Luis Guillermo Restrepo to Gustavo Andrés Buelvas Salgado. The email text reads: "Gracias por enviarnos su manuscrito 'Developing a predictive model for Leuconostoc mesenteroides growth to predict vacuum packed sliced ham shelf life' a Vitae. Gracias al sistema de gestión de revistas online que usamos podrá seguir su progreso a través del proceso editorial identificándose en el sitio web de la revista: URL del manuscrito: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/author/submission/15294> Nombre de usuario/a: gabuelvass Si tiene cualquier pregunta no dude en contactar con nosotros/as. Gracias por tener en cuenta esta revista para difundir su trabajo."

The bottom screenshot is a journal submission page for "VITAE". It shows the submission details for article #15294. The submission status is "Envío" (Submitted). The authors listed are Gustavo Andrés Buelvas Salgado, Jairo Patiño Gomez, Margarita Nuñez de Villavicencio, Luz Gomez Alvarez, and Jaime Cano Salazar. The title is "Developing a predictive model for Leuconostoc mesenteroides growth to predict vacuum packed sliced ham shelf life". The submission date is May 20, 2013, at 10:40. The current state is "Esperando asignación" (Waiting for assignment).

Envío	
Autores	Gustavo Andrés Buelvas Salgado, Jairo Patiño Gomez, Margarita Nuñez de Villavicencio, Luz Gomez Alvarez, Jaime Cano Salazar
Título	Developing a predictive model for Leuconostoc mesenteroides growth to predict vacuum packed sliced ham shelf life
Fichero original	Ninguno
Ficheros ad.	15294-51167-1-SP.ZIP 2013-05-20 AÑADIR FICHERO ADICIONAL
Persona que hace el envío	Gustavo Andrés Buelvas Salgado ✉
Fecha de envío	mayo 20, 2013 - 10:40
Sección	Artículos Completos
Editor/a	Ninguno asignado

Estado	
Estado	Esperando asignación
Iniciado	2013-05-20
Última modificación	2013-05-20

Envío de metadatos	
EDITAR METADATOS	

AUTORES	
Nombre	Gustavo Andrés Buelvas Salgado ✉
Filiación	Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria
País	Colombia

6.9 Instrucciones para los autores Revista VITAE.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES¹

Acta 22 de Junio de 2012

ALCANCE Y POLÍTICA DE REVISIÓN

La Revista VITAE es una publicación científica de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia, con una periodicidad cuatrimestral, que tiene como misión la divulgación del desarrollo y los avances académicos e investigativos en los diversos campos de las ciencias farmacéuticas, alimentarias y afines. Publica manuscritos originales e inéditos, los cuales son seleccionados por el Comité Editorial y evaluados por pares nacionales e internacionales. La responsabilidad por los juicios, opiniones y puntos de vista expresados en los manuscritos publicados corresponde exclusivamente a los autores. La posición de la Facultad se consigna en la sección Editorial.

VISIBILIDAD

La Revista VITAE está indexada en las siguientes bases de datos:

- **ISI Web of Science:** Thomson Scientific. **Factor de impacto año 2011: 0.253.**
- **PUBLINDEX:** Índice Nacional de Publicaciones Seriadas, Científicas y Tecnológicas de Colombia. Colciencias. Categoría A1.
- **SciVerse SCOPUS/Elsevier B.V.**
- **EMBASE:** Biomedical Answers.
- **LILACS:** Índice de la Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud.
- **LATINDEX:** Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas.
- **CUIDEN:** Base de datos, Granada (España).
- **CAS:** Chemical Abstracts.
- **SciELO:** Scientific Electronic Library Online.
- **OJS:** Open Journal System.
- **DOAJ:** Directory of Open Access Journals.
- **e-revistas:** Plataforma Open Access de Revistas Electrónicas Españolas y Latinoamericanas.
- **REDALYC:** Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal.
- **SIIC Data Bases:** Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC).

RESERVA DE DERECHOS

El estudio y la selección de los manuscritos enviados por los colaboradores están a cargo del Comité Editorial. La recepción de un manuscrito no implica la aceptación ni publicación del mismo. En los manuscritos aceptados, el Comité Editorial se reserva el derecho de realizar las modificaciones editoriales necesarias para su publicación, al igual que su fecha de aparición en la Revista.

TIPOS Y CLASIFICACIÓN DE LOS MANUSCRITOS

La Revista VITAE publica los siguientes tipos de manuscritos:

- Artículos Resultado de Investigación
- Artículos Cortos
- Revisiones Estructuradas
- Editorial y Comentarios Editoriales
- Cartas al Editor

Los artículos son clasificados en una de las siguientes secciones:

- Alimentos: Ciencia, Tecnología e Ingeniería
- Atención Farmacéutica
- Biotecnología
- Farmacología y Toxicología
- Industrial Farmacéutica
- Productos Naturales

PRESENTACIÓN DE MANUSCRITOS

La Revista VITAE acepta para evaluación manuscritos en español y/o en inglés. El envío del manuscrito se debe realizar a través de la plataforma Open Journal System, donde la Revista administra los procesos de evaluación y publicación. Para ello, se debe dirigir a la página web: www.udca.edu.co/vitae. De igual manera, se debe adjuntar los documentos solicitados por el equipo editorial, tal como se especifica en la información consignada en dicha página: los formatos (información del manuscrito y de los autores) y la licencia de acceso abierto. El

¹ La documentación requerida para presentar los manuscritos: los formatos, la lista de verificación, la licencia de acceso abierto a la publicación y una copia de estas instrucciones pueden ser descargados del sitio web www.udca.edu.co/vitae

documento se debe presentar en formato Word®, a doble espacio, con tipo de letra Times New Roman de 12 puntos, con márgenes simétricos de 3 cm. Los Artículos Resultado de Investigación sometidos a la Revista VITAE deben tener una extensión máxima de 25 páginas, incluyendo tablas y figuras, los Artículos cortos una extensión máxima de 15 páginas y las Revisiones Estructuradas de 30 páginas, máximo. Las Revisiones Estructuradas deben tener un mínimo de 50 referencias bibliográficas.

REVISIÓN PREVIA AL CUMPLIMIENTO DE LAS NORMAS Y POLÍTICAS EDITORIALES:

Verificación del cumplimiento de las normas editoriales. El Equipo Editorial realiza una revisión en la que se verifica que el manuscrito cumpla con las normas estipuladas en este documento: entrega de la información solicitada, licenciamiento de la obra, estructura completa y adecuada del manuscrito y citación de acuerdo a las normas Vancouver. El autor puede verificar el cumplimiento de los requisitos antes de enviar el manuscrito utilizando la *Lista de Verificación* que se encuentra disponible en la página web, en *Author's forms and guidelines*.

Revisión Editorial. Posterior a la verificación del cumplimiento de las normas editoriales, antes de ser enviados a la evaluación por pares, el Comité Editorial realiza una evaluación previa de todos los manuscritos que cumplen las normas editoriales. El propósito de esta pre-revisión es garantizar que la estructura del manuscrito y los contenidos sean claros, pertinentes y reportados adecuadamente, con el fin de facilitar la evaluación por parte de los pares. Como resultado, el manuscrito puede ser enviado a revisión por pares, devuelto a los autores para correcciones o rechazado.

REVISIÓN POR PARES (PEER-REVIEW):

Una vez el Comité Editorial verifica que el manuscrito cumple con todos los parámetros establecidos por la Revista envía el manuscrito a dos pares, como mínimo, quienes deben emitir su concepto por escrito en el formato establecido para ello, a través de la plataforma *Open Journal System*. El Equipo Editorial revisa y valora las evaluaciones, si es necesario se asesora de personas idóneas y como resultado, **acepta la publicación del manuscrito, lo devuelve a los autores para correcciones, o lo rechaza de forma definitiva.**

En los casos en que se solicitan correcciones, los autores deben enviar la nueva versión a través de la misma plataforma en un plazo máximo de catorce días calendario a partir de la fecha de notificación. En la corrección de pruebas de impresión final, sólo se permite cambios de forma relativos a redacción o estilo.

El manuscrito se publica en línea y de forma impresa, de la cual se envía tres ejemplares al autor principal.

COSTOS DE PUBLICACIÓN

El valor a pagar por manuscrito, exceptuando las cartas al editor y los comentarios editoriales, es de trescientos cincuenta mil pesos colombianos (\$350.000 COP), para transacciones nacionales, o doscientos dólares (\$200 USD), para transacciones internacionales. Este valor se paga cuando se notifica la aceptación para la publicación de la versión definitiva del manuscrito. La impresión de gráficos, figuras o fotografías en color es opcional y tiene un costo adicional por página necesaria de cien mil pesos colombianos (\$100.000 COP) para transacciones nacionales o sesenta y cinco dólares (\$65 USD) para transacciones internacionales.

LICENCIAMIENTO DEL MANUSCRITO

Los manuscritos publicados en la Revista VITAE quedan disponibles gratuitamente para la consulta pública, tanto en el sitio web como en los diferentes sistemas de indexación y bases de datos a los que está suscrita la Revista, bajo la Licencia Creative Commons, en el modo Attribution-Noncommercial-No Derivative Works aprobada en Colombia y por tanto son de acceso abierto (*Open Access*). Por tanto, los autores ceden, sin derecho a retribuciones económicas, a la Universidad de Antioquia, Revista VITAE, los Derechos sobre la publicación y reproducción en diferentes medios de difusión por el tiempo que establezca la normatividad vigente, mediante el documento de Licencia de Acceso Abierto a la Publicación propuesto para tal fin.

ESTRUCTURA DE LOS MANUSCRITOS

PRIMERA PÁGINA

La primera página de todos los manuscritos debe contener:

Título e información de los autores

Título en español e inglés (máximo 20 palabras); información de los autores: a) Nombres de los autores, tal como cada uno es citado en las diferentes publicaciones o, en su defecto, como prefiere que sea citado. b) título académico más alto. c) Afiliaciones institucionales: *debe contener el nombre de la institución, incluyendo ciudad y país, además, puede contener el cargo de cada autor.* El autor principal debe indicar el correo electrónico al cual se debe dirigir la correspondencia en un pie de página, con un asterisco, exclusivo para esto, con la frase "Autor a quien se debe dirigir la correspondencia:".

Resumen

En los artículos y las revisiones se debe incluir un resumen estructurado de un sólo párrafo en español e inglés y una extensión de mínimo 300 y máximo 350 palabras, con secciones diferenciadas y etiquetadas con los subtítulos ANTECEDENTES, OBJETIVOS, MÉTODOS, RESULTADOS y CONCLUSIONES, en mayúsculas y negrilla. El resumen debe tener, y debe estar redactado en tiempo pretérito indicativo, excepto las conclusiones, con los siguientes criterios:

- **ANTECEDENTES:** se debe presentar el contexto, la justificación del estudio.
- **OBJETIVOS:** se debe presentar lo que se pretende con el trabajo.
- **MÉTODOS:** se debe presentar los aspectos más importantes del diseño del estudio o experimento, el muestreo, la obtención y forma de medición de los datos y análisis y procesamiento estadístico. Para las revisiones, debe presentar la forma de selección e inclusión de las referencias bibliográficas. Los Métodos deben permitir el cumplimiento de los objetivos y ser coherentes con los resultados presentados.
- **RESULTADOS:** se debe presentar los hallazgos más significativos, con sus respectivas pruebas estadísticas; los resultados deben responder a los objetivos y mantener correspondencia y coherencia entre ellos y con el cuerpo del manuscrito.
- **CONCLUSIONES:** se debe presentar al menos una conclusión. Las conclusiones deben estar soportadas en los resultados y ser coherentes con los objetivos.

Palabras clave

Se debe incluir entre tres y cinco palabras clave, tanto en español como en inglés; al menos dos de ellas deben estar incluidas en los Descriptores de Ciencias de la Salud (DeCS) en la dirección web: <http://decs.bvs.br/>, o corresponder a términos MeSH

ARTÍCULOS RESULTADO DE INVESTIGACIÓN

Los artículos completos presentan de manera detallada los resultados originales de proyectos de investigación terminados, que no hayan sido publicados previamente. Cuando se trate de estandarización y/o validación de métodos analíticos, se deben seguir normas oficiales de los distintos sectores o directrices de normas internacionales:

Introducción: se debe exponer el contexto o trasfondo del estudio, o sea la naturaleza del problema y su importancia, haciendo referencia a los trabajos más relevantes publicados anteriormente. En este apartado se especifica los fines y los objetivos del artículo o la hipótesis probada por el estudio u observación. Tanto el objetivo principal (general) como los objetivos secundarios (específicos) deben ser claros y, en caso de ser necesario, se debe describir cualquier subgrupo de análisis especificado previamente. Se debe proporcionar solamente referencias directas pertinentes, y no se debe incluir datos o conclusiones obtenidas en el trabajo que se está reportando.

Materiales y métodos: se debe incluir la información y los procedimientos necesarios para la reproducibilidad de los experimentos o del proceso utilizado, indicando los métodos establecidos en la literatura y las modificaciones sustanciales de los mismos. Debe incluir los aspectos relativos al diseño del estudio o experimento, el muestreo (o la selección y descripción de participantes en el caso de estudios clínicos), los criterios de inclusión y exclusión, la obtención y forma de medición de los datos y su análisis y procesamiento estadístico.

Resultados: se debe presentar los hallazgos más significativos en una secuencia lógica, utilizando tablas y gráficos para sintetizar la información, evitando su interpretación. Cuando se presente datos resumidos en esta sección, no se debe restringir a los resultados finales derivados (tales como porcentajes) y, por tanto, se debe incluir los valores numéricos utilizados para los cálculos, y especificar los métodos estadísticos utilizados en el análisis.

Discusión: se debe destacar los aspectos más novedosos o los aportes más significativos, contextualizándolos en el conjunto de evidencias disponibles, comparando los resultados obtenidos con otros reportados en estudios similares, estableciendo similitudes y/o diferencias. Además, se debe sustentar las posibles explicaciones para ello, destacando las fortalezas o novedad de los resultados, justificación de la contribución y los aportes a la investigación en el tema. Debe terminar con un apartado donde se expone las limitaciones principales de la investigación.

Conclusiones: se debe reportar las aseveraciones del desarrollo de la investigación asociados a los objetivos del trabajo, omitiendo aquellas enunciados no son soportadas por los resultados. Se debe evitar conclusiones de materia económica, excepto cuando el artículo incluya dichos análisis. Se puede incluir nuevas hipótesis soportadas de los resultados, pero calificándolas claramente como tales.

Agradecimientos: en caso de ser pertinente, se debe mencionar personas o instituciones que, sin cumplir los requisitos de autoría, hayan contribuido con la realización de la investigación, bien sea por el aporte económico, material o técnico.

ARTÍCULOS CORTOS

Los artículos cortos presentan los resultados originales preliminares o parciales de una investigación científica o tecnológica, que requieren de una difusión rápida, sobre trabajos relacionados con las ciencias farmacéuticas, alimentarias y afines, cuyo interés justifique que se tenga información sobre el tema. Tienen una extensión máxima de 15 páginas, conservando la estructura de los artículos resultados de investigación.

REVISIONES ESTRUCTURADAS

Son documentos donde se analiza, sistematiza e integra resultados de investigaciones sobre un campo en ciencia o tecnología, con el fin de dar cuenta de los avances y tendencias de desarrollo. Son realizados por invitados seleccionados por el Comité Editorial o eventualmente por iniciativa de los autores. Las revisiones presentan una descripción general del campo de interés y/o sistematización de la información, con una evaluación crítica y soportada referida a un periodo no inferior a cinco años. Deben tener un mínimo de 50 referencias bibliográficas.

La referencia más reciente no debe tener más de un año de haber sido publicada al momento de su presentación a consideración de la Revista.

COMENTARIOS EDITORIALES

Este tipo de manuscrito es escrito por autores invitados expresamente por el Editor de la Revista; en éste se publica comentarios de investigadores reconocidos relacionados con Artículos Resultado de Investigación, seleccionados por su relevancia o interés para las ciencias farmacéuticas, alimentarias y afines, los cuales son publicados en el mismo número de la Revista en que es publicado el artículo. Para su elaboración se debe tener en cuenta lo siguiente:

- Autores (máximo 3).
- Texto (máximo 1200 palabras, excluyendo tablas y/o figuras, y referencias). Debe centrarse en el estado del arte del tema del artículo comentado, destacando sus aportes más notorios y contribuciones al estado del arte, aplicaciones o utilidad práctica de los resultados, al igual que nuevas preguntas o cuestiones por resolver.
- Tablas y/o figuras (máximo 3).
- Referencias bibliográficas (máximo 10, una de ellas debe referirse al artículo comentado).

CARTAS AL EDITOR

En este tipo de manuscrito se publica comentarios de artículos publicados recientemente en la Revista, su publicación es prioritaria y con la mayor rapidez posible. En caso de ser aceptada, la carta será enviada a los autores del artículo referido para que, en caso de que lo deseen, contesten los aspectos mencionados en el texto; tanto la carta como su réplica es publicado en el mismo número de la Revista. Para su elaboración se debe tener en cuenta lo siguiente:

- Autores (máximo 3).
- Texto (máximo 600 palabras, excluyendo tablas y/o figuras, y referencias). Se debe referir a cuestiones relacionadas con los objetivos, métodos, resultados y conclusiones principales.
- Tablas y/o figuras (máximo 2).
- Referencias bibliográficas (máximo 7, una de ellas debe referirse al artículo comentado).

NORMAS DE ESTILO DE LOS MANUSCRITOS

Tablas y figuras: Cada manuscrito puede ser complementado con tablas y/o figuras (máximo 10), previamente referidas en el texto (Ej: En la tabla 1, etc.), con un consecutivo diferente para cada categoría, en números arábigos, en las cuales se especifica información que no debe ser duplicada en el texto, y deben ser ubicadas inmediatamente después del párrafo en que son citadas por primera vez. Para su elaboración se debe tener en cuenta lo siguiente:

- En las tablas se incluye cuadros, con resultados o no, utilizados para sintetizar u organizar la información, trazadas con bordes completos.
- Las figuras incluyen gráficos, ilustraciones, fotografías, dibujos, mapas y estructuras, limitándose en número y procurando yuxtaponer aquellas que, sin perjuicio de la claridad, pueden referirse al mismo sistema de coordenadas.
- El uso de colores en las gráficas está condicionado a los costos adicionales de publicación que se generen en el proceso editorial.
- Se debe indicar la fuente de donde han sido tomadas aquellas tablas y figuras que no son creación del autor, utilizando referencias bibliográficas de manera similar al texto.
- El título de las figuras se digita como un párrafo fuera de la misma, en la parte inferior, y el de las tablas en la parte superior. El título debe ser breve y describir claramente su contenido.
- En ningún caso se debe incluir las figuras en formato tabla, ni pueden ser imágenes.

Símbolos y unidades: el autor debe utilizar las normas del Sistema Internacional de Magnitudes (ISO/IEC 80000), en lo referente a unidades, símbolos y abreviaturas.

Nombres comerciales: se evitará el empleo de nombres comerciales; en su lugar se utilizarán los nombres genéricos; pero si es imprescindible para la claridad del manuscrito, se indicará con el símbolo ®.

Nombres de equipos, instrumentos y reactivos: debe indicarse los valores precisos para la replicación del experimento, describiendo detalles específicos que faciliten su identificación; para reactivos y medios de cultivo se debe indicar la marca y el país de procedencia entre paréntesis.

Nombres científicos: los nombres científicos deben ser indicados en cursiva, con mayúscula inicial, complementándose opcionalmente con la "autoridad". Se debe indicar las cepas y las variaciones de la especie, si es relevante para el trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Se debe indicar las referencias bibliográficas en el texto mediante un número arábigo entre paréntesis según el orden de aparición. Las referencias bibliográficas completas deben ser incluidas al final del manuscrito, bajo el título de Referencias Bibliográficas, de acuerdo con las normas del ICMJE (Vancouver), las cuales pueden ser consultadas en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=citmed>.

Los modelos para algunas referencias son incluidos a continuación:

Artículos científicos: Autores. Título del artículo. Abreviatura ISI del nombre de la Revista. Fecha; Volumen (Número): Páginas.

Restrepo A, Cortés M, Márquez CJ. Uchuvas (*Physalis peruviana* L.) mínimamente procesadas fortificadas con vitamina E. *Vitae*. 2009 May-Aug; 16 (2): 19-30.

Keyzers R, Daoust J, Davies-Coleman M, Van R, Balgi A, Donohue E, *et al.* Autophagy-modulating aminosteroids isolated from the sponge *Cliona celata*. *Org Lett*. 2008 Jul 17; 10 (14): 2959-2962.

Libros y monografías impresas: Autores. Título. Edición. Lugar de Publicación: Editor; Año. Páginas.

Gibaldi M, Perrier D. *Farmacocinética*. Barcelona, España: Reverte; 2008. 352 p.

Tesis y trabajos de grado: Autores. Título. [Tipo de documento]. [Lugar de Publicación]: Editor. Fecha. Páginas.

Monsalve AF, Morales SP. Aumento de capacidad del recurso restricción en la empresa Laproff S.A. [Trabajo de pregrado]. [Medellín, Colombia]: Universidad de Antioquia; 2009. 39 p.

Material electrónico: Autores. Título. [Tipo de Medio]. Lugar de Publicación: Editor: Fecha.

ASME. Aseptic Fill & Finish for Biopharmaceuticals. [CD-ROM]. San Diego (CA): ASME; 2007.

Sitio de Internet: Autores. Título. [Tipo de medio]. Lugar de Publicación: Editor. Fecha de Publicación. [Fecha de Citación]. Disponible en: dirección URL.

Habib MAB, Parvin M, Huntington TC, Hasan MR. A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. [Internet]. Roma, Italia: FAO. 2008 [Actualizado 8 de Enero de 2008; citado 18 de Agosto de 2009]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0424e/i0424e00.pdf>

