

ZAMORANO
Carrera de Agroindustria

**Evaluación de las propiedades
antimicrobianas de PronTech® (alquil dimetil
bencil amonio clorado) y ácido láctico en
canales y carne fresca de res y cerdo**

Proyecto especial presentado como requisito parcial
para optar al título de Ingeniera Agroindustrial en el Grado
Académico de Ingeniería.

Presentado por:

Alba Yesenia Ruiz Menjivar

Honduras
Diciembre, 2005

La autora concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Alba Yesenia Ruiz Menjivar

Honduras
Diciembre, 2005

**Evaluación de las propiedades antimicrobianas de PronTech®
(alquil dimetil bencil amonio clorado) y ácido láctico en canales
y carne fresca de res y cerdo**

Presentado por:

Alba Yesenia Ruiz Menjivar

Aprobada:

Adela Acosta Marchetti, D.C.T.A.
Asesor Principal

Raúl Espinal, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria

Wilfredo Domínguez, M. Sc.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A
Rector

DEDICATORIA

A Dios, la luz que guía mi camino.

A mi madre Alba América de Ruiz por todo su apoyo y ayuda incondicional.

A mi padre Jorge Ruiz y mis hermanos: Erika, Jorge, Ricardo, Javier y David.

A mis amigas y amigos zamoranos.

A mis maestros.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme el regalo de la vida, por poner en mi camino grandes oportunidades y por brindarme todo lo necesario para ser feliz.

A mi madre, por todo su amor, su confianza, consejos y apoyo durante estos 22 años y por hacer posible todo lo que soy.

A mi padre por su ayuda y consejos que me han ayudado a lo largo de mi vida.

A mis hermanos, por todo lo que son y significan para mí y los lazos de amor que compartimos. En especial, a mi hermana Erika por sus consejos y ayuda incondicional en todo momento.

A mis amigos y amigas zamoranos: Juan Antonio, Dulce, Diana, Luís, Indira, Rosita y Oriana por estar siempre conmigo en los buenos y malos momentos y hacer que estos cuatro años se vuelvan inolvidables.

A mis asesores la Dra. Adela Acosta e el Ing. Wilfredo Domínguez, por su tiempo invertido y su gran ayuda en la realización de este proyecto.

Al Dr. Javier Bueso por sus enseñanzas y la inmensa confianza depositada en mí.

A mí amada Alma Mater por los conocimientos adquiridos, las lecciones aprendidas y las inolvidables experiencias vividas.

Al personal de la Planta de Cárnicos, por su colaboración y paciencia.

A todas las personas que conocí estando en Zamorano, y que hicieron posible la culminación de esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

Agradezco a mi madre por su esfuerzo y apoyo financiero para lograr culminar todos mis estudios y permitirme llegar hasta acá.

Agradezco al Instituto Salvadoreño de Formación Profesional (INSAFORP) y al Programa de becas FANTEL, integrado por FEDISAL y LASPAU, por el financiamiento otorgado para mis estudios en el Programa de Ingeniería Agroindustrial en Zamorano.

RESUMEN

Ruiz, Alba. 2005. Evaluación de las propiedades antimicrobianas de PronTech® (alquil dimetil bencil amonio clorado) y ácido láctico en canales y carne fresca de res y cerdo. Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria, Escuela Agrícola Panamericana “El Zamorano”, Honduras. 57 p.

Los productos cárnicos son altamente susceptibles al deterioro microbiano debido a la abundancia de nutrientes y contenido de agua. La carne se contamina durante el sacrificio y los microorganismos se mezclan en la carne cuando ésta se procesa. Debido a esta razón la industria ha optado por el uso de agentes antimicrobianos que son sustancias químicas parcial o totalmente sintetizadas capaces de inhibir el crecimiento y/o destruir microorganismos. El objetivo del estudio fue evaluar las propiedades antimicrobianas de una solución de PronTech® a 200 ppm y de ácido láctico al 1.8% en canales y carne fresca de res y cerdo. La carne fresca de res y cerdo inoculada con *E. coli* O157:H7 y *E. coli* respectivamente fue analizada en el Laboratorio de Investigación de Carne de la Universidad de Florida. Las canales de res y cerdo se analizaron en la Empresa Universitaria de Industrias Cárnicas de Zamorano. Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA), donde cada repetición constituyó un bloque. Cada uno de los antimicrobianos y controles representó un tratamiento. Se realizó un análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo, un análisis de varianza (ANDEVA), una prueba t y una separación de medias (Tukey) fijando un nivel de significancia de $P < 0.05$. El cambio de la carga microbiana en carne fresca y canales de res y cerdo fue la variable evaluada. El tratamiento con ácido láctico superó significativamente al resto de los tratamientos al presentar una reducción logarítmica de 1.39 UFC/ml en carne fresca de res y 0.67 UFC/ml en carne fresca de cerdo; y en las en canales de res y cerdo se observó una reducción logarítmica de 0.98 y 0.82 UFC/cm² respectivamente.

Palabras clave: Bactericidas, coliformes, *Escherichia coli* O157:H7

Adela Acosta Marchetti, D.C.T.A.
Asesor Principal

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de Firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimientos a Patrocinadores.....	vi
Resumen.....	vii
Contenido.....	viii
Índice de Cuadros.....	xi
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Anexos.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 GENERALIDADES.....	3
2.2 MICROORGANISMOS PATÓGENOS RELACIONADOS CON LA INDUSTRIA CÁRNICA.....	4
2.2.1 Coliformes.....	5
2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	5
2.2.2.1 <i>E. coli</i> O157:H7.....	5
2.2.3 Mesófilos aerobios totales.....	6
2.3 ANTIMICROBIANOS.....	7
2.3.1 Ácido láctico.....	7
2.3.2 PronTech®.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1 PARTE I: ESTUDIO REALIZADO EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD DE FLORIDA.....	10
3.2 PARTE II: ESTUDIO REALIZADO EN LA EMPRESA UNIVERSITARIA DE INDUSTRIAS CÁRNICAS, ZAMORANO.....	10
3.3 UBICACIÓN.....	11
3.4 MATERIALES Y EQUIPOS.....	11
3.4.1 Materia prima.....	11

3.4.2	Materiales para el estudio en carne fresca de res.....	11
3.4.3	Materiales para el estudio en carne fresca de cerdo.....	12
3.4.4	Materiales para el estudio en canales de res y cerdo.....	12
3.4.5	Equipos.....	12
3.5	METODOLOGÍA	13
3.5.1	Diseño experimental.....	13
3.5.1.1	Evaluación de carne fresca de res y cerdo.....	13
3.5.1.2	Evaluación de canales de res y cerdo.....	14
3.5.2	Parte I: Estudio realizado en el Laboratorio de la Universidad de Florida...	14
3.5.2.1	Evaluación de carne fresca de res y cerdo.....	14
3.5.2.2	Crecimiento de cultivo puro de <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>E. coli</i>	14
3.5.2.3	Preparación del inóculo de <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>E. coli</i>	14
3.5.2.4	Preparación de solución de PronTech® (alquil dimetil bencil amonio clorado).....	17
3.5.2.5	Preparación de solución de ácido láctico.....	17
3.5.2.6	Preparación de agar selectivo MacConkey con sorbitol y telurito-cefixima.....	17
3.5.2.7	Preparación, empaçado y almacenado de tratamientos.....	17
3.5.2.8	Procedimiento para la preparación de platos y siembra de tratamientos.....	17
3.5.2.9	Lectura de siembras de <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>E. coli</i> genérica.....	18
3.5.2.10	Confirmación de <i>E. coli</i> O157:H7 en carne fresca de res.....	18
3.5.3	Parte II: Estudio realizado en la Planta de Industrias Cárnicas Zamorano...	19
3.5.3.1	Evaluación de canales de res y cerdo.....	19
3.5.3.2	Preparación de solución de PronTech® (alquil dimetil bencil amonio clorado).....	19
3.5.3.3	Preparación de solución de ácido láctico.....	19
3.5.3.4	Preparación de agar para recuentos en placa.....	19
3.5.3.5	Preparación de agar violeta rojo bilis.....	19
3.5.3.6	Realización de tratamientos.....	20
3.5.3.7	Técnica de hisopado.....	20
3.5.3.8	Procedimiento para la preparación de platos y siembra de muestras.....	20
3.5.3.9	Lectura de siembras de coliformes y aerobios totales.....	20
3.5.4	Análisis estadístico.....	22
3.5.4.1	Evaluación de carne fresca de res y cerdo.....	22
3.5.4.2	Evaluación de canales de res y cerdo.....	22
3.5.4.3	Evaluación de POES y POE para la Empresa Universitaria de Industrias Cárnicas de Zamorano.....	22
3.5.5	Análisis costos variables.....	22
3.5.6	Elaboración de Procedimiento Operacional Estándar de Sanidad (POES)..	22
3.5.7	Elaboración de Procedimiento Operacional Estandarizado (POE).....	23
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1	PARTE I. ESTUDIO REALIZADO EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD DE FLORIDA.....	24
4.1.1	Evaluación en carne fresca de res.....	24
4.1.1.1	<i>E. coli</i> O157:H7.....	24

4.1.1.2	Mesófilos aerobios totales.....	26
4.1.2	Evaluación de carne fresca de cerdo.....	27
4.1.2.1	<i>E. coli</i> genérica.....	27
4.1.2.2	Mesófilos aerobios totales.....	28
4.2	PARTE II: ESTUDIO REALIZADO EN LA EMPRESA UNIVERSITARIA DE INDUSTRIAS CÁRNICAS, ZAMORANO.....	30
4.2.1	Evaluación de canales de res.....	30
4.2.2	Evaluación de canales de cerdo.....	31
4.3	ANÁLISIS DE COSTOS VARIABLES.....	32
4.4	Evaluación del Procedimiento Operacional Estándar de Sanidad (POES) y Procedimiento Operacional Estándar (POE).....	32
5.	CONCLUSIONES.....	33
6.	RECOMENDACIONES.....	34
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1. Diseño de bloques completos al azar para carne fresca de res.....	13
2. Diseño de bloques completos al azar para carne fresca de cerdo.....	13
3. Diseño de bloques completos al azar para canales de res y cerdo.....	14
4. Carga de <i>E. coli</i> O157:H7 (Log ₁₀ UFC/ml) en carne fresca de res inoculada con <i>E. coli</i> O157:H7.....	25
5. Cambio en la carga de <i>E. coli</i> O157:H7 (Log ₁₀ UFC/ml) en carne fresca de res inoculada con <i>E. coli</i> O157:H7.....	25
6. Carga de mesófilos aerobios totales (Log ₁₀ UFC/ml) en carne fresca de res inoculada con <i>E. coli</i> O157:H7.....	26
7. Cambio en la carga de mesófilos aerobios totales (Log ₁₀ UFC/ml) en carne fresca de res inoculada con <i>E. coli</i> O157:H7.....	27
8. Carga de <i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/ml) en carne fresca de cerdo inoculada con <i>E. coli</i>	27
9. Cambio en la carga de <i>E. coli</i> (Log ₁₀ UFC/ml) en carne fresca de cerdo inoculada con <i>E. coli</i>	28
10. Carga de mesófilos aerobios totales (Log ₁₀ UFC/ml) en carne fresca de cerdo inoculada con <i>E. coli</i>	29
11. Cambio en la carga de mesófilos aerobios totales (Log ₁₀ UFC/ml) en carne fresca de cerdo inoculada con <i>E. coli</i>	29
12. Cambio en la carga de mesófilos aerobios totales (Log ₁₀ UFC/cm ²) en canales de res.....	30

13. Cambio en la carga de coliformes (Log_{10} UFC/cm ²) en canales de res.....	30
14. Cambio en la carga de mesófilos aerobios totales (Log_{10} UFC/cm ²) en canales de cerdo.....	31
15. Cambio en la carga de coliformes (Log_{10} UFC/cm ²) en canales de cerdo.....	32
16. Análisis de costos variables.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1. Fórmula química del ácido láctico.....	7
2. Mecanismo de acción del ácido láctico.....	8
3. Formula química de PronTech® (alquil dimetil bencil amonio clorado).....	9
4. Flujograma del análisis de carga microbiana (<i>E. coli</i> O157:H7) en carne fresca de res.....	15
5. Flujograma del análisis de carga microbiana (<i>E. coli</i>) en carne fresca de cerdo.....	16
6. Preparación de diluciones de las muestras.....	18
7. Flujograma del análisis de carga microbiana (Aerobios totales/coliformes) en canales de res y cerdo.....	21

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1. Marco de muestreo.....	38
2. Zonas de muestro para aerobios totales y coliformes en canales de res.....	39
3. Zonas de muestro para aerobios totales y coliformes en canales de cerdo.....	40
4. Procedimiento Operacional Estándar de Sanidad (POES).....	41
5. Tabla de diluciones de ácido láctico al 98%.....	42
6. Procedimientos Operacionales Estandarizados (POE).....	43

1. INTRODUCCIÓN

Los productos cárnicos son altamente susceptibles al deterioro por microorganismos, esto ocurre por la abundancia de nutrientes y el contenido de agua que sirven de alimento a las bacterias. Las operaciones de sacrificio remueven la mayoría de las bacterias presentes sobre las superficies y el tracto gastrointestinal de los animales, las que logran permanecer son los que se derivan del animal y en un menor grado del suelo y agua.

En la carne fresca los tejidos internos no presentan contaminación microbiana, por lo que gran parte de la contaminación de la carne proviene de las partes externas del mismo animal y del medio ambiente en el que se encuentra durante el sacrificio. Reducir la contaminación inicial y retrasar o inhibir el crecimiento de los microorganismos responsables de la alteración del producto son los principales factores implicados en la mejora de los elaborados de carne fresca. El hecho de obtener una vida útil más larga permite desarrollar nuevos productos de carne fresca, así como comercializarlos en un área geográfica más amplia.

La higiene de las instalaciones es esencial para poder producir carne cuyo consumo sea seguro para la población. Para conseguir esto es necesaria la limpieza y desinfección de todas las áreas con el fin de eliminar la suciedad que pueda hospedar o propiciar el crecimiento microbiano y destruir los organismos que permanecen o al menos reducir su número hasta niveles seguros. Para lograr reducir la carga microbiana presente en los derivados cárnicos, la industria ha optado por el uso de agentes antimicrobianos que son sustancias químicas sintetizadas parcial o totalmente en laboratorio capaces de inhibir el crecimiento y/o destruir microorganismos.

La evaluación de las propiedades antimicrobianas del ácido láctico y PronTech® (alquil dimetil bencil amonio clorado), para la reducción de la carga microbiana presente en carne fresca y canales de res y cerdo es el principal objetivo del presente estudio. Para lograrlo se analizaron los antimicrobianos, seleccionando aquél que permitiese obtener una reducción significativa en la carga bacteriana inicial, logrando de esta forma mantener la calidad e inocuidad en la materia prima desde el inicio de la cadena de producción.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar las propiedades antimicrobianas de una solución de PronTech® (alquil dimetil bencil amonio clorado) a 200 ppm y de ácido láctico al 1.8% en canales y carne fresca de res y cerdo.

Objetivos Específicos:

- Determinar la reducción de la carga microbiana de *E. coli* O157:H7 y mesófilos aerobios totales en carne fresca de res inoculada con *E. coli* O157:H7 cuando ha sido tratada con una solución de PronTech® a 200 ppm y de ácido láctico a 1.8%.
- Determinar la reducción de la carga microbiana de *E. coli* y mesófilos aerobios totales en carne fresca de cerdo inoculada con *E. coli* cuando ha sido tratada con una solución de PronTech® a 200 ppm y de ácido láctico a 1.8%.
- Determinar la reducción de la carga microbiana de coliformes y aerobios totales en canales de res y cerdo tratadas con una solución de PronTech® a 200 ppm y de ácido láctico a 1.8%.
- Establecer y verificar el Procedimiento Operacional Estandarizado de Sanitización (POES) y el Procedimiento Operacional Estandarizado (POE) para el lavado de las canales de res y cerdo.
- Determinar el costo de aplicación de los antimicrobianos en las canales de res y cerdo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES

La carne y sus productos derivados son protagonistas de brotes de toxiinfección alimentaria a nivel mundial. Su periódica aparición pone de manifiesto la importancia de la aplicación de medidas de control higiénico y de la incorporación de barreras de seguridad en los elaborados cárnicos (Prandl *et al.*, 1994). Por su composición la carne es considerada como un medio ideal para el crecimiento de muchos microorganismos por lo que es clasificada entre los alimentos altamente perecederos (Girard *et al.*, 1991).

Debido a la gran variedad de fuentes de contaminación, los tipos de microorganismos que suelen encontrarse en la carne son muchos. Mohos de diferentes géneros, llegan a la superficie de la carne y se desarrollan sobre ella. Son especialmente interesantes las especies de los géneros *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Geotrichum*, *Thamnidium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Monilia*. A menudo se encuentran levaduras, especialmente no esporuladas. Entre las muchas bacterias que pueden hallarse se encuentran las de género *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Sarcina*, *Leuconostoc*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Salmonellas* y *Streptomyces*. Muchas de estas bacterias crecen a temperatura de refrigeración, por lo que su control y eliminación se vuelve crucial para prolongar la vida de anaquel de los productos cárnicos (Brock, 1997).

Según Brock (1997), los microorganismos patógenos por lo general disminuyen el valor proteico de la carne, deteriorándola totalmente y causando olores desagradables. El ataque de estos microorganismos se ve favorecido por tres factores: actividad de agua >0.75 , altas temperaturas ambientales y pH cercano a 7.

La preservación de la carne, así como de casi todos los alimentos perecederos, se lleva a cabo por una combinación de métodos. El hecho de que la mayoría de las carnes constituyan excelentes medios de cultivos con pH casi neutro y abundancia de humedad y nutrientes, unido a la circunstancia de que pueden encontrarse algunos organismos en los ganglios linfáticos, huesos y músculos hace que su conservación sea más difícil que la de la mayoría de los alimentos. A su vez, los cuchillos, paños, aire, manos y ropa del personal pueden actuar como intermediarios de contaminación en el procesamiento de los productos cárnicos. Durante la manipulación posterior de la carne puede haber nuevas contaminaciones a partir de las carretillas de transporte, cajas y recipientes, otras carnes contaminadas, condición de cuartos fríos, etc. (Belk, 2001).

Según Bryan (1998), la carne es parte fundamental en la dieta humana, razón por la que requiere de un control sanitario adecuado que elimine la probabilidad de enfermedades que pueda transmitir. Su desinfección es una operación vital, que en algunas ocasiones se relega por conseguir la máxima producción y como consecuencia de ello se pueden dar las condiciones para la contaminación de las canales por microorganismos patógenos.

En la actualidad, la industria cárnica cuenta con nuevas herramientas para luchar contra el crecimiento microbiano en los diferentes escalones de la cadena de producción. La implementación de planes de control como BMP, HACCP, POES permite mejorar la calidad microbiológica de las canales y lograr de esta manera carne de mejor calidad y vida útil más prolongada (Stopforth *et al.*, 2003).

Satisfacer la demanda del consumidor de productos cárnicos frescos, preparados o semielaborados, que puedan cocinarse con un esfuerzo mínimo, en un corto espacio de tiempo y con una vida útil razonable es uno de los mayores retos para la industria cárnica. Los productores necesitan encontrar un equilibrio óptimo entre frescura y sabor por un lado y seguridad y vida útil por otro (Stephen, 2000).

2.2 MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON LA INDUSTRIA CÁRNICA

En la carne fresca las bacterias sólo están presentes en la superficie, los tejidos internos permanecen prácticamente estériles. Cada etapa durante el sacrificio, preparación de la canal, cortado y empaque puede ser una fuente de contaminación bacteriana (Gill, 1991). Debido a esto, se han desarrollado una serie de técnicas para determinar los recuentos bacterianos en las superficies de las canales. Una de las técnicas más efectivas es el hisopado, que permite determinar el crecimiento microbiano en superficies, siendo un indicador para el control de la inocuidad e higiene durante el sacrificio (Jay, 1996).

La presencia de determinados microorganismos en los productos cárnicos se puede aprovechar como indicador sobre algunos aspectos fundamentales relacionados con inocuidad e higiene. Este tipo de microorganismos recibe la denominación común de microorganismos indicadores y su investigación y cuantificación puede aportar información sobre la inocuidad del alimento, su grado de alteración, su nivel de envejecimiento, el control durante de su proceso de elaboración, etc. (Prandl *et al.*, 1994).

El término de microorganismo indicador fue sugerido por Ingram en 1977 para toda bacteria cuya presencia señala la posible existencia en la muestra de un patógeno ecológicamente igual. Frecuentemente se utilizan las bacterias intestinales, aunque otros grupos de microorganismos sirvan igualmente de indicadores en otras circunstancias (Brock, 1997). Según Jay (1996), los microorganismos indicadores más corrientes son: coliformes, *E. coli*, *Streptococcus* fecales y *Enterobacteriaceae*.

Los microorganismos indicadores de seguridad alimentaria ideales deben cumplir con ciertos criterios como: ser fáciles de detectar, ser fácilmente diferenciables de otros

miembros de la flora alimentaria, estar constantemente asociados a los microorganismos patógenos, que sus recuentos estén íntimamente relacionados con los de la bacteria patógena de interés, que posea las mismas necesidades de crecimiento y las mismas tasas de multiplicación que las del patógeno, que muera a una velocidad paralela a la del patógeno e idealmente sobreviva un poco más que él y que no aparezca en alimentos libres de patógenos, salvo quizá en cantidades mínimas (Jay, 1996).

2.2.1 Coliformes

Son bacterias de la familia de las Enterobacteriaceae, anaerobios facultativos, Gram-negativo, bacilos, no forman esporas y fermentan la lactosa produciendo gas en 48 horas a 35°C; se encuentran comúnmente en el tracto intestinal humano, agua, tierra y material de plantas (Teuben y Barrientos, 2002). Este grupo comprende especies de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* (Mead *et al.*, 1999).

Bryan (1998) determinó que el nivel de coliformes totales es el criterio oficial en la calidad del agua y son un indicador confiable de condiciones sanitarias en los alimentos, incluyendo los pertenecientes a la industria de carnes. La Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG) de Honduras establece en el reglamento de inspecciones de carnes y productos cárnicos, acuerdo No. 078-00, los criterios microbiológicos para carne fresca y canales de res y cerdo, los cuales no deberán exceder de 500 UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro) y 100 UFC/cm² (unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado) respectivamente (SAG, 2000).

2.2.2 *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, se encuentra generalmente en los intestinos animales, incluido el humano (Brock, 1997).

2.2.2.1 *E. coli* O157:H7: *Escherichia coli* O157:H7 es una de cientos de cepas de la *E. coli*. Aunque la mayoría de las cepas son inocuas y viven en los intestinos de los seres humanos y animales saludables, esta cepa produce una potente toxina y puede ocasionar enfermedad grave (Stopforth *et al.*, 2003). Fue reconocida inicialmente como causa de enfermedad en 1982 durante un brote de diarrea aguda con sangre, en el que se determinó que se debía a hamburguesas contaminadas con la bacteria. Desde esta fecha la mayoría de las infecciones se han ligado al consumo de carne de vacuno molida insuficientemente cocinada (Mead *et al.*, 1999).

Según Stopforth *et al.* (2003), la carne se contamina durante el sacrificio, y la bacteria puede mezclarse totalmente en la carne cuando se pica, razón por la cual se considera uno de los patógenos más asociados con los productos cárnicos.

Las características clave para la diferenciación de *E. coli* O157:H7 se basa en que contrariamente a lo que ocurre con la mayor parte de las cepas de *E. coli* no patógenas, las de O157:H7 no fermentan el sorbitol, no tienen β -glucuronidasa, ni crecen a más de 42°C. La combinación de letras y números en el nombre de la bacteria se refiere a los antígenos específicos que se encuentran en su superficie y la distingue de otros tipos de *E. coli* (Stopforth *et al.*, 2003).

Según Miller (1998), *E. coli* es ahora conocida como el agente etiológico causal de diarrea y enfermedades gastrointestinales en países de desarrollo y en otras áreas con pobres condiciones sanitarias. Los síntomas varían significativamente y dependen del tipo de *E. coli*. Cuatro tipos han sido identificados:

1. *E. coli* enteropatogénicas (EPEC) causan un repentino ataque con severos calambres abdominales, postración de la persona y diarrea sanguinolenta.
2. *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC) produce toxinas que causan de una leve a severa diarrea con profunda deshidratación y conmoción sin fiebre. Ciertas toxinas termo-lábiles y termo-estables pueden ser encontradas en este tipo.
3. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) penetra el epitelio y causa fiebre, escalofrío, dolor de cabeza, dolores musculares, calambres abdominales y una diarrea pálida y profusa.
4. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) más conocido como *E. coli* O157:H7, causa cambios en el colon, similares a los de colitis.

Se desconoce la dosis infectiva de *E. coli* O157:H7. Sin embargo, el estudio de los datos recopilados de los brotes muestra que podría ser de sólo 10 bacterias por mililitro. Estos datos indican que se necesita un número muy bajo de microorganismos para originar la enfermedad en niños pequeños, ancianos y en las personas inmuno comprometidas (FDA, 1999a).

2.2.3 Mesófilos Aerobios Totales

Son microorganismos que se desarrollan solamente en presencia de oxígeno libre y a una temperatura entre 15°C y 45°C, siendo su temperatura óptima 37°C (Libby, 1986). Los productos cárnicos frescos y canales no deben presentar un número de colonias aerobias totales superiores a los 500,000 UFC/cm². La alteración de un producto ya sea a través del olor, sabor y/o aspecto se atribuye, en la mayoría de los casos, a poblaciones superiores a 5, 000,000 UFC/cm² (SAG, 2000).

Según Miller (1998), una población elevada de aerobios totales no establece una correlación directa con la presencia de patógenos, pero si nos puede facilitar una idea

aproximada de las condiciones higiénicas durante el sacrificio, además de ofrecer una orientación sobre la evolución del mismo.

2.3 ANTIMICROBIANOS

Los agentes antimicrobianos son sustancias químicas sintetizadas parcial o totalmente en laboratorio capaces de inhibir el crecimiento y/o destruir microorganismos. Los antimicrobianos de uso sistémico reducen y controlan la presencia de microorganismos que han invadido los tejidos, estos deben de cumplir con ciertas características, tales como: ser más bactericidas que bacteriostáticos, mantenerse activos en presencia de plasma y líquidos corporales, efectivos frente a un amplio espectro de microorganismos, no ser tóxicos para el operario, ser hidrosoluble y liposolubles y la concentración activa frente a los microorganismos se debe alcanzar con rapidez y debe mantenerse durante un tiempo prolongado (Stephen, 2000).

2.3.1 Ácido Láctico

El ácido láctico es un monocarboxílico de tres átomos de carbono y un grupo alcohol en el carbono central, $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ (Figura 1). Es un compuesto líquido, incoloro, viscoso, no volátil, soluble en éter, miscible con agua y alcohol e insoluble en cloroformo, éter del petróleo y disulfuro de carbono (Salminen, 1998).

Se da bajo formas ópticamente activas denominadas ácido D – láctico y ácido L – láctico. En su estado natural es una mezcla ópticamente inactiva compuesta por partes iguales de ambas formas D y L, conocida como mezcla racémica (Salminen, 1998).

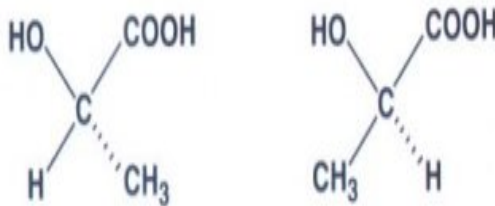


Figura 1. Fórmula química del ácido láctico.

El ácido láctico ejerce sobre los microorganismos dos tipos de efectos distintos, aunque estrechamente relacionados. En primer lugar, existe un efecto antimicrobiano debido a la acidez en sí, esto es, a la disminución del pH extracelular. El segundo tipo, más importante en la práctica, es el efecto antimicrobiano específico debido a la forma asociada (Gorman *et al.*, 1995).

La actividad antimicrobiana del ácido láctico se debe a las moléculas asociadas del compuesto (Figura 2). La forma asociada del ácido atraviesa la membrana, y una vez en el interior de la bacteria, el ácido puede disociarse y entonces afecta directamente al pH intracelular microbiano (Gorman *et al.*, 1995). Esto perturba gravemente a su metabolismo, ya que afecta al gradiente de protones y de carga con el exterior, e interfiere con los sistemas de transporte de aminoácidos y fosfatos. Además, muchas enzimas esenciales para el metabolismo microbiano se inactivan a pHs ácidos (Stephen, 2000). Al producirse la disociación del ácido en el interior de la célula, la concentración interna de aniones aumentará. Esto a su vez, desencadena un mecanismo de compensación de la carga eléctrica que obliga a la bacteria a aumentar los niveles de Na^+ , K^+ y/o glutamato, lo que lleva a un incremento mayor de la fuerza iónica intracelular. Este proceso provoca un gran aumento de la presión mecánica sobre la pared del microorganismo, lo que hace que eventualmente estalle (Salminen, 1998).

El pKa (pKa es igual al pH en el cual el 50 % del ácido se halla asociado) de los ácidos orgánicos, como ácido láctico, acético, cítrico, empleados como conservadores se halla en el rango de pH de 3-5. Al bajar el pH de un alimento, aumenta la proporción de las moléculas asociadas de un determinado ácido orgánico, aumentando de esta forma su efectividad como agente antimicrobiano. Estas consideraciones limitan la utilidad de los ácidos orgánicos a aquellos alimentos de pH inferior a 5.5 (Stephen, 2000).

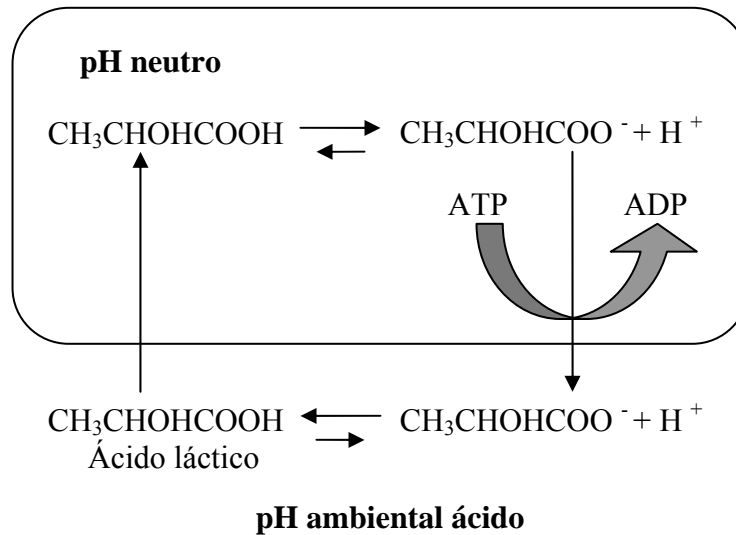


Figura 2. Mecanismo de acción del ácido láctico.

En los Estados Unidos de Norteamérica, el uso de ácido láctico como agente antimicrobiano para lavado de canales está aprobado y regulado por el Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS, por sus siglas en inglés) y por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés), el cual permite una concentración máxima de 2% (21 CFR 101.100 (a) (3)) por clasificarse dentro de la categoría de químicos que entran en contacto directo con los alimentos y no necesitan ser lavados con agua potable luego de su aplicación. Además, las canales que han sido

tratadas con ácido láctico no deben declarar la utilización del mismo como ingrediente dentro de su etiqueta (FDA, 1999b).

2.3.2 PronTech®

Es un compuesto no volátil, incoloro, inodoro y con ligero sabor amargo, reduce la tensión superficial de las soluciones en las que se utiliza, lo cual brinda una elevada penetración y una buena acción bactericida. Es un producto altamente estable tanto en forma sólida como en soluciones, conservando así sus propiedades físico-químicas y su capacidad bactericida (Figura 3). Posee un pH entre 7 – 8 al ser diluido en una concentración de 200 ppm, con buen desempeño en rangos de pH comprendido entre 3 – 11 (UPI, 2004). PronTech® está compuesto por 40% del ingrediente activo, alquil dimetil bencil amonio clorado y 60% de urea como materia inerte (UPI, 2004).

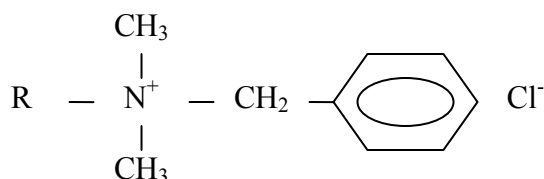


Figura 3. Fórmula química de PronTech (alquil dimetil bencil amonio clorado).

Su modo de acción es a través de grupo aniónico hidrosoluble que se disocia y forma un catión de carga positiva; en el momento en que las bacterias se ponen en contacto con la solución, pierden su carga negativa y adquieren carga positiva, lo que causa la alteración de la semi-permeabilidad de la membrana, con la consecuente pérdida de nitrógeno, fósforo y la desnaturalización de sus proteínas activas. Este bactericida tiene una buena persistencia de acción. Actúa preventiva y curativamente. No es tóxico y tiene doble efecto de acción: químico y físico (UPI, 2004). No se absorbe a través de la piel, no causa sensibilización o irritación de ésta; no emana vapores ni gases tóxicos. Diluciones a 3200 ppm han sido encontradas como no irritantes al entrar en contacto con la piel y con los ojos. Es soluble en agua, estable a alta o bajas temperaturas y en soluciones arriba de 550 ppm de carbonato de calcio (UPI, 2004).

PronTech® no se encuentra en la lista de químicos considerados como carcinogénicos de la Agencia Internacional de Investigaciones de Cáncer (I.A.R.C. por sus siglas en inglés), la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (O.S.H.A. por sus siglas en inglés) y el Programa Nacional de Toxicología (N.T.P por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos. Está clasificado en un rango de muy baja toxicidad (Categoría de toxicidad III). La dosis letal (DL₅₀) en ratas es de 525 mg/Kg. de peso corporal. Se encuentra regulado por el FDA permitiendo el uso máximo de una solución con 200 ppm, por entrar en contacto directo con los alimentos y no necesitan ser lavados con agua potable luego de su aplicación (UPI, 2004).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PARTE I: ESTUDIO REALIZADO EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD DE FLORIDA

Se realizó un estudio en el Laboratorio de Investigación de Carnes de la Universidad de Florida, el cual consistió en la evaluación de las propiedades antimicrobianas de una solución de PronTech® a 200 ppm y ácido láctico al 1.8% en carne fresca de res y cerdo cuando han sido inoculadas con *Escherichia coli* O157:H7 y *E. coli* respectivamente.

Las concentraciones de ambos microbianos fueron determinadas por literatura, utilizando para la solución con PronTech® el máximo permitido por el FDA, 200 ppm, y para la solución con ácido láctico una concentración de 1.8%, ya que es la más utilizada actualmente por la industria cárnica en los Estados Unidos¹.

Las muestras de res y cerdo fueron inoculadas con *E. coli* O157:H7 y *E. coli* respectivamente. Se realizaron dos tipos de análisis microbiológicos: a) recuento de *E. coli* O157:H7 y *E. coli*, con el fin de evaluar la capacidad antimicrobiana de ambos productos con este microorganismo en específico, b) recuento de aerobios totales, los cuales brindan información importante sobre la condición de higiénica y vida útil de la carne. El cambio en la carga microbiana fue evaluado en un periodo de cuatro días, realizando análisis microbiológicos al día cero, dos y cuatro.

3.2 PARTE II: ESTUDIO REALIZADO EN LA EMPRESA UNIVERSITARIA DE INDUSTRIAS CÁRNICAS, ZAMORANO

Se evaluaron las propiedades antimicrobianas de una solución de PronTech® a 200 ppm y ácido láctico al 1.8% en canales de res y cerdo bajo condiciones reales de una planta comercial en la Empresa Universitaria de Industrias Cárnicas de Zamorano.

¹ Sally K. Williams. 2005. Industria cárnica en estados Unidos (entrevista). Florida, Estados Unidos.

Se realizaron dos tipos de análisis microbiológicos, uno para el recuento de coliformes y otro para recuento de aerobios totales con el propósito de analizar el efecto de los antimicrobianos en el crecimiento de microorganismos indicadores y aerobios presentes en las canales, los cuales nos brindan información importante sobre la condición higiénica y vida útil de las mismas.

El cambio en la carga microbiana fue evaluado antes y 24 horas después de la aplicación del tratamiento. Se evaluó durante este período porque en la planta de cárnica después de 24 horas se inicia el proceso de desposte de las canales.

3.3 UBICACIÓN

El laboratorio de investigación de carnes de la Universidad de Florida, Estados Unidos, fue el escenario para la preparación de las unidades experimentales y el análisis microbiológico de la primera etapa del estudio realizado en carne fresca de res y cerdo.

La segunda etapa tuvo lugar en la Planta de Industrias Cárnica y el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Agrícola Panamericana “El Zamorano”, en donde se prepararon las unidades experimentales y se realizaron los análisis microbiológicos, respectivamente en canales de res y cerdo.

3.4 MATERIALES Y EQUIPO

3.4.1 Materia prima

Para la elaboración de los tratamientos se utilizaron cortes industriales provenientes de la falda de la res y panza del cerdo (*Rectus abdominis*, *obliquus externus abdominis*, *obliquus internus abdominis*, *cutaneus trunci*, *transversus abdominis*, *intercostales externus e internus*) proporcionados por el laboratorio de investigación de carnes de la Universidad de Florida y medias canales de res y cerdo proporcionadas por la Empresa Universitaria de Industrias Cárnica de Zamorano.

3.4.2 Materiales para el estudio en carne fresca de res

- Cultivo puro de *Escherichia coli* O157:H7 (ATTC 43504, ATTC, Rockville, MD).
- PronTech®, United Promotions Inc.
- Ácido láctico (PURAC FCC 88, PURAC Inc.).
- Agar MacConkey con Sorbitol y Telurito-Cefixima (catálogo # 74001, Dynal Inc.)

- Caldo de soya-triptona (catálogo #DF 0369-17-6, Fisher Scientific)
- Agua Peptonada (catálogo #DF 1807-17-6, Fisher Scientific)
- Petrifilms, Conteo de aerobios totales (catálogo #6406, 3M)
- Anti-suero para O157 (catálogo #007702-1, Bio-merieux Vitek, Inc.)
- Anti-suero H7 (catálogo #007700-1-1, Bio-merieux Vitek, Inc.)

3.4.3 Materiales para el estudio en carne fresca de cerdo

- Cultivo puro de *Escherichia coli* (ATTC 40851, ATTC, Rockville, MD)
- PronTech®, United Promotions Inc.
- Ácido láctico (PURAC FCC 88, PURAC Inc).
- Caldo de soya-triptona (catálogo #DF 0369-17-6, Fisher Scientific)
- Agua Peptonada (catálogo #DF 1807-17-6, Fisher Scientific)
- Petrifilms, Conteo de aerobios totales (catálogo #6406, 3M)
- Petrifilms, Conteo de E. coli/Coliformes (catálogo #6404, 3M)

3.4.4 Materiales para el estudio en canales de res y cerdo

- Ácido láctico (PURAC FCC 88, PURAC Inc).
- PronTech®, United Promotions Inc.
- Agar para recuentos en placa (catálogo #DF 21778-26, Fisher Scientific)
- Agar Violeta Rojo Bilis (catálogo #DF 0012-17, Fisher Scientific)
- Solución Búfer de Potasio-Fosfato monobásico (catálogo #21988-6, Aldrich Chemical Company Inc)

3.4.5 Equipos

- Balanza electrónica (marca Ohaus, modelo LS2000).
- Bomba de mochila (modelo NS-16).
- Gasa estéril (marca Herd'z)
- Pipetas estériles de 1 ml. (catálogo #13-678-11B, Fisher Scientific)
- Pipetas estériles de 10 ml. (catálogo #13-678-27B, Fisher Scientific)
- Platos Petri (catálogo #08-757-13, Fisher Scientific)
- Asa de inoculación, 3mm (catálogo #13-104-213, Fisher Scientific)
- Bolsas para muestras estériles (catálogo #01-002-44, Fisher Scientific)
- Tubos de ensayo (catálogo #05-529-1C, Fisher Scientific)
- Puntas para pipeta estériles (catálogo #02-681-142, Fisher Scientific)
- Barras magnéticas (catálogo #14-511-62, Fisher Scientific)
- Agitador (catálogo #12812, Fisher Scientific)

- Mechero (catálogo #03-902, Fisher Scientific)
- Plancha con agitador (catálogo #11-496-8, Fisher Scientific)
- Tina de agua (Modelo 260, catálogo #15-474-100, Fisher Scientific)
- Cámara de flujo laminar, Purifier class II (catálogo #36209-04, Fisher Scientific)
- Incubador (modelo 116D serie 100, Fisher Scientific)
- Centrifuga (catálogo # 75-005-184, Fisher Scientific)
- Autoclave (modelo 109-85-E, Market Force Industries Inc)

3.5 METODOLOGÍA

3.5.1 Diseño experimental

3.5.1.1 Evaluación de carne fresca de res y cerdo: Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA), donde cada repetición constituyó un bloque y cada uno de los antimicrobianos y controles un tratamiento. Se evaluaron tres muestras (A, B y C) por tratamiento y repetición, teniendo un total de 24 unidades experimentales (cuadro 1 y 2). La variable evaluada fue cambio de la carga microbiana en el tiempo.

Cuadro 1. Diseño de bloques completos al azar para carne fresca de res.

Tratamiento	Semana 1	Semana 2
Control negativo (carne de res)	ABC	ABC
Control positivo (carne de res + <i>E. coli</i> O157:H7)	ABC	ABC
Carne de res + <i>E. coli</i> O157:H7 + 200 ppm PronTech®	ABC	ABC
Carne de res + <i>E. coli</i> O157:H7 + ácido láctico	ABC	ABC

ABC = tres muestras evaluadas en cada bloque (semana)

Cuadro 2. Diseño de bloques completos al azar para carne fresca de cerdo.

Tratamiento	Semana 1	Semana 2
Control negativo (carne de cerdo)	ABC	ABC
Control positivo (carne de cerdo + <i>E. coli</i>)	ABC	ABC
Carne de cerdo + <i>E. coli</i> + 200 ppm PronTech®	ABC	ABC
Carne de cerdo + <i>E. coli</i> + ácido láctico	ABC	ABC

ABC = tres muestras evaluadas en cada bloque (semana)

3.5.1.2 Evaluación de canales de res y cerdo: Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA), en donde cada repetición representó un bloque y los dos antimicrobianos y el agua constituyeron los tratamientos, siendo el lavado con agua el tratamiento control. Cuatro muestras (A, B, C, y D) fueron evaluadas por tratamiento y repetición, haciendo un total de 36 unidades experimentales (cuadro 3).

Cuadro 3. Diseño de bloques completos al azar para canales de res y cerdo.

Tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Canal res/cerdo + lavado con PronTech®	ABCD	ABCD	ABCD
Canal res/cerdo + Lavado con ácido láctico	ABCD	ABCD	ABCD
Canal res/cerdo + Lavado con agua a presión	ABCD	ABCD	ABCD

ABCD = cuatro muestras evaluadas en cada bloque (semana)

3.5.2 Parte I: Estudio realizado en el Laboratorio de la Universidad de Florida

3.5.2.1 Evaluación de carne fresca de res y cerdo: Cada uno de las muestras se elaboró con una base de 100 gramos. El procedimiento para la elaboración de los tratamientos se resume en la figura 4 y 5, y se detalla a continuación:

3.5.2.2 Crecimiento de cultivo puro de *Escherichia coli* 0157:H7 y *Escherichia coli*: Un cultivo puro de *Escherichia coli* O157:H7 (ATTC 43504, ATTC, Rockville, MD) y *Escherichia coli* genérica (ATTC 40851, ATTC, Rockville, MD) fueron utilizados como inóculo en los tratamientos de carne fresca de res y cerdo respectivamente. Una muestra del cultivo fue extraída y transferida al caldo de soya-triptona (TSB, por sus siglas en ingles), y se dejó crecer por 24 horas a 37°C.

3.5.2.3 Preparación del inóculo de *Escherichia coli* 0157:H7 y *Escherichia coli*: Después de haber transcurrido 24 horas el cultivo fue sacado del incubador y colocado en tubos que se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos a 16°C. Por medio de la centrifugación se logró una separación de las células de la bacteria y el caldo de soya. El caldo fue desechado y las células fueron diluidas con 10 ml de agua destilada estéril y se centrifugaron de nuevo. Este procedimiento se repitió tres veces, con el fin de eliminar cualquier residuo del caldo en las células de la bacteria. Una vez finalizadas las tres centrifugaciones, las células restantes se vertieron en 500 ml de agua destilada estéril, obteniendo de esta forma el inóculo a 1.0×10^8 UFC/ml.

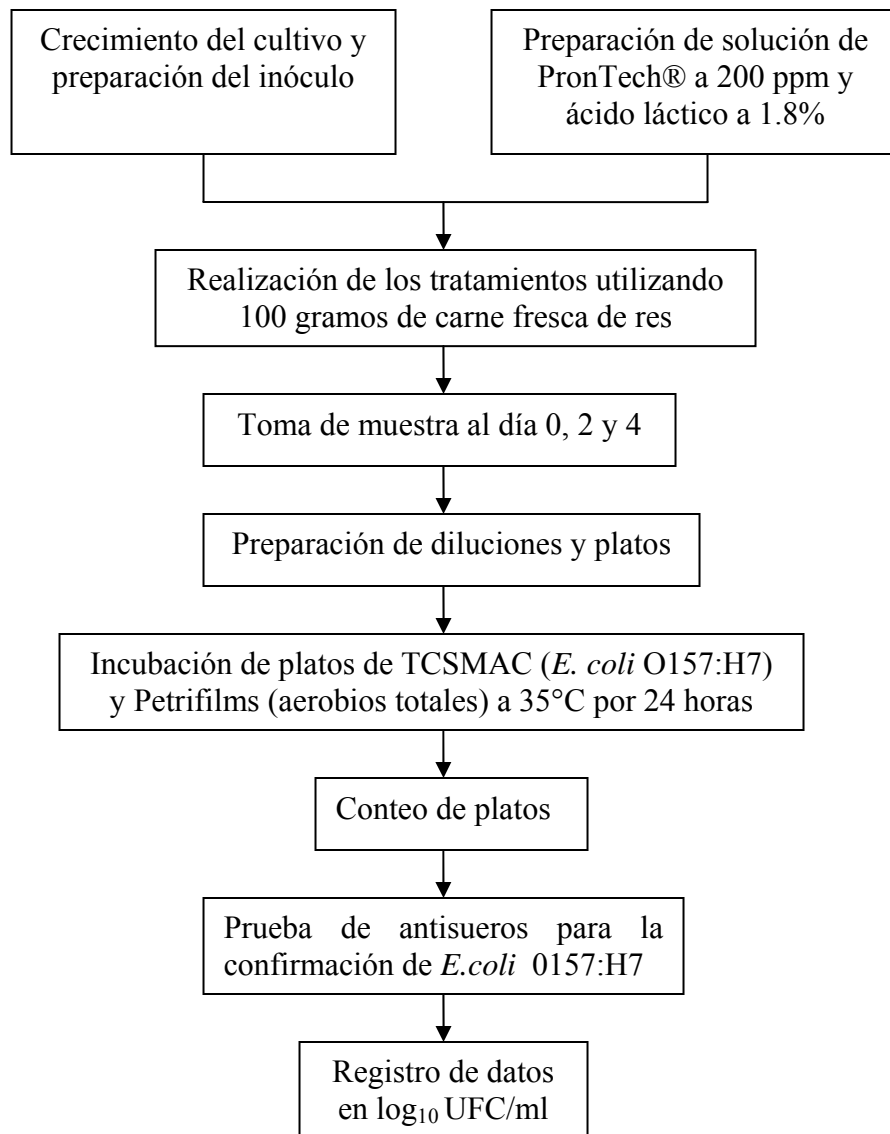


Figura 4. Flujograma del análisis de carga microbiana (*E. coli* O157:H7) en carne fresca de res.

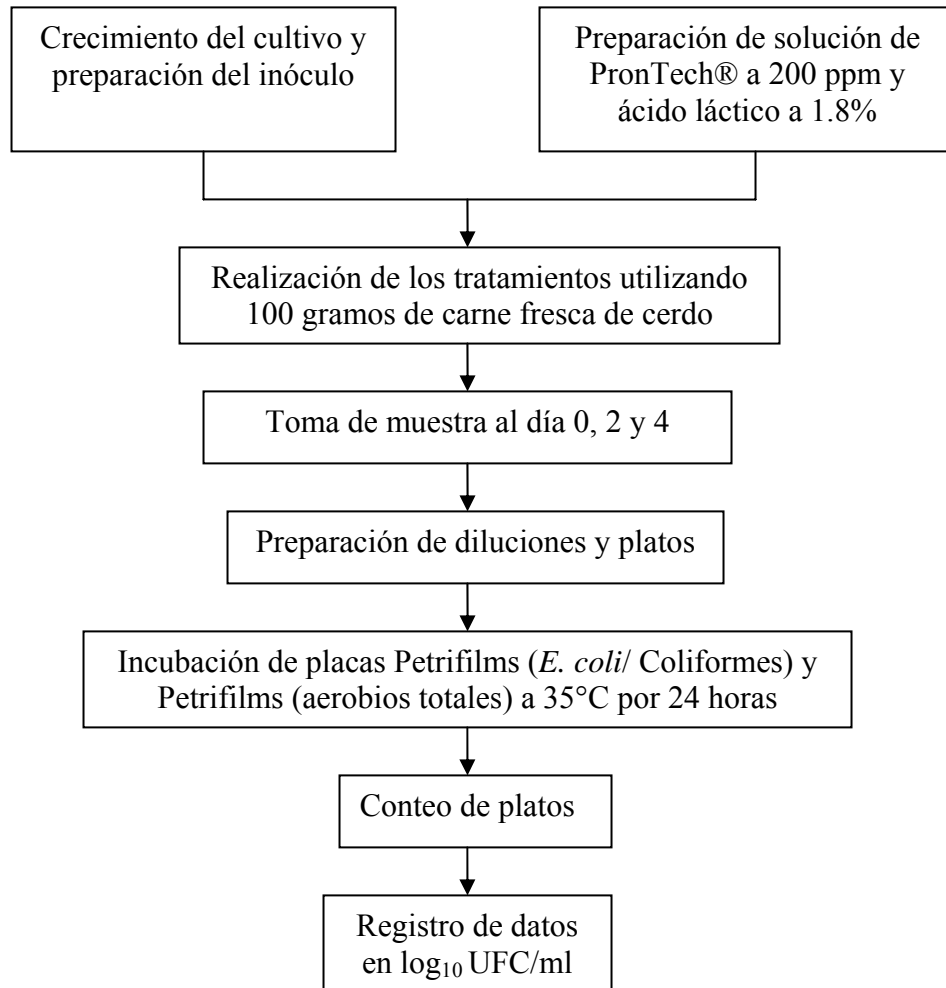


Figura 5. Flujograma del análisis de carga microbiana (*E. coli*) en carne fresca de cerdo.

3.5.2.4 Preparación de solución de PronTech® (alquil dimetil bencil amonio clorado): PronTech® esta compuesto por 40% del ingrediente activo (alquil dimetil bencil amonio clorado) y 60% de urea como material inerte. La concentración utilizada en el estudio fue de 200 ppm. La cantidad de producto a utilizar fue calculada por medio del factor de dilución (ecuación 1), sustituyendo en la X la concentración de partes por millón deseadas. Se obtuvo un resultado final de 0.5 gramos de producto por cada litro de agua potable.

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\% \text{ ingrediente activo} \times 10,000}{X \text{ ppm}} \quad [1]$$

3.5.2.5 Preparación de solución de ácido láctico: El ácido láctico utilizado contiene una pureza del 95%. La concentración utilizada en el estudio fue de 1.8%. La cantidad de producto se calculó haciendo uso del Cuadrado de Pearson, obteniendo un resultado final de 19.3 mililitros de ácido láctico por cada litro de agua potable.

3.5.2.6 Preparación de agar selectivo MacConkey con sorbitol y telurito-cefixima: Se mezclaron 51.5 gramos de agar en 1 litro de agua destilada hasta obtener una solución homogénea. Luego ésta fue colocada en el autoclave por 15 minutos a 121°C. Una vez autoclavado el medio y acondicionado a 35°C aproximadamente, se añadió 2.5 mg/L de telurito y 0.05 mg/L de cefixima.

3.5.2.7 Preparación, empaque y almacenado de tratamientos: El tratamiento sin el inóculo de *E. coli* (control negativo) fue realizado primero para evitar la contaminación cruzada durante la preparación de los tratamientos restantes. Aproximadamente 1 ml *E. coli* a 1.0×10^8 UFC/ml fue esparcido sobre las muestras de 100 gramos de carne fresca de res y cerdo. Las muestras inoculadas se dejaron durante 20 minutos para permitir la adhesión bacteriana. Luego los tratamientos restantes fueron realizados de acuerdo a las especificaciones de cada uno: el tratamiento sólo con el inóculo (control positivo), el tratamiento con el inóculo más la solución de PronTech® a 200 ppm y el tratamiento con el inóculo más la solución de ácido láctico a 1.8%. Una vez realizados los tratamientos, se procedió a su empaque en bolsas estériles y a su almacenamiento a una temperatura de 4°C, para luego ser evaluados en el día 0, 2 y 4.

3.5.2.8 Procedimiento para la preparación de platos y siembra de tratamientos: Los tratamientos se retiraron del refrigerador y se les agregó 1 litro de agua peptonada a cada uno para enjuagarlos. Luego, 1 ml de cada tratamiento fue mezclado con 9 ml de agua peptonada en un tubo de ensayo obteniendo la dilución de 10^{-1} . El tubo de ensayo se agitó

y posteriormente se extrajo 1 ml que fue añadido a 9 ml de agua peptonada obteniendo la dilución de 10^{-2} , etc. Este procedimiento se repitió hasta obtener las diluciones deseadas (figura 6).

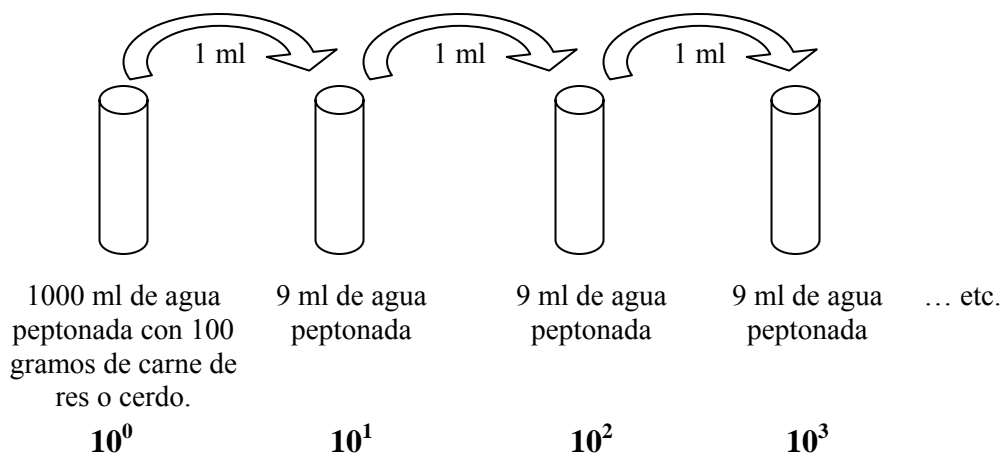


Figura 6. Preparación de diluciones de las muestras.

Luego de haber realizado las diluciones y marcado los platos Petri, se prosiguió hacer la siembra en duplicado de cada tratamiento. Para la identificación de *E. coli* O157:H7 en carne fresca de res se utilizó el agar selectivo MacConkey con Sorbitol y Telurito-Cefixima (TC SMAC, por sus siglas en inglés) utilizando la técnica de distribución en plato, la cual consiste en la siembra de 0.1 ml de la dilución en el medio selectivo. Para la identificación de *E. coli* en carne fresca de cerdo se utilizó Petrifilms para conteo de *E. coli*/coliformes. En el conteo de mesófilos totales se utilizaron Petrifilms para conteo de aerobios totales. Los platos fueron incubados de 18-24 horas a 35°C.

3.5.2.9 Lectura de siembras de *Escherichia coli* O157:H7 y *Escherichia coli* genérica:

Pasadas las 24 horas de incubación se prosiguió al conteo de los platos y a al registro de los datos obtenidos para su posterior análisis. Los datos fueron reportados en UFC de *E. coli*/ml y UFC aerobios totales/ml.

3.5.2.10 Confirmación de *E. coli* O157: H7 en carne fresca de res: Para el estudio efectuado en carne fresca de res se realizaron pruebas antiseros para la confirmación de *E. coli* O157:H7 en las siembras obtenidas. La prueba consistió en marcar dos círculos en un portaobjeto, luego una gota del antisuero para el antígeno O157 fue añadido a cada círculo. Haciendo uso de una asa estéril se removió una colonia de los platos y fue cuidadosamente emulsificada en una de las gotas del antisuero, dejando la otra gota como

control. El portaobjeto fue observado en el microscopio, la presencia de aglutinación en el antisuero que contenía la bacteria confirmó la presencia de O157 en los tratamientos. El mismo procedimiento fue realizado para la identificación de H7, utilizando el antisuero del gen H7 para su determinación.

3.5.3 Estudio realizado en la Planta de Industrias Cárnicas Zamorano

3.5.3.1 Evaluación de canales de res y cerdo: Para la evaluación de los tratamientos se utilizaron medias canales de res y cerdo. El procedimiento para la elaboración de los tratamientos se resume en la figura 7 y se detalla a continuación:

3.5.3.2 Preparación de solución de PronTech® (alquil dimetil bencil amonio clorado): PronTech® está compuesto por 40% del ingrediente activo (alquil dimetil bencil amonio clorado) y 60% de urea como material inerte. La concentración utilizada en el estudio fue de 200 ppm diluida en agua potable. La cantidad de producto a utilizar fue calculada por medio del factor de dilución (ecuación 2), sustituyendo en la X la concentración de partes por millón deseadas. Se obtuvo un resultado final de 0.5 gramos de producto por cada litro agua potable.

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\% \text{ ingrediente activo} \times 10,000}{X \text{ ppm}} \quad [2]$$

3.5.3.3 Preparación de solución de ácido láctico: El ácido láctico utilizado contiene una pureza del 98%. La concentración utilizada en el estudio fue de 1.8%. La cantidad de producto se calculo haciendo uso del Cuadrado de Pearson, obteniendo un resultado final de 18.7 mililitros de ácido láctico por cada litro de solución.

3.5.3.4 Preparación de agar para recuentos en placa: Se mezclaron 22.5 gramos de agar en 1 litro de agua destilada hasta obtener una solución homogénea. Luego esta fue colocada en el autoclave por 15 minutos a 121°C. Una vez autoclavado el medio y acondicionado a 35°C aproximadamente, se prosiguió a verter de 10 a 15 ml del medio en cada plato Petri y se dejó gelificar. Una vez gelificado el medio, los platos se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

3.5.3.5 Preparación de agar violeta rojo bilis: Se mezclaron 41.5 gramos de agar en un litro de agua destilada hasta obtener una solución homogénea. Luego, ésta se sometió a

calor y agitación hasta llegar a su punto de ebullición. Se dejó hervir por un minuto y posteriormente se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 35°C aproximadamente. De 10 a 15 ml del medio se vertieron en el plato Petri y se dejaron gelificar. Una vez gelificado el medio, los platos se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

3.5.3.6 Realización de tratamientos: Cada muestra consistió en una media canal, que antes de ser almacenada en el cuarto de mantenimiento se le aplicó el tratamiento correspondiente. El muestreo de la carga microbiana se realizó antes de la aplicación del tratamiento y 24 horas después de haber aplicado el mismo. El muestreo se efectuó por medio de la técnica de hisopado, siguiendo el método #991.14 establecido por la AOAC para muestreo de canales de res y cerdo.

3.5.3.7 Técnica de hisopado: El marco estéril, con un área de 100 cm² (Anexo 1), fue colocado sobre las zonas a muestrear en las canales de res y cerdo (Anexo 2 y 3). El hisopo fue frotado sobre dicha área 10 veces en ambas direcciones. Luego, este fue colocado en una bolsa estéril donde se agregó 15 ml de la solución búfer de potasio-fosfato monobásico. Posteriormente las muestras recolectadas fueron almacenadas a una temperatura de 4°C hasta ser analizadas. Las siembras se realizaron en duplicado el mismo día en que se tomó la muestra, utilizando el Agar Violeta Rojo Bilis (VRBA, por sus siglas en inglés) para coliformes y Agar para Recuentos en Placa (PCA, por sus siglas en inglés) para mesófilos aerobios totales.

3.5.3.8 Procedimiento para la preparación de platos y siembra de muestras: Se realizaron las diluciones correspondientes a cada tratamiento y se prosiguió a la siembra en duplicado de cada muestra. La siembra se realizó por medio de la técnica de distribución en plato, que consiste en colocar 0.1 ml de la dilución en el medio para identificación de aerobios totales (PCA) y para coliformes (VRBA). Una vez realizados los platos, estos se incubaron durante 24 horas a 35°C.

3.5.3.9 Lectura de siembras de coliformes y aerobios totales: Después de haber transcurrido 24 horas de incubación, se prosiguió al conteo de los platos y a al registro de los datos obtenidos para su posterior análisis. Los datos fueron reportados en UFC de coliformes/cm² y UFC de aerobios totales/cm².

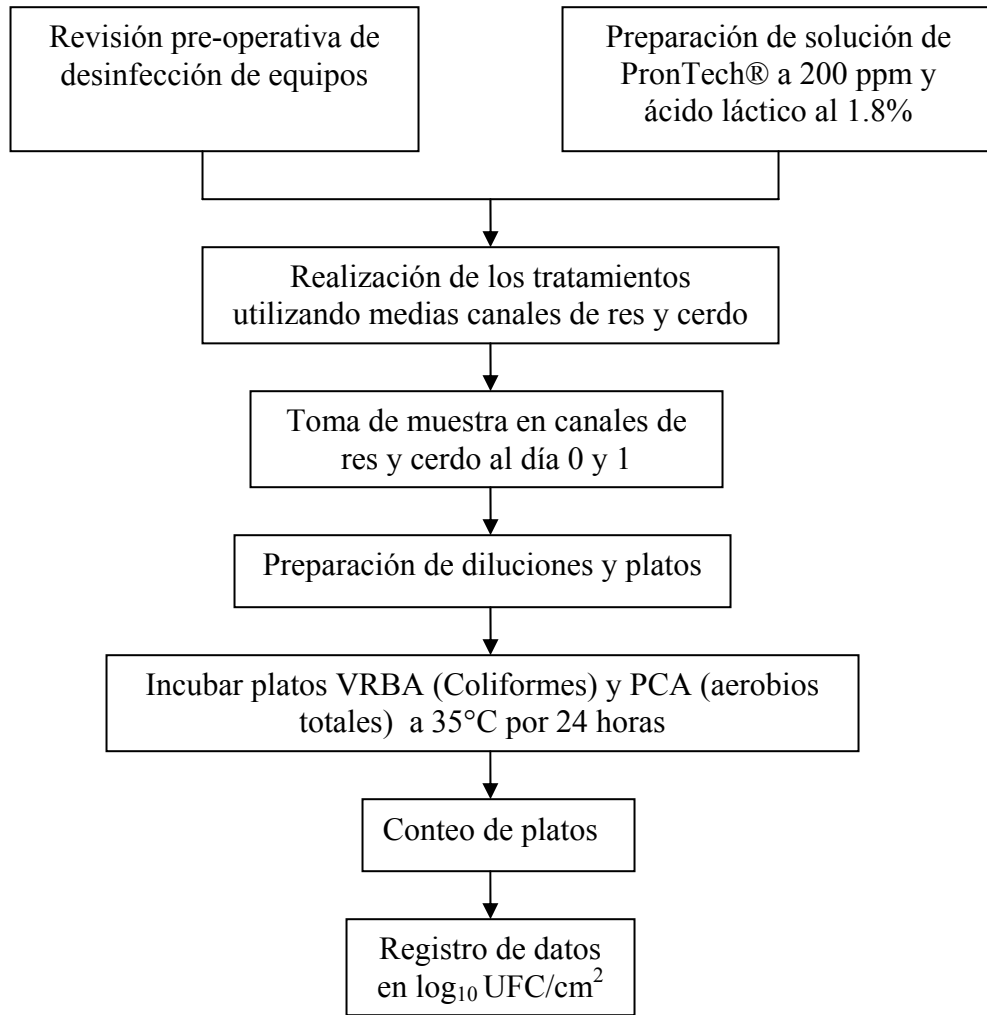


Figura 7. Flujograma del análisis de carga microbiana (Aerobios totales/ Coliformes) en canales de res y cerdo.

3.5.4 Análisis estadístico

3.5.4.1 Evaluación de carne fresca de res y cerdo: Se realizó un análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo y una separación de medias (Tukey) utilizando el modelo lineal general (GLM, por sus siglas en inglés), del Sistema de Análisis Estadístico (SAS®), versión 8.0, fijando un nivel de significancia de $P < 0.05$. La variable evaluada fue el cambio de la carga microbiana en el tiempo.

3.5.4.2 Evaluación de canales de res y cerdo: Se efectuó un análisis de varianza (ANDEVA) y separación de media (Tukey) utilizando el modelo lineal general (GLM, por sus siglas en inglés), del Sistema de Análisis Estadístico (SAS®), versión 8.0, fijando un nivel de significancia de $P < 0.05$. La variable evaluada fue el cambio de la carga microbiana 24 horas después de haber aplicado el tratamiento.

3.5.4.3 Evaluación de POES y POE para la Empresa Universitaria de Industrias Cárnicas de Zamorano: Se efectuó una prueba t utilizando el modelo lineal general (GLM, por sus siglas en inglés), del Sistema de Análisis Estadístico (SAS®), versión 8.0, fijando un nivel de significancia de $P < 0.05$. La variable evaluada fue la diferencia entre la calificación de los estudiantes y operarios antes y después de conocer el POES y POE para lavado de la canales de res y cerdo de la Empresa Universitaria de Industrias Cárnicas de Zamorano.

3.5.5 Análisis costos variables

Se realizó un análisis de costos sobre la aplicación de PronTech® y ácido láctico durante el proceso de sacrificio efectuado actualmente en la Planta de Industrias Cárnicas de Zamorano. El análisis de costos se basó únicamente en los costos variables implicados por la obtención de los antimicrobianos, calculando de esta forma el costo de la aplicación de cada antimicrobiano por canal.

3.5.6 Elaboración de Procedimiento Operacional Estándar de Sanidad (POES)

Se realizó un POES para la preparación de la solución de ácido láctico al 1.8% (Anexo 4), basando en los procedimientos de la Planta de Industrias Cárnicas de Zamorano y describiendo detalladamente los pasos a seguir para asegurar que su preparación sea la correcta. También, se ha incluido una tabla de diluciones (Anexo 5), en donde se

presentan las cantidades de ácido láctico a utilizar a partir de la cantidad de solución que se desee preparar.

3.5.7 Elaboración de Procedimiento Operacional Estandarizado (POE)

Se modificó el POE actual de la Planta de Industrias Cárnicas de Zamorano, agregando en la sección de sacrificio de bovinos y porcinos el procedimiento a seguir para el lavado de las canales de res y cerdo con ácido láctico al 1.8% y el procedimiento operacional estandarizado en caso de que una canal accidentalmente se cae al suelo (Anexo 6).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los agentes antimicrobianos mostraron en general mejor control sobre la carga microbiana que el tratamiento control. De los antimicrobianos evaluados el ácido láctico al 1.8% logró una reducción más significativa en la carga microbiana que la solución de PronTech® a 200 ppm, siendo el ácido láctico el mejor tratamiento.

4.1 PARTE I. ESTUDIO REALIZADO EN EL LABORATORIO DE LA UNIVERSIDAD DE FLORIDA

4.1.1 Evaluación en carne fresca de res

4.1.1.1 *E. coli* O157:H7: Existió una marcada diferencia en el comportamiento de los tratamientos en cuanto a su contenido microbiano (cuadro 4). Como se esperaba, el control negativo no presentó crecimiento de *E. coli* O157:H7, lo cual es buen indicador ya que la carne por si sola no contenía este patógeno, indicándonos buenas condiciones de higiene e inocuidad. De esta forma el control negativo es significativamente diferente ($P < 0.05$) al resto de los tratamientos al no presentar crecimiento de dicho patógeno.

De los tratamientos inoculados con la bacteria, el control positivo fue significativamente diferente ($P < 0.05$) al presentar una carga mayor con respecto al los tratamientos que contenían los antimicrobianos, lo cual nos indica que ambos agentes tuvieron efecto en la disminución de la carga bacteriana.

En el día cero hay diferencia significativa ($P < 0.05$) entre control positivo y el tratamiento con ácido láctico, logrando este último una menor carga de *E. coli* O157:H7. Sin embargo, el tratamiento con PronTech® no es significativamente diferente ($P < 0.05$) a el control positivo, lo cual nos indica que este antimicrobiano no realizó una disminución significativa de la carga bacteriana.

Cuadro 4. Carga de *E. coli* O157:H7 (Log₁₀ UFC/ml) en carne fresca de res inoculada con *E. coli* O157:H7.

Tratamiento	Día 0	Día 2	Día 4
Control Negativo	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
Control Positivo	3.65 ^b	3.02 ^b	2.70 ^b
PronTech® (200 ppm)	3.32 ^{bc}	2.49 ^c	2.17 ^c
Ácido láctico (1.8%)	3.13 ^c	2.32 ^c	1.74 ^c

Los promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes. P<0.05

En el día dos y cuatro, ambos antimicrobianos fueron significativamente diferentes (P<0.05) con respecto al control positivo, lo cual indica que después de haber transcurrido el segundo día de almacenamiento de la carne ambos agentes tuvieron un mejor efecto en la reducción de la carga microbiana. PronTech® y ácido láctico no mostraron diferencia significativa (P<0.05), alcanzando ambos la misma carga microbiana.

Desde el día cero al día cuatro se observa una reducción en el control positivo debida a la temperatura de almacenamiento (4°C), que provoca en la bacteria un estado de latencia y por ende una reducción aún cuando no ha sido tratada con ningún agente bactericida. Dicha reducción no indica muerte, ya que cuando la bacteria se adapte a su ambiente idóneo, volverá a proliferar de manera normal.

En el cuadro 5 se muestra el cambio de la carga microbiana durante el almacenamiento en refrigeración de la carne fresca de res. Entre el día cero y el día dos, el control positivo tuvo una reducción logarítmica de 0.64 UFC/ml y los tratamientos con PronTech® y ácido láctico de 0.83 y 0.80 UFC/ml respectivamente, siendo los tratamientos con antimicrobiano significativamente diferentes (P<0.05) al control positivo, presentando una disminución mayor en la carga microbiana. Sin embargo, ambos antimicrobianos no presentan diferencias significativas (P<0.05) en cuanto a la disminución bacteriana siendo ambos igual de efectivos.

Cuadro 5. Cambio en la carga de *E. coli* O157:H7 (Log₁₀ UFC/ml) en carne fresca de res inoculada con *E. coli* O157:H7.

Tratamiento	Día 0 - Día 2	Día 0 – Día 4
Control Negativo	0.00 ^a	0.00 ^a
Control Positivo	-0.64 ^b	-0.95 ^b
PronTech® (200 ppm)	-0.83 ^c	-1.16 ^c
Ácido láctico (1.8%)	-0.80 ^c	-1.39 ^d

Los promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes. P<0.05

Desde el inicio del estudio hasta su finalización, el tratamientos con ácido láctico y PronTech® fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) al control positivo, mostrando una mayor reducción en la carga microbiana. De los dos antimicrobianos, el ácido láctico presentó una disminución significativamente mayor con respecto a PronTech® ($P < 0.05$), logrando una reducción logarítmica de *E. coli* O157:H7 de 1.39 UFC/ml.

4.1.1.2 Mesófilos aerobios totales: En el análisis de microorganismos aerobios presentes en la carne fresca de res existió una marcada diferencia en cuanto a su contenido microbiano (cuadro 6). En el día cero la carga microbiana del control negativo fue significativamente diferente ($P < 0.05$) con respecto a los otros tres tratamientos, esto se debe a que los otros tres tratamientos fueron inoculados con *E. coli* O157:H7, por lo que se esperaba que su contenido microbiano fuese mayor. El control positivo y los tratamientos con antimicrobianos no fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$), indicando que ambos iniciaron con la misma carga microbiana y que ninguno de los antimicrobianos tuvo un efecto inmediato en la reducción de las bacterias aerobias.

Cuadro 6. Carga de mesófilos aerobios totales (Log_{10} UFC/ml) en carne fresca de res inoculada con *E. coli* O157:H7.

Tratamientos	Día 0	Día 2	Día 4
Control Negativo	2.49 ^a	3.36 ^a	5.71 ^a
Control Positivo	4.41 ^b	3.66 ^a	5.23 ^a
PronTech® (200 ppm)	4.11 ^b	3.44 ^a	4.55 ^b
Ácido láctico (1.8%)	4.04 ^b	3.28 ^a	4.07 ^b

Los promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes. $P < 0.05$

En el día dos ninguno de los cuatro tratamientos fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) en cuanto al contenido microbiano. Esto se debe a que el control negativo presentó un aumento en su contenido de aerobios totales y los otros tres tratamientos presentaron una disminución (cuadro 7). Esta disminución se puede atribuir a dos factores: uno es la temperatura de almacenamiento que provoca una disminución logarítmica en la carga de *E. coli* O157:H7 y la segunda por la competencia que pueda generarse entre microorganismos sicrotrofos y el patógeno.

En el día cuatro, el control positivo y el control negativo no fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) al presentar igual carga microbiana. Sin embargo, ambos controles fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) a los tratamientos con antimicrobiano los cuales registraron niveles más bajos en su contenido microbiano. Los tratamientos con antimicrobiano no fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$), es decir ambos lograron una carga microbiana similar.

Desde el inicio del estudio hasta su conclusión, los cuatro tratamientos fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$), siendo el tratamiento con ácido láctico el que presentó una tasa de crecimiento menor con respecto a los otros tres tratamiento e identificándolo como el más efectivo al momento de controlar la carga microbiana.

Cuadro 7. Cambio en la carga de mesófilos aerobios totales (Log_{10} UFC/ml) en carne fresca de res inoculada con *E. coli* O157:H7.

Tratamiento	Día 0 - Día 2	Día 0 - Día 4
Control Negativo	0.87 ^a	3.22 ^a
Control Positivo	-0.76 ^b	0.82 ^b
PronTech® (200 ppm)	-0.67 ^c	0.45 ^c
Ácido láctico (1.8%)	-0.76 ^b	0.03 ^d

Los promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes. $P < 0.05$

4.1.2 Evaluación de carne fresca de cerdo

4.1.2.1 *E. coli* genérica: Los tratamientos muestran una marcada diferencia en cuanto a su contenido microbiano (cuadro 8). El control negativo no presentó crecimiento de *E. coli*, hecho esperado ya este no fue inoculado con la bacteria. Esto también nos indica que la carne por sí sola no contenía la bacteria, indicando buenas condiciones de higiene e inocuidad. De esta forma el control negativo es significativamente diferente ($P < 0.05$) al resto de los tratamientos al no presentar crecimiento de dicha bacteria. De los tratamientos inoculados con la bacteria, el control positivo presentó una carga mayor con respecto a los tratamientos que contenían los antimicrobianos, indicando que ambos agentes tuvieron efecto en la disminución de la carga microbiana.

Cuadro 8. Carga de *E. coli* (Log_{10} UFC/ml) en carne fresca de cerdo inoculada con *E. coli*.

Tratamientos	Día 0	Día 2	Día 4
Control Negativo	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
Control Positivo	4.45 ^b	4.34 ^b	4.07 ^b
PronTech® (200 ppm)	3.36 ^c	3.16 ^c	2.86 ^c
Ácido láctico (1.8%)	3.15 ^c	2.84 ^d	2.47 ^d

Los promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes. $P < 0.05$

Para el día dos y cuatro, ambos antimicrobianos fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) con respecto al control positivo, señalando su eficacia en la reducción de la

carga microbiana. PronTech® y ácido láctico mostraron diferencia significativa para el día dos y cuatro ($P < 0.05$), siendo el tratamiento con ácido láctico el que registró una menor carga microbiana, por lo tanto fue el más efectivo al momento de controlar la carga microbiana.

El control positivo presentó una reducción en la carga microbiana, este hecho es atribuido a que las muestras fueron almacenadas a una temperatura de 4°C, lo que conlleva a la bacteria a un estado de latencia y por lo tanto una reducción aun cuando esta no ha sido tratada con ningún agente antimicrobiano. Esta reducción no es un indicador de muerte, ya que la bacteria se encuentra presente en el producto y cuando se adapte a su ambiente ideal volverá a multiplicarse de manera normal.

En el cuadro 9, se observa que los tratamientos con antimicrobiano fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) con respecto al control positivo, presentando una mayor disminución en la carga microbiana e indicando la efectividad de ambos al momento de controlar el crecimiento de *E. coli*. A su vez, los tratamientos con antimicrobiano fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) entre sí, superando el tratamiento con ácido láctico al tratamiento con PronTech®, registrando la mayor reducción en la carga microbiana.

Cuadro 9. Cambio en la carga de *E. coli* (Log_{10} UFC/ml) en carne fresca de cerdo inoculada con *E. coli*.

Tratamiento	Día 0 - Día 2	Día 0 - Día 4
Control Negativo	0.00 ^a	0.00 ^a
Control Positivo	-0.11 ^b	-0.38 ^b
PronTech® (200 ppm)	-0.20 ^c	-0.51 ^c
Ácido láctico (1.8%)	-0.31 ^d	-0.67 ^d

Los promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes. $P < 0.05$

4.1.2.2 Mesófilos aerobios totales: Tal como se observa en el cuadro 10, los tratamientos mostraron una marcada diferencia en cuanto a su contenido de microorganismos aerobios. La carga microbiana del control negativo fue significativamente diferente ($P < 0.05$) con respecto a los otros tres tratamientos, ya que los otros tres tratamientos fueron inoculados con *E. coli* y se esperaba que su contenido microbiano fuese mayor.

El control negativo fue significativamente diferente ($P < 0.05$) con respecto a los tratamientos con ácido láctico y PronTech®; Sin embargo, entre los dos antimicrobianos no hubo diferencia significativa ($P < 0.05$), indicando la eficacia de ambos en la reducción de las bacterias aerobias.

Cuadro 10. Carga de mesófilos aerobios totales (Log₁₀ UFC/ml) en carne fresca de cerdo inoculada con *E. coli*.

Tratamientos	Día 0	Día 2	Día 4
Control Negativo	2.39 ^a	3.13 ^a	3.35 ^a
Control Positivo	4.45 ^b	4.11 ^b	4.96 ^b
PronTech® (200 ppm)	3.27 ^c	3.02 ^a	3.38 ^a
Ácido láctico (1.8%)	3.18 ^c	2.89 ^a	3.22 ^a

Los promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes. P<0.05

En el cuadro 11, se observa que el control negativo fue significativamente diferente con respecto al resto de los tratamientos registrando un aumento mayor en la carga microbiana. Este tratamiento no fue inoculado con *E. coli*, por lo tanto el crecimiento de bacterias aerobias no se vio limitado por la presencia de otro microorganismo. Al analizar el cambio en la carga microbiana entre el día cero y día dos (cuadro 11), se observa un aumento logarítmico del contenido microbiano en el control negativo, mientras que el control positivo, el ácido láctico y PronTech® registraron una disminución logarítmica, siendo PronTech® estadísticamente diferente al control positivo y estadísticamente igual (P<0.05) al ácido láctico.

El control positivo fue estadísticamente diferente a los tratamientos con antimicrobiano presentando un aumento mayor en el contenido de aerobios totales. PronTech® y ácido láctico, no fueron significativamente diferentes entre sí, siendo estos igual de efectivos al momento de controlar el crecimiento de microorganismos aerobios en carne fresca de cerdo.

Cuadro 11. Cambio en la carga de mesófilos aerobios totales (Log₁₀ UFC/ml) en carne fresca de cerdo inoculada con *E. coli*.

Tratamiento	Día 0 - Día 2	Día 0 - Día 4
Control Negativo	0.74 ^a	0.96 ^a
Control Positivo	-0.34 ^b	0.52 ^b
PronTech® (200 ppm)	-0.25 ^c	0.11 ^c
Ácido láctico (1.8%)	-0.29 ^{bc}	0.04 ^c

Los promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes. P<0.05

4.2 PARTE II: ESTUDIO REALIZADO EN LA EMPRESA UNIVERSITARIA DE INDUSTRIAS CÁRNICAS, ZAMORANO

4.2.1 Evaluación de canales de res

Como se muestra en el cuadro 12, el tratamiento control fue estadísticamente diferente con respecto a los tratamientos que contenían antimicrobianos, registrando un aumento logarítmico de 0.46 UFC/cm². Ambos antimicrobianos fueron significativamente diferentes (P<0.05), siendo el ácido láctico el mejor, ya que presentó una disminución logarítmica del contenido de aerobios totales presente en la superficie de la canal de res de 0.83 UFC/cm².

Cuadro 12. Cambio en la carga de mesófilos aerobios totales (Log₁₀ UFC/cm²) en canales de res.

Tratamiento	Carga Final	Carga Inicial	Diferencia
Control	3.59 ± 0.20 ^a	3.13 ± 0.22 ^a	0.46 ^a
PronTech® (200 ppm)	2.62 ± 0.20 ^b	3.09 ± 0.16 ^a	- 0.46 ^b
Ácido láctico (1.8%)	2.60 ± 0.22 ^b	3.43 ± 0.23 ^b	-0.83 ^c

Los promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes. P<0.05

En el análisis de coliformes (cuadro 13), el tratamiento control fue significativamente diferente (P<0.05) a los tratamientos con ácido láctico y PronTech®, mostrando un aumento logarítmico en el contenido de coliformes de 0.31 UFC/cm². Ambos antimicrobianos, ácido láctico y PronTech®, fueron estadísticamente diferentes (P<0.05) entre sí, al presentar una reducción logarítmica de 0.98 y 0.48 UFC/cm² respectivamente, siendo el ácido láctico el mejor tratamiento al registrar una mayor disminución en el contenido de coliformes presentes en las superficies de las canales de res.

Cuadro 13. Cambio en la carga de coliformes (Log₁₀ UFC/cm²) en canales de res.

Tratamiento	Carga Final	Carga Inicial	Diferencia
Control	2.59 ± 0.34 ^a	2.28 ± 0.32 ^a	0.31 ^a
PronTech® (200 ppm)	1.77 ± 0.37 ^b	2.25 ± 0.35 ^a	-0.48 ^b
Ácido láctico (1.8%)	1.27 ± 0.18 ^c	2.25 ± 0.16 ^a	-0.98 ^c

Los promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes. P<0.05

La ley hondureña establece un máximo permitido de $2.0 \log_{10}$ UFC/cm² (SAG, 2000). Como se muestra en el cuadro 13, la carga inicial de coliformes se encuentra arriba de lo permitido, y pasadas las 24 horas dicha carga microbiana aumenta. Sin embargo, con el uso de los antimicrobianos el contenido inicial de coliformes disminuye hasta niveles aceptables, siendo el ácido láctico el que registra una mayor disminución del contenido microbiano y por ende una carga final menor.

4.2.2 Evaluación de canales de cerdo

Como se muestra en el cuadro 14, el tratamiento control fue estadísticamente diferente ($P < 0.05$) con respecto a los tratamientos que contenían antimicrobianos, registrando un aumento logarítmico de 0.51 UFC/cm^2 . Ambos antimicrobianos, ácido láctico y PronTech®, fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$), registrando una reducción logarítmica en el contenido de aerobios totales de 0.62 y 0.30 UFC/cm^2 respectivamente, siendo el ácido láctico el mejor tratamiento al presentar una mayor disminución de la carga microbiana.

Cuadro 14. Cambio en la carga de mesófilos aerobios totales (Log_{10} UFC/cm²) en canales de cerdo.

Tratamiento	Carga Final	Carga Inicial	Diferencia
Control	3.89 ± 0.71^a	3.38 ± 0.72^a	0.51^a
PronTech® (200 ppm)	2.97 ± 0.48^b	3.27 ± 0.46^a	-0.30^b
Ácido láctico (1.8%)	2.71 ± 0.17^b	3.33 ± 0.16^a	-0.62^c

Los promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes. $P < 0.05$

Tal como se observa en el cuadro 15, el tratamiento control registró un aumento logarítmico en el contenido de coliformes de 0.52 UFC/cm^2 , siendo significativamente diferente ($P < 0.05$) con respecto a los tratamientos con ácido láctico y PronTech®. Los tratamientos con antimicrobianos, ácido láctico y PronTech®, fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) entre sí, al presentar una disminución de 0.82 y 0.51 UFC/cm^2 respectivamente, identificando como el mejor tratamiento al ácido láctico ya que logró una mayor disminución en el contenido de coliformes presentes en las superficies de las canales de cerdo.

Como se muestra en el cuadro 15, la carga inicial de coliformes presentes en las canales de cerdo se encuentra arriba de los niveles permitidos por la ley hondureña, la cual establece un máximo permitido de $2.0 \log_{10}$ UFC/cm² (SAG, 2000). Con la aplicación de antimicrobianos el contenido inicial de coliformes disminuye hasta niveles aceptables, siendo el ácido láctico el que registra una carga final menor.

Cuadro 15. Cambio en la carga de coliformes (Log_{10} UFC/cm²) en canales de cerdo.

Tratamiento	Carga Final	Carga Inicial	Diferencia
Control	3.05 ± 0.35 ^a	2.53 ± 0.39 ^a	0.52 ^a
PronTech® (200 ppm)	1.87 ± 0.31 ^b	2.38 ± 0.46 ^a	-0.51 ^b
Ácido láctico (1.8%)	1.85 ± 0.39 ^b	2.67 ± 0.16 ^a	-0.82 ^c

Los promedios con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes. P<0.05

4.3 ANÁLISIS DE COSTOS VARIABLES

El análisis muestra el costo de la aplicación del ácido láctico al 1.8% y de PronTech® a 200 ppm por canal. Como se observa en el cuadro 16, la aplicación del ácido láctico tiene un costo de 0.15 centavos de lempira por canal, mientras que la aplicación de PronTech® tiene un costo de 0.47 centavos de lempira. Con base en los datos presentados anteriormente, se pudo observar que el ácido láctico controla más eficientemente el crecimiento microbiano, y a su vez presenta el menor costo de aplicación, asumiendo que los costos fijos en los que se va a incurrir son iguales para ambos antimicrobianos.

Cuadro 16. Análisis de costos variables.

Producto	Cantidad	Precio	Costo por canal		
			Cantidad por Canal	Dólares (\$)	Lempiras (Lps.)
PronTech®	1 Kg.	\$12.59	0.0040 Kg.	\$0.05	L. 0.94
Ácido láctico	1 litro	\$1.71	0.0092 litro	\$0.02	L. 0.37

4.4 EVALUACIÓN DEL PROCEDIMIENTO OPERACIONAL ESTÁNDAR DE SANIDAD (POES) Y PROCEDIMIENTO OPERACIONAL ESTANDAR (POE)

Se elaboró el POES para la preparación de la solución de ácido láctico al 1.8% y el POE para el lavado de las canales de res y cerdo con ácido láctico al 1.8%. La media aritmética de la diferencia entre las calificaciones obtenidas por los estudiantes antes y después de conocer el POES y POE para lavado de canales de res y cerdo fue de 97.50 ± 3.37 , dicha nota indica una alta comprensión de ambos procedimientos. La calificaciones obtenidas antes y después de conocer el POES y POE fueron significativamente diferentes (P<0.05), verificando así su aplicabilidad y comprensión.

5. CONCLUSIONES

- Ácido láctico al 1.8% y PronTech® a 200 ppm lograron una reducción logarítmica significativa de la carga microbiana de *E. coli* O157:H7 con respecto al control positivo en la carne fresca de res inoculada con *E. coli* O157:H7.
- La tasa de crecimiento de aerobios totales se redujo significativamente al utilizar ácido láctico al 1.8% y PronTech® a 200 ppm en carne fresca de res inoculada con *E. coli* O157:H7.
- Ácido láctico al 1.8% y PronTech® a 200 ppm lograron una reducción logarítmica significativa de la carga microbiana de *E. coli* con respecto al control positivo en la carne fresca de cerdo inoculada con *E. coli*.
- La tasa de crecimiento de aerobios totales se redujo significativamente al utilizar ácido láctico al 1.8% y PronTech® a 200 ppm en carne fresca de cerdo inoculada con *E. coli*.
- Ácido láctico al 1.8% y PronTech® a 200 ppm lograron una reducción logarítmica significativa de la carga microbiana de coliformes y aerobios totales con respecto al control en las canales de res y cerdo.
- El tratamiento que logró una reducción logarítmica significativa mayor en carne fresca y canales de res y cerdo fue el ácido láctico al 1.8%.
- Las calificaciones obtenidas por los estudiantes antes y después de conocer el POES y POE para lavado de canales de res y cerdo fueron significativamente diferentes, verificando así su aplicabilidad y comprensión.
- Ácido láctico al 1.8% presentó el menor costo de aplicación por canal de res y cerdo comparado con PronTech® a 200 ppm.

6. RECOMENDACIONES

- Ácido láctico al 1.8% presentó el menor costo de aplicación por canal de res y cerdo comparado con PronTech® a 200 ppm.
- Se recomienda para estudios próximos controlar las variables de temperatura, pH y cloro del agua a utilizar para la solución del antimicrobiano.
- Efectuar una evaluación de las propiedades antimicrobianas del ácido láctico en canales de res y cerdo por un periodo de siete días para verificar su eficacia en canales que se destinen a maduración.
- Realizar un estudio del porque la carga microbiana es mayor en canales de cerdo comparadas con las canales de res.
- Evaluar el efecto del ácido láctico en la textura de la superficie de las canales de res y cerdo.
- Realizar un análisis sensorial a las canales tratadas con ácido láctico.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Belk E. 2001. National Cattlemen's Association: Beef decontamination techniques (en línea). Consultado el 18 septiembre 2005. Disponible en: <http://www.beef.org>
- Brock, T. 1997. Biology of Microorganism. Estados Unidos de Norteamérica. 737 p.
- Bryan, A. 1998. Bacteriología. CECSA. México. 595 p.
- Food and Drug Administration (FDA). 1999a. Poisonous or Toxic Materials (en línea). Consultado el 18 de abril 2005. Disponible en: <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/fc99-7.html>
- Food and drug Administration (FDA). 1999b. Antimicrobial Food Additives – Guidance (en línea). Consultado el 16 septiembre 2005. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-antg.html#1>
- Gill, C. 1991. Microbial principles in meat processing. Microbiology of Animals and Animal product. Estados Unidos de Norteamérica. 322 p.
- Girard J; Pipek P; Houska, M; Jelenikova, J; Kyhos, K; Hoke, K; Sikulova, M. 1991. Microbial decontamination of beef carcasses by combination of steaming and lactic acid spray (en línea). Journal of food engineering. Consultado el 17 septiembre 2005. Disponible en: www.elsevier.com/locate/jfoodeng
- Gorman, B; Sofos J; Morgan, J; Schmidt, G; Smith, G. 1995. Meat surface decontamination using lactic acid from chemical and microbial sources. Journal of food protection 58: 899-907.
- Jay, J. 1996. Modern Food Microbiology. 5th ed. Estados Unidos de Norteamérica. Edit. Chapman and Hall.
- Libby, J. 1986. Higiene de la Carne. México. Ed. Continental. 659 p.
- Mead S; Slutsker, L; Dietz, V; McCaig, L; Breese, J; Shapiro, C; Griffin, P; Tauxe, R. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases. Vol. 5, No 5: 12-25 p.
- Miller, J. 1998. Food Safety, Minesota. US. Eagan press. 443 p.

Prandl, O; Fischer, A; Schimidhofer, T; Sinell, H. 1994. Tecnología e higiene de la carne. Trad. Jaime Esain Escobar; Oscar Dignoes Torres-Quevedo; Isabel Cambero. Zaragoza, España. Edit. Acribia, S.A.

Salminen, S. 1998. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 2nd ed. New York. EU.Marcel Dekker Inc. 617 p.

Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG). 2000. Reglamento de inspecciones de carnes y productos cárnicos, Acuerdo No. 078-00. Honduras. La Gaceta, Diario oficial de la republica de Honduras. 49 p.

Stephen, J. 2000. Alimentos seguros: microbiología. España. Ed. Acribia, S.A. 400 p.

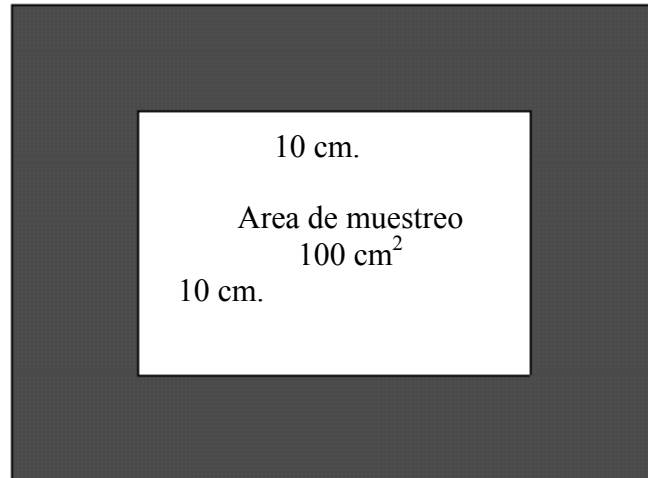
Stopforth J; Samelis, J; Sofos, J; Kemdall, P; Smith, G. 2003. Influence of organic acid concentration on survival of *Listeria monoytogenes* and *Escherichia coli* 0157:H7 in beef carcass wash water and other model equipment surfaces. Journal of food microbiology 20: 651-660.

Teuben, J; Barrientos, E. 2002. Manual de laboratorio de microbiología de alimentos. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 119 p.

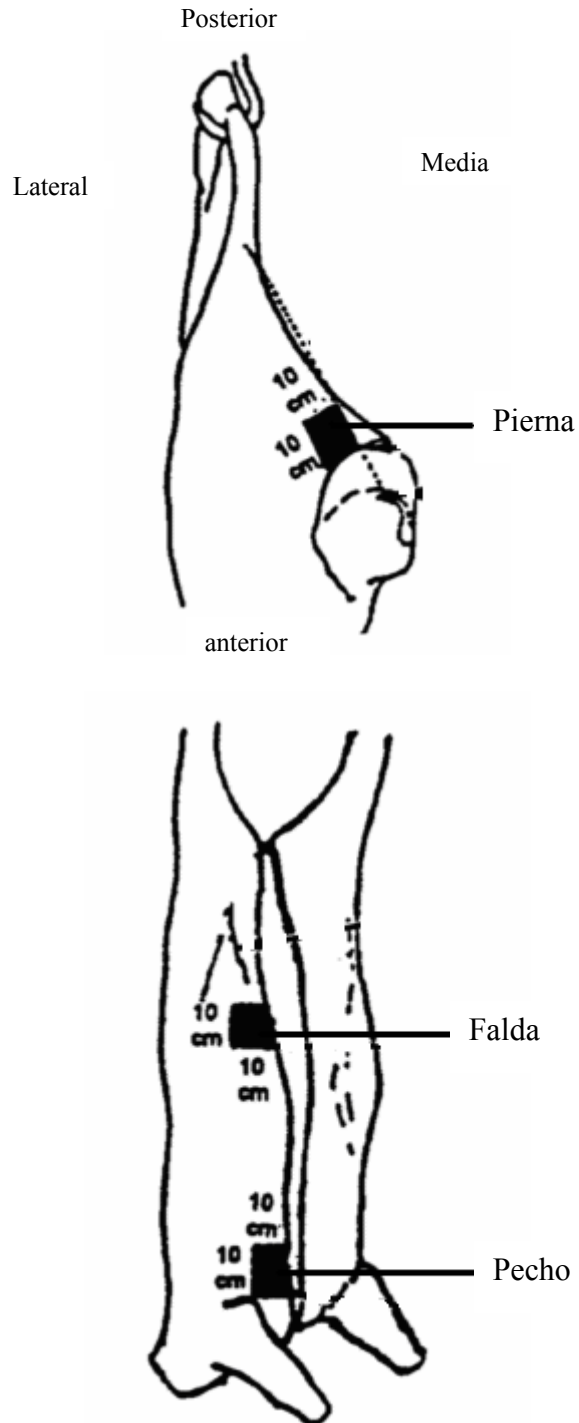
United promotion Inc (UPI). 2004. PronTech® (en línea). Consultado 18 septiembre 2005. Disponible en: <http://www.upitrading.com>

ANEXOS

Anexo 1. Marco de Muestreo.

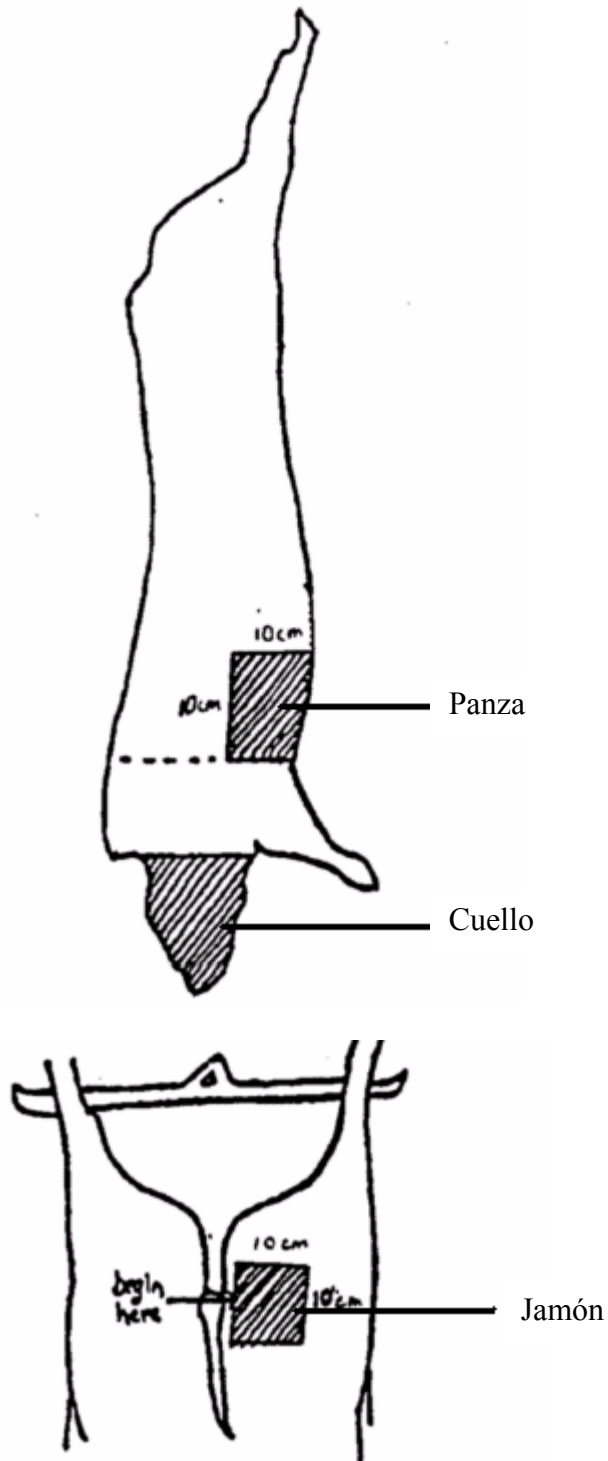


Anexo 2. Zonas de muestreo para aerobios totales y coliformes en canales de res.



Fuente: Federal Register, Vol. 61, No. 144, Rules and Regulations. AOAC method #991.14.

Anexo 3. Zonas de muestreo para aerobios totales y coliformes en canales de cerdo.



Fuente: Federal Register, Vol. 61, No. 144, Rules and Regulations. AOAC method #991.14.

Anexo 4. Procedimiento Operacional Estándar de Sanidad (POES).

1. Procedimiento estándar de operación de sanidad para la elaboración de la solución de ácido láctico al 1.8%.

1.1. Propósito: sanidad para la prevención de contaminación de microorganismos patógenos o de deterioro de las canales de res y cerdo durante el sacrificio.

1.2. Materiales: Agua, ácido láctico 98%, balde y probeta.

1.3. Frecuencia: Antes de iniciar actividades de sacrificio.

1.4. Responsable: Operarios, estudiantes y cualquier otra persona que forme parte del procesamiento.

1.5. Procedimiento:

1. Llenar con agua fría aproximadamente hasta la mitad de la capacidad de un balde (10 litros)
2. Medir con una probeta 187 ml de ácido láctico al 98%.
3. Mezclar dentro del balde con agua los 187 ml. del ácido láctico al 98%

1.6 Verificado por:

1.7 Autorizado por:

Nota: Cantidad calculada para tratar 15 canales de res o cerdo.

Anexo 5. Tabla de diluciones de ácido láctico al 98%.

Tabla de diluciones de ácido láctico al 98%
Concentración a utilizar: 1.8 % de ácido láctico

Cantidad de Agua	Cantidad de ácido láctico al 98%
5 litros	94 ml
6 litros	112 ml
7 litros	131 ml
8 litros	150 ml
9 litros	168 ml
10 litros	187 ml
11 litros	206 ml
12 litros	225 ml
13 litros	243 ml
14 litros	262 ml
15 litros	280 ml
16 litros	300 ml
17 litros	318 ml
18 litros	337 ml
19 litros	355 ml
20 litros	374 ml
21 litros	393 ml
22 litros	412 ml
23 litros	430 ml
24 litros	450 ml
25 litros	468 ml

Nota: Estas diluciones han sido calculadas haciendo uso del Cuadrado de Pearson.

Anexo 6. Procedimientos Operacionales Estandarizados (POE).

- **Lavado de la canal de bovinos.**

El operario o alumno-7 debe lavar la canal con agua a presión asegurándose de eliminar por completo el polvo de hueso que resulta al dividir el esternón y las vértebras. Luego debe cubrirla con ácido láctico al 1.8% haciendo uso de una bomba de mochila. La aplicación de ácido debe realizarse en sentido vertical de arriba hacia abajo. Para la ejecución de este trabajo el operario debe estar ubicado sobre una tarima de cuatro pies de altura para lograr una mejor cobertura de la canal. Posteriormente se colocará la numeración correspondiente y se almacenará la canal en Holding Cooler.

- **Lavado de la canal de porcinos.**

El operario o alumno-5 debe lavar la canal con agua a presión asegurándose de eliminar por completo el polvo de hueso que resulta al dividir el esternón y las vértebras. Luego debe cubrirla con ácido láctico al 1.8% haciendo uso de una bomba de mochila. La aplicación de ácido debe realizarse en sentido vertical de arriba hacia abajo. Para la ejecución de este trabajo el operario debe estar ubicado sobre una tarima de cuatro pies de altura para lograr una mejor cobertura de la canal. Posteriormente se colocará la numeración correspondiente y se almacenará la canal en Holding Cooler.

- **Procedimientos Operacionales Estandarizados en caso de que una canal accidentalmente se caiga al suelo.**

Si una canal se cae del riel se deben seguir las siguientes indicaciones:

1. Recoger inmediatamente la canal y volver a colocarla en el riel.
2. Darle una ducha de agua a presión y posteriormente cubrir la canal con una solución de ácido láctico al 1.8% desde altura en sentido vertical de arriba hacia abajo, por lo cual el operario debe colocarse sobre una tarima con una altura de cuatro pies.
3. Continuar con la faena.