

**Evaluación del efecto antimicrobiano natural  
de un marinado para carne de cerdo contra  
*Salmonella* spp.**

**Marco Antonio Reina Antillón**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2015

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Evaluación del efecto antimicrobiano natural  
de un marinado para carne de cerdo contra  
*Salmonella* spp.**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Marco Antonio Reina Antillón**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2015

# **Evaluación del efecto antimicrobiano natural de un marinado para carne de cerdo contra *Salmonella* spp.**

Presentado por:

Marco Antonio Reina Antillón

Aprobado:

---

Mayra Márquez, Ph.D.  
Asesora Principal

---

Luis Fernando Osorio, Ph.D.  
Director  
Departamento de Agroindustria  
Alimentaria

---

Adela Acosta, Dra.C.T.A.  
Asesora

---

Raúl H. Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

## **Evaluación del efecto antimicrobiano natural de un marinado para carne de cerdo contra *Salmonella* spp.**

**Marco Antonio Reina Antillón**

**Resumen:** Se estudió el efecto antimicrobiano natural de un marinado para carne para asar de cerdo. Se establecieron tres formulaciones de marinado y se escogió la más aceptada sensorialmente con grupos focales y pruebas de preferencia. Los marinados se elaboraron a base de vinagre, aceite, ajo, sal y pimienta; pero diferían en sus proporciones de semilla de mostaza (Sm) y/o romero (Ro): M1 4% Ro, M2 4% Sm, M3 2% Ro y 2% Sm. El marinado escogido fue M2 y se utilizó para los análisis fisicoquímicos (muestras sin inocular) y microbiológicos (muestras inoculadas con *Salmonella* spp). Todas las muestras se almacenaron a 4 o 12 °C y se muestrearon a 0, 24 y 120 h. El pH y pérdida por cocción fueron afectados por el marinado y la temperatura de almacenamiento a través del tiempo; mostrando una disminución de pH y aumento en pérdida por cocción de la carne marinada. La  $a_w$  fue afectada por el marinado a través del tiempo; siendo la carne marinada significativamente menor. Se inoculó la carne de cerdo con dos cepas comerciales, *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Poona, en niveles de 3 y 6 log<sub>10</sub> UFC/g. Para este estudio el nivel de inóculo no fue significativo pero la interacción del marinado con la temperatura de almacenamiento inhibió el crecimiento de *Salmonella* a través del tiempo. El efecto antimicrobiano solo se observó al momento de la aplicación del marinado y tuvo un efecto bacteriostático en el almacenamiento. Se recomienda realizar un estudio completo de vida de anaquel.

**Palabras clave:** Ácido acético, alicina, especias, patógeno, sobrevivencia.

**Abstract:** The antimicrobial effect of a marinade for pork tenderloin was investigated. Three marinade formulations were established and the most accepted was chosen through focal groups and preference tests. Marinades were equal in their amounts of vinegar, oil, salt and black pepper; but different in their amounts of mustard seed (Sm) and/or rosemary (Ro): M1 4% Ro, M2 4% Sm, M3 2% Ro y 2% Sm. The chosen marinade (M2) was used for the physicochemical (no inoculated samples) and microbiological analysis (inoculated samples with *Salmonella* spp). All samples were storage at 4 or 12 °C, and tested at 0, 24, and 120 h. The pH and cook loss were affected by the marinade and temperature during storage, marinated pork had a significantly lower pH and greater cook loss.  $a_w$  was affected by marinade during storage; marinated samples were significantly lower. Pork was inoculated with two commercial strains, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Poona, inoculum levels were 3 and 6 log<sub>10</sub> UFC/g. For this study the inoculum level was not significant but the interaction of the marinade and temperature was able to inhibit the growth of *Salmonella* during storage. The marinade only demonstrated an antimicrobial effect at the time of its application but it had a bacteriostatic effect during storage. It is recommended to perform a complete shelf life analysis.

**Key words:** Acetic acid, allicin, pathogen, spices, survival.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>18</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>19</b>
<b>6. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>20</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>23</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Formulaciones de marinados evaluados en porcentaje (%).....	3
2. Diseño de bloques completos al azar para análisis fisicoquímicos.....	4
3. Diseño de bloques completos al azar para análisis microbiológicos.....	5
4. Distribución de preferencia en grupos focales analizada con Chi cuadrado. ....	8
5. Distribución en prueba de preferencia analizada con Chi cuadrado. ....	9
6. Resultados de pH de carne de cerdo marinada y no marinada. ....	10
7. Resultados de actividad de agua ( $a_w$ ) de carne de cerdo marinada y no marinada. ....	10
8. Resultados de pérdida por cocción expresados en porcentaje (%) de carne de cerdo marinada y no marinada. ....	11
9. Sobrevivencia de <i>Salmonella</i> spp. inoculada en carne de cerdo. Resultados expresados en $\log_{10}$ UFC/g. Nivel de inóculo $3 \log_{10}$ UFC/g.....	14
10. Sobrevivencia de <i>Salmonella</i> spp. inoculada en carne de cerdo. Resultados expresados en $\log$ UFC/g. Nivel de inóculo $6 \log$ UFC/g. ....	15
Figuras	Página
1. Preparación de inóculo de <i>Salmonella</i> spp. ....	5
2. Procesamiento de muestras.....	7
Anexos	Página
1. Ejemplo de boleta de prueba de preferencia. ....	23
2. Modelo lineal general para pH. Suma de cuadrados tipo III. ....	23
3. Modelo lineal general para $a_w$ . Suma de cuadrados tipo III. ....	24
4. Modelo lineal general para pérdida por cocción. Suma de cuadrados tipo III. ....	24
5. Modelo lineal general para sobrevivencia de <i>Salmonella</i> spp. inoculada en carne de cerdo. Nivel de inóculo $3 \log$ UFC/g. Suma de cuadrados tipo III. ....	25
6. Modelo lineal general para sobrevivencia de <i>Salmonella</i> spp. inoculada en carne de cerdo. Nivel de inóculo $6 \log$ UFC/g. Suma de cuadrados tipo III. ....	25
7. Correlación de análisis fisicoquímicos.....	25
8. Correlación de análisis fisicoquímicos y sobrevivencia de <i>Salmonella</i> spp. inoculada en carne de cerdo. Nivel de inóculo $3 \log$ UFC/g. ....	26
9. Correlación de análisis fisicoquímicos y sobrevivencia de <i>Salmonella</i> spp. inoculada en carne de cerdo. Nivel de inóculo $6 \log$ UFC/g. ....	26

## 1. INTRODUCCIÓN

Mundialmente el consumo de carne ha crecido, mostrando un cambio bastante significativo de 1990 al 2009. Esto se considera debido al crecimiento poblacional y económico de los países en desarrollo, para los cuales esta etapa ha sido denominada como “transición nutricional”, donde empiezan a demandar más proteína animal. Entre los años de 1990 a 2009 el consumo de carne de cerdo creció en un 20% y se mantuvo como la carne más consumida a nivel mundial. Se especula que esto se debe a que la carne bovina tiene un precio más alto la carne de cerdo (Henchion *et al.*, 2014).

También se espera que para el 2015 la industria porcina crezca en doble de producción en comparación con 1970. Sin embargo, esto representa un gran reto para la industria de alimentos porque se estima que anualmente las enfermedades causadas por alimentos de origen animal afectan al 10% de la población mundial. Por lo anterior es necesario fortalecer los sistemas de inocuidad y vigilancia en los alimentos y a pesar que existen otros productos animales que también son fuentes de enfermedades, solo la carne de cerdo es capaz de transmitir y ser una vía para varios patógenos (Djurkovic-Djakovic *et al.*, 2013).

Particularmente, en el caso de *Salmonella* es difícil de controlar, puesto que el cerdo mismo es un reservorio del patógeno. La Comisión del Codex Alimentarius (2014) ha desarrollado una guía como propuesta para el control de *Salmonella* en las piaras de cerdo, es decir está enfocándose en la etapa previa a la cosecha. Esta acción tiene como finalidad reducir la incidencia de *Salmonella* desde etapa inicial de producción de carne de cerdo, y estas medidas también ayudan a disminuir las enfermedades e infecciones dentro de la piara.

Por otra parte, los procesadores de cerdo están trabajando constantemente en cambios en sus procesos, ya sea para extender la vida de anaquel de sus productos como para asegurar la inocuidad. Cuando se requiere demostrar el buen manejo de los productos en condiciones extraordinarias se recurre a realizar un estudio de desafío, en donde se prueban las condiciones de tiempo y temperatura para el control de los patógenos de interés en el alimento estudiado. Dentro de las fuentes de variabilidad dentro de dichos estudios se deben considerar el nivel de inóculo, las condiciones de almacenamiento, la preparación del inóculo, número de cepas, duración del estudio, entre otros (NACMCF, 2010).

Sin embargo, el 69% de la contaminación de *Salmonella* en canal es resultado de un ambiente de cosecha contaminado. Se han desarrollado varias intervenciones poscosecha para reducir el riesgo de *Salmonella* en la carne cruda (Baer *et al.*, 2013). Pero debido a

problemas tecnológicos por el uso de ácidos y al rechazo de los consumidores por el uso de agentes antimicrobianos sintéticos, la industria de alimentos está poniendo atención al uso de otro tipo de ingredientes naturales que también actúen como agentes antimicrobianos. Son utilizados principalmente por dos razones, la primera es para evitar el deterioro de los alimentos, mientras que la segunda es para prevenir y/o controlar el crecimiento microbiano, lo cual incluye a los microorganismos patógenos (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Dentro de los agentes naturales se han estudiado la actividad antimicrobiana de una gran gama de especias en diversas situaciones, sin embargo, han generado común interés el ajo, el romero y la mostaza. En el caso del ajo ha llamado ampliamente la atención a través de la historia por sus diversos efectos benéficos y actividad microbiana, la cual ha demostrado que un amplio rango de bacterias, hongos, protozoos y virus son sensibles al efecto de la alicina. La alicina es un compuesto sulfurado original del ajo capaz de alterar el potencial Redox de bacterias (Serge, 1999). En el caso del romero y la mostaza son sus aceites esenciales los que han sido estudiados ampliamente en sus efectos antimicrobianos. El compuesto de interés dentro de la mostaza es el alil isotiocianato y el compuesto en el romero es borneol (Ceylan y Fung, 2004).

Tanto las hierbas como los aceites esenciales han demostrado actividad antimicrobiana contra patógenos como *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e incluso *Staphylococcus aureus* (Tajkarimi *et al.*, 2010). En el 2009, Choi *et al.* evaluó el efecto de un tratamiento supercrítico de CO<sub>2</sub> contra *E. coli* genérica, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium y *E. coli* O157:H7 en marinados y cerdo marinado. En donde se demostró que el tratamiento aplicado puede ser útil para aumentar la inocuidad de los alimentos marinados. En otro estudio, Pathania *et al.* (2010) determinaron *in vitro* la eficacia antimicrobiana de marinados comerciales contra diferentes cepas de *Salmonella*.

Como se ha discutido previamente, *Salmonella* es uno de los patógenos con mayor incidencia a nivel mundial y de gran importancia en la industria porcina. Este estudio se enfoca en la parte poscosecha de la canal, en dónde se genere un valor agregado al producto por ser marinado, mejorando sus características sensoriales al mismo tiempo que se reducen los riesgos biológicos, generando beneficios tanto para el consumidor como para el procesador de carne porcina.

Los objetivos de este estudio fueron:

- Seleccionar una formulación de marinado preferida por los consumidores.
- Determinar las diferencias fisicoquímicas entre la carne para asar de cerdo marinada y no marinada.
- Evaluar el efecto antimicrobiano natural de un marinado para carne para asar de cerdo contra *Salmonella* spp.



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención de materia prima.** La materia prima fue provista por la Planta de Cárnicos de Zamorano. La carne de cerdo para asar fue previamente mejorada y masajeadada bajo los estándares de la planta, así como los ingredientes para el marinado se utilizaron tal como se encontraban a disposición dentro de la Planta (Cuadro 1); con clara excepción de la semilla de mostaza, la cual fue comprada en presentación de semillas pero luego fue molida en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ) en un molino Foss Tecator Cyclotec 1093. El marinado fue realizado dentro del Laboratorio de la Planta de Cárnicos de Zamorano.

**Preparación del marinado.** Las formulaciones del marinado (Cuadro 1) fueron discutidas previamente con el jefe técnico de la Planta de Cárnicos para cumplir con expectativas reales dentro de su producción. Se establecieron tres marinados con una base de ajo, sal, pimienta, vinagre y aceite, más un ingrediente alterno, ya sea romero o semilla de mostaza molida, el control no contaba con dichas especias. Los ingredientes fueron pesados y mezclados en una licuadora para crear una mezcla homogénea.

Cuadro 1. Formulaciones de marinados evaluados en porcentaje (%).

Ingrediente	%			
	M1	M2	M3	Control †
Romero molido ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	4	0	2	0
Semilla de mostaza molida ( <i>Brassica nigra</i> )	0	4	2	0
Pimienta negra molida ( <i>Piper nigrum</i> )	3	3	3	3
Sal (NaCl)	3	3	3	3
Dientes de ajo ( <i>Allium sativum</i> )	16	16	16	17
Aceite de canola ( <i>Brassica napus</i> )	21	21	21	22
Vinagre (ácido acético)	53	53	53	55

† La distribución porcentual difiere en el control, sin embargo este cambio se debe a la ausencia de romero y semilla de mostaza.

**Marinado y cocción de la carne.** El marinado fue aplicado en un 10% del peso de la carne por disposiciones internas de la planta. Se aplicó un marinado por inmersión por 30 min y las muestras fueron cocidas en un horno de aire forzado a 105 °C. Las muestras se retiraron del horno hasta que alcanzaron los 73 °C internamente (Yusop *et al.*, 2010)

**Fase I. Selección del marinado.** Los tres marinados y el control (carne marinada sin romero y sin mostaza) fueron llevados a dos grupos focales con 12 personas cada uno, en donde se discutió muestra tras muestra, los datos fueron analizados con una prueba de Chi cuadrado ( $P < 0.05$ ) y se seleccionaron las mejores muestras. Luego se realizó otro análisis de preferencia con otras 24 personas para determinar el marinado preferido por los consumidores. Y finalmente se escogió el mejor marinado también con una prueba de Chi cuadrado ( $P < 0.05$ ).

**Fase II. Análisis fisicoquímicos.** Para estos análisis se utilizó la carne marinada que fue seleccionada en la fase anterior y en este caso los controles fueron muestras no marinadas. La captación del marinado (Ecuación 1) se calculó por diferencias de peso, la ecuación usada fue establecida a partir de la metodología de Yusop *et al.* (2010). Se pesaron aproximadamente 35 g de carne y se agregó el 10% del peso de la carne en marinado y luego se tomaron los datos a los 30 min de marinado.

$$\% \text{ Captación de marinado} = \left( \frac{\text{peso carne marinada} - \text{peso carne crudo}}{\text{peso carne crudo}} \right) 100 \quad [1]$$

Para en el análisis de actividad de agua ( $a_w$ ), potencial de hidrógeno (pH) y la pérdida por cocción (Ecuación 2) se utilizó un diseño experimental de Bloques Completos al Azar (BCA) con un arreglo factorial de  $(2 \times 2)$ . Se evaluó el marinado y no marinado (control) a dos temperaturas (12 o 4 °C). En total fueron cuatro tratamientos (Cuadro 2) y fueron realizados en triplicado. A cada tratamiento se le realizaron tres lecturas a diferentes tiempos (0, 24 y 120 h).

$$\% \text{ Pérdida por cocción} = \left( \frac{\text{peso carne marinada} - \text{peso carne cocinado}}{\text{peso carne marinada}} \right) 100 \quad [2]$$

Cuadro 2. Diseño de bloques completos al azar para análisis fisicoquímicos.

Marinado	Temperatura (°C)	Tratamiento
Control (no marinada)	12	C12
	4	C4
Marinada	12	M12
	4	M4

**Fase III. Análisis microbiológicos.** Para el análisis microbiológico se utilizó un diseño experimental de Bloques Completos al Azar (BCA) con arreglo factorial  $2 \times 2 \times 2$  (Cuadro 3). Se evaluó la carne marinada y los controles (carne no marinada) a dos niveles de inóculo (3 y 6  $\log_{10}$  UFC/g) y a dos temperaturas (12 y 4 °C). En total fueron ocho tratamientos establecidos por triplicado. A cada tratamiento y control se le realizaron tres lecturas a diferentes tiempos (0, 24 y 120 h).

Cuadro 3. Diseño de bloques completos al azar para análisis microbiológicos.

Marinado	Concentración (log <sub>10</sub> UFC/ml)	Temperatura (°C)	Tratamiento
Control (no marinada)	6	12	C6T12
		4	C6T4
	3	12	C3T12
		4	C3T4
Marinada	6	12	M6T12
		4	M6T4
	3	12	M3T12
		4	M3T4

Para la preparación del inóculo (Figura 1) se trabajó con dos cepas de *Salmonella enterica* provistas por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ) y se conservaron a temperatura ambiente en tubos inclinados de Agar Soya Trypticasa (TSA). Se trabajó con una cepa de *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 14028) y una de *Salmonella* Poona (NCTC® 4840).

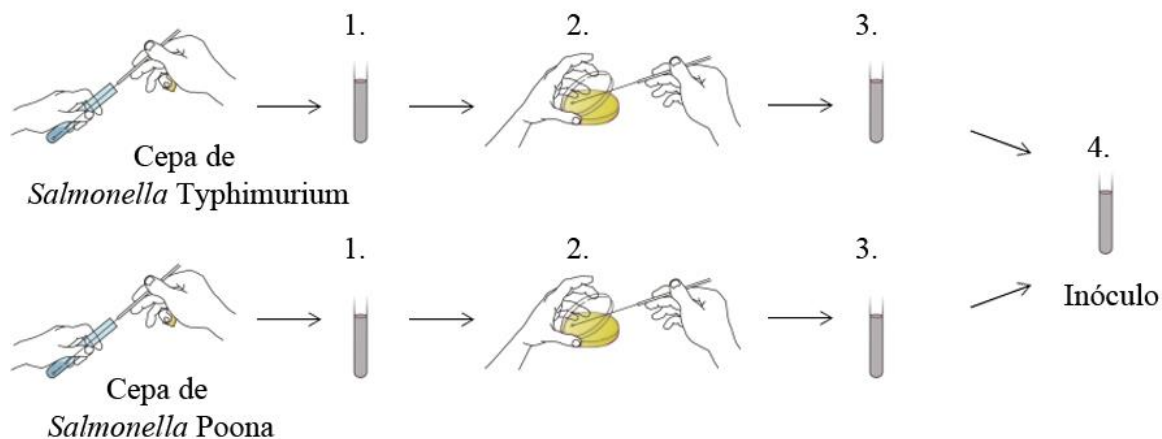


Figura 1. Preparación de inóculo de *Salmonella* spp. 1. Siembra de cepa en Caldo Soya Trypticasa. 2. Aislamiento por estrías en Agar Soya Trypticasa. 3. Siembra de colonia aislada en Caldo Soya Trypticasa. 4. Mezcla de cepas en relación 1:1 en un tubo estéril. Condiciones de incubación: 35 °C por 24 h.

Se trabajó con ambas cepas de forma simultánea y se realizó una siembra en Caldo Soya Trypticasa (TSB) y se incubó por 24 h a 35 °C. Luego se tomó una gota bicóncava del medio turbio y se realizó un aislamiento por estrías en Agar Soya Trypticasa (TSA) e incubó por 24 h a 35 °C. Después se tomó un toque de una colonia aislada y se volvió a sembrar en TSB y volvió a incubar a 35 °C por 24 h. Finalmente se realizó una mezcla

con relación 1:1 (volumen/volumen) de cada cepa, se utilizó un tubo previamente esterilizado y se prosiguió a realizar las diferentes diluciones seriales (hasta  $10^{-6}$ ) en tampón de fosfato estéril. Se realizaron siembras por superficie en Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD) de las últimas tres diluciones para verificar el nivel del inóculo creado.

Las muestras fueron procesadas como se indica en la Figura 2. Se pesaron 100 g de la carne para asar, se inoculó con 1 mL de la dilución del inóculo respectiva ( $10^0$  para  $6 \log_{10}$  UFC/g y  $10^{-3}$  para  $3 \log_{10}$  UFC/g). Se extrajeron 10 g para realizar una lectura de referencia. Luego se le agregó 9 g de marinado, lo cual corresponde al 10% del peso de la carne. Se extrajeron 10 g para una segunda lectura, siendo ésta la muestra para el tiempo de 0 h. Luego el resto de la muestra fue dividido en cuatro partes de aproximadamente 20 g cada una. Dos muestras fueron almacenadas a 4 °C y las otras dos a 12 °C. Para las lecturas de 24 y 120 h. Se realizó siembra por superficie en un medio selectivo para *Salmonella*, se usó Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD). Todas las diluciones fueron llevadas a cabo con tampón de fosfato estéril. Las muestras sembradas fueron incubadas a 35 °C por  $24 \pm 2$  h.

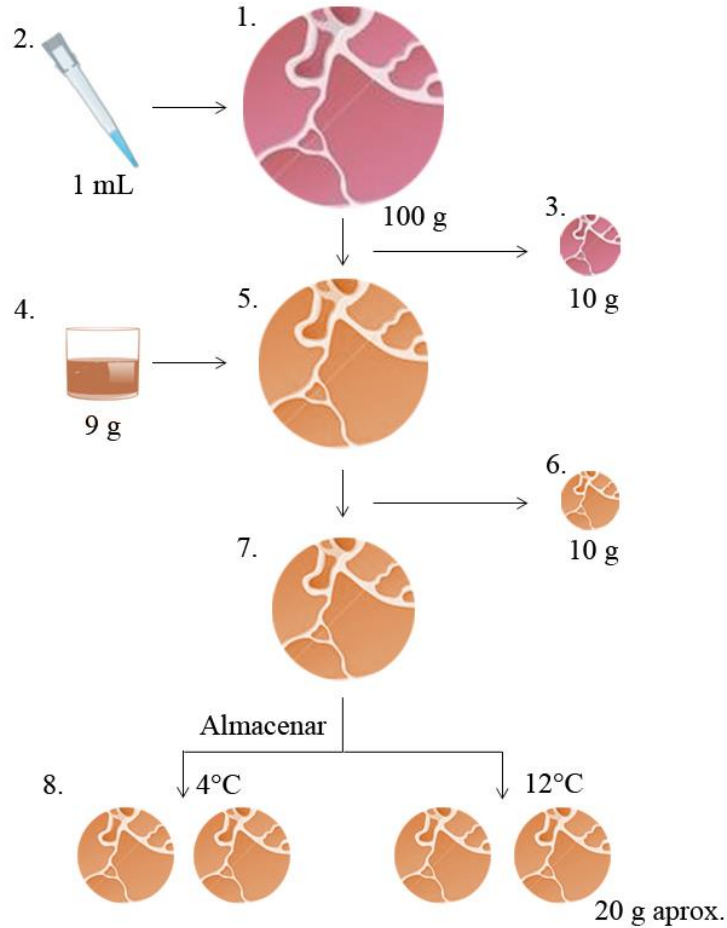


Figura 2. Procesamiento de muestras. 1. Muestra inicial. 2. Inóculo de *Salmonella* spp. Muestra referencial (sin marinar). 4. Marinado. 5. Carne marinada. 6. Muestra marinada (lectura 0 h). 7. Carne marinada para dividir. 8. Muestras a almacenar (lectura de 24 y 120 h). Controles: fueron realizados bajo el mismo proceso pero sin el marinado.

**Análisis estadístico.** Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.1.3. Tanto para el análisis microbiológico como el físicoquímico se realizó una separación de medias ajustadas (least-square means) para evaluar las interacciones de los factores evaluados. Se trabajó con el siguiente modelo lineal de la Ecuación 4 para los análisis microbiológicos y con la Ecuación 5 para los análisis físicoquímicos. Los datos en porcentaje de los físicoquímicos fueron convertidos con la función arcoseno para cumplir con la normalidad de los datos y pudieran ser analizados posteriormente por medio de un análisis de varianza.

$$\left[ \text{Log} \frac{UFC}{g} \right] = R \times M \times T \times h \times MTh \quad [4]$$

$$[aw, pH, \text{pérdida por cocción}] = R \times M \times T \times h \times MTh \times Mh \times Th \times MT \quad [5]$$

R: repetición. M: marinado. T: temperatura. h: hora.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Fase I. Selección del marinado.** En la fase de grupos focales el marinado fue seleccionado a través de una prueba de preferencia de respuesta no forzada. De acuerdo con Odesky (1967), una prueba de comparación pareada suele forzar al panelista a escoger una opción aunque en realidad no prefiera ninguna, por lo tanto la opción de “no preferencia” debería ser parte de la prueba. Para este caso se introdujo una muestra placebo (control) en la prueba en donde se descartó las especias alternas, que fueron la mostaza y el romero. Las pruebas se realizaron de esta forma porque es una formulación que no había sido probada anteriormente.

Cuadro 4. Distribución de preferencia en grupos focales analizada con Chi cuadrado.

Distribución	Muestras				Total	Valor P
	M1	M2	M3	Control		
Real	2	8	11	3	24	0.03
Esperada	6	6	6	6	24	

M1: 4% romero molido. M2: 4% semilla de mostaza molido. M3: 2% romero molido, 2% semilla de mostaza molido. Control: marinado sin ingrediente alterno, es decir sin romero o semilla de mostaza molido.

Se asumió que todas las muestras tenían la misma posibilidad de ser escogidas (Cuadro 4), por lo tanto la frecuencia esperada para cada una de las muestras es el resultado de la división del número total de respuestas del grupo focal entre el número de muestras. Y debido a que son datos no paramétricos se utilizó una prueba Chi cuadrado para validar estadísticamente la prueba ( $P < 0.05$ ). Los marinados preferidos fueron M2 y M3, sin embargo como estos datos fueron demasiado cercanos se realizó una segunda prueba Chi cuadrado solamente para estas dos muestras, en las cuales no se demostró que fuesen diferentes estadísticamente una de la otra. Por lo tanto se procedió a realizar una segunda fase, una prueba de preferencia de comparación pareada, en este caso se limitó al panelista a escoger una de las dos muestras.

Cuadro 5. Distribución en prueba de preferencia analizada con Chi cuadrado.

Distribución	Muestras		Total	Valor P
	M2	M3		
Real	17	7	24	0.04
Esperada	12	12	24	

M2: 4% semilla de mostaza molida. M3: 2% romero molido, 2% semilla de mostaza molida.

En la segunda fase se recolectaron otras veinticuatro respuestas y se analizaron de la misma forma (Cuadro 5), en este caso se obtuvo que el marinado preferido fue M2. Esto puede ser debido a que M3 contenía romero en su formulación y a pesar que es una hierba aromática muy conocida y ampliamente utilizada en México, su origen y mayor uso es en los países mediterráneos en Europa (Baizabal, 2010) y probablemente el consumidor centroamericano está poco relacionado con tal sabor y aroma. Diversos de los comentarios obtenidos de los grupos focales señalaban que a pesar que no los disgustaba el sabor del romero, seguían prefiriendo la muestra que no lo contenía. Otro punto es que varios de los panelistas comentaron en el grupo focal que no habían probado el romero antes sin embargo, sí habían escuchado de él previamente. Por lo tanto, el marinado llevado a la evaluación microbiológica fue M2, el cual contenía únicamente mostaza como especia alterna.

**Fase II. Efecto del marinado en las características fisicoquímicas.** El pH del marinado fue de  $3.24 \pm 0.01$  y la captación del marinado en 30 min fue de  $2.99 \pm 0.31\%$  en base al peso de la carne. En todos los análisis las lecturas iniciales fueron duplicadas para ambas temperaturas, por lo tanto en las 0 h no se puede encontrar diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre las dos condiciones de almacenamiento. En los resultados de esta investigación no se pudo encontrar una correlación de la pérdida por cocción con el pH y/o  $a_w$  ( $P > 0.05$ ), sin embargo, sí se encontró una correlación significativa ( $P < 0.05$ ) entre pH y  $a_w$ , la correlación fue positiva pero débil con un Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP) de 0.521.

Cuadro 6. Resultados de pH de carne de cerdo marinada y no marinada.

Tiempo (h)	4 °C		12 °C	
	Control	Marinada	Control	Marinada
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
0	6.75 ± 0.08 <sup>AaX</sup>	5.99 ± 0.18 <sup>Abx</sup>	6.75 ± 0.08 <sup>AaX</sup>	5.99 ± 0.18 <sup>Abx</sup>
24	6.30 ± 0.06 <sup>BaX</sup>	5.61 ± 0.10 <sup>Bbx</sup>	6.39 ± 0.06 <sup>BaX</sup>	5.67 ± 0.12 <sup>Bbx</sup>
120	6.40 ± 0.18 <sup>BaX</sup>	5.64 ± 0.07 <sup>Bbx</sup>	6.65 ± 0.18 <sup>AaY</sup>	4.96 ± 0.06 <sup>Cby</sup>
CV (%)	3.54	3.64	2.89	8.46

DE: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación. <sup>A-B</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre horas (P<0.05). <sup>a-b</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre control y marinado (P<0.05). <sup>X-Y</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre temperaturas para controles (P<0.05). <sup>x-y</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre temperaturas para carne marinada (P<0.05).

Para el pH la interacción entre marinado, tiempo y temperatura de almacenamiento fue significativa (P<0.05) por tanto los datos fueron desglosados como se presentan en el Cuadro 6. En las lecturas iniciales (0 h) la carne marinada resultó significativamente menor (P<0.05) que la carne control y se mantuvo esta brecha significativa (P<0.05) durante el resto del almacenamiento a ambas temperaturas. A las 24 h todas las muestras tuvieron un descenso significativo (P<0.05) en el pH. A las 120 h se encontró diferencias significativas (P<0.05) entre temperaturas, donde las muestras almacenadas a 12 °C se comportaron de forma contraria, la muestra marinada se volvió más ácida y la muestra control se tornó más básica. A las 120 h no hubo cambio significativo en las muestras almacenadas a 4 °C.

Cuadro 7. Resultados de actividad de agua (a<sub>w</sub>) de carne de cerdo marinada y no marinada.

Tiempo (h)	Control	Marinada
	Media ± DE	Media ± DE
0	0.976 ± 0.001 <sup>ax</sup>	0.946 ± 0.009 <sup>ay</sup>
24	0.972 ± 0.003 <sup>ax</sup>	0.963 ± 0.002 <sup>by</sup>
120	0.975 ± 0.001 <sup>ax</sup>	0.957 ± 0.011 <sup>by</sup>
CV (%)	0.26	1.11

DE: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación. <sup>a-b</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre horas (P<0.05). <sup>x-y</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre control y marinado (P<0.05).

Para la a<sub>w</sub> también se evaluó la interacción entre el marinado, el tiempo y la temperatura de almacenamiento, pero la interacción no fue significativa (P>0.05). Sin embargo, la interacción únicamente entre el marinado y el tiempo sí resultó ser estadísticamente



significativa ( $P < 0.05$ ) por lo tanto se, excluyó la variable de temperatura de almacenamiento para el desglose de los datos (Cuadro 7). En las lecturas iniciales (0 h) la carne marinada resultó significativamente menor ( $P < 0.05$ ) a la carne control y se mantuvo esta brecha significativa a través del tiempo ( $P < 0.05$ ). Las muestras marinadas a las 24 y 120 h fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) a las 0 h.

Cuadro 8. Resultados de pérdida por cocción expresados en porcentaje (%) de carne de cerdo marinada y no marinada.

Tiempo (h)	4 °C		12 °C	
	Control	Marinada	Control	Marinada
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
0	35.17 ± 1.13 <sup>AaX</sup>	31.36 ± 2.49 <sup>Abx</sup>	35.17 ± 1.13 <sup>AaX</sup>	31.36 ± 2.49 <sup>A bx</sup>
24	35.18 ± 0.43 <sup>AaX</sup>	35.90 ± 0.36 <sup>Bax</sup>	33.81 ± 2.25 <sup>AaX</sup>	33.03 ± 2.11 <sup>ABax</sup>
120	38.16 ± 1.53 <sup>AaX</sup>	38.92 ± 0.87 <sup>Bax</sup>	24.80 ± 2.12 <sup>BaY</sup>	35.97 ± 4.69 <sup>Bbx</sup>
CV (%)	4.92	10.04	16.48	10.47

DE: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación. <sup>A-B</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre horas ( $P < 0.05$ ). <sup>a-b</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre control y marinado ( $P < 0.05$ ). <sup>X-Y</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre temperaturas para controles ( $P < 0.05$ ). <sup>x-y</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre temperaturas para carne marinada ( $P < 0.05$ ).

Para la pérdida por cocción la interacción entre marinado, tiempo y temperatura fue significativa ( $P < 0.05$ ) por lo tanto las medias fueron desglosadas como se presentan en el Cuadro 8. En las lecturas iniciales (0 h) la carne marinada fue significativamente menor a la carne control. A las 24 h en ambas temperaturas no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las muestras marinadas y las muestras control. A las 120 h la muestra control almacenada a 12 °C fue significativamente menor ( $P < 0.05$ ) tanto entre temperaturas, tiempo y versus la carne marinada.

De acuerdo con los resultados de Sheard y Tali (2012) el pH de la carne de cerdo debería ser aproximadamente de 5.50, mientras que Lammers *et al.* (2007), nos indica que se ha generalizado un rango de pH de 5.6 y 5.9 para la carne de cerdo. La muestra sin marinar a las 0 h obtuvo un pH de 6.75 el cual está claramente fuera del rango establecido por los autores previos. Sin embargo, Lammers *et al.* (2007) también argumentan que el aumento del pH se podría atribuir a diversos factores que no fueron controlados dentro de este estudio. Por ejemplo, se puede mencionar la genética, el manejo precosecha (mal manejo del estrés) y poscosecha (mal enfriamiento de la canal), causaría una carne tipo DFD (dura, seca y oscura por sus siglas en inglés) sin embargo, las muestras no presentaron características visuales de dicha carne (OMAFRA, 2001).

También se conoce que dentro de la Planta de Cárnicos de Zamorano la carne pasa por un proceso de mejoramiento en donde se le añade una salmuera, la cual está compuesta de

NaCl, tripolifosfato de sodio y bromelina. Lo cual podría observarse en conjunto con la  $a_w$  que es ligeramente menor en la carne control en comparación a los datos de otros autores, por ejemplo Schmidt y Fontana (2008) nos indican que la  $a_w$  de la carne de cerdo oscila entre 0.990 y 0.978. Y en el estudio Sheard y Tali (2012) utilizaron una solución de NaCl y tripolifosfato de sodio, de la cual obtuvieron un pH de 7.75 y que fue capaz de incrementar significativamente el pH después de haber sido inyectado en la carne de cerdo. Por lo tanto las discrepancias en el pH y la  $a_w$  en las lecturas iniciales en comparación a la literatura pueden ser atribuidos al proceso de mejoramiento.

Por otro lado las muestras marinadas a las 0 h tuvieron un descenso significativo ( $P < 0.05$ ) tanto en su pH como la  $a_w$ , lo cual es atribuido a la captación del marinado. Nuestros resultados son comparables con los resultados de Yusop *et al.* (2010), quienes obtuvieron una captación de 2.63-2.87% a los 30 min. Si bien los resultados en este estudio pueden ser ligeramente mayores (2.99%), esto es debido a las diferencias en metodologías, donde Yusop *et al.* (2010) secaron la superficie de sus muestras antes de pesar, sin embargo esta falla no repercutió drásticamente la variación de los datos. Los cambios en pH y  $a_w$ , también se sustentan por las características intrínsecas de los ingredientes del marinado. Por ejemplo la introducción de ácido acético el vinagre sube la acidez del producto; el NaCl que sube la concentraciones de solutos en la matriz (Miller, 2006) y la pimienta negra que tiene un comportamiento higroscópico, por lo que puede absorber agua de la superficie de la muestra (Devasahayam *et al.*, 2015).

Por todas las razones anteriores se puede observar que en la pérdida por cocción la carne marinada es significativamente menor ( $P < 0.05$ ) a las 0 h, en donde se atribuye a la adición del NaCl por el marinado y no al cambio de pH porque no mostró una correlación significativa ( $P > 0.05$ ) dentro de este estudio. De acuerdo con Miller (2006) el NaCl es bastante usado en la industria cárnica por la cualidad de mejorar la capacidad de retención de agua de las proteínas sin afectar el pH. El NaCl al entrar a la matriz se divide en sus iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  los cuales son capaces de ligarse con el agua y formar esferas de hidratación o el ion  $\text{Cl}^-$  también puede ligarse a los filamentos de la proteína para incrementar la fuerza electrostática. Cuando se incrementa esta fuerza repulsiva dentro de la matriz la proteína se desdobra y se hinchan porque tienen más espacio dentro de su estructura para ligar agua.

A las 24 h todas las muestras tuvieron una disminución del pH lo cual concuerda con los resultados de Kuo *et al.* (2004), en donde sus muestras tuvieron un comportamiento similar a las de este estudio, fueron almacenadas a 25 °C. Estas tuvieron un decrecimiento de pH entre las 12 y 24 h. Y por otra parte, también almacenaron muestras a -2 °C las cuales también obtuvieron un decrecimiento pero a una velocidad menor, marcando este período entre las 12 y 36 h.

En este caso el decrecimiento del pH afectó tanto las muestras marinadas como las muestras control, por lo que se podría atribuir al glucógeno residual en la carne de cerdo. De acuerdo con Przybylski *et al.* (2006) el glucógeno en los músculos a falta de oxígeno siguen una vía anaerobia en la cual tienen como producto ácido láctico que provoca un descenso en el pH. El potencial glucolítico dependerá de la concentración de glucógeno al momento de la cosecha, sin embargo, la relación entre estas dos no es lineal. Se han

encontrado valores hasta de 78  $\mu\text{mol/g}$  de glucógeno residual, los cuales son capaces de afectar la calidad de la carne.

En apoyo a lo anterior se puede observar que la  $a_w$  en las muestras marinadas las 24 h incrementa significativamente ( $P < 0.05$ ), y también se podría relacionar con el glucógeno residual debido a que glucogenólisis libera moléculas de agua que estaban ligadas al glucógeno pero al observar el control no se obtiene la misma reacción por lo tanto esta hipótesis no es posible dentro de este estudio. (Przybylski *et al.*, 2006). Sin embargo, esta diferencia en  $a_w$  también puede ser directamente correlacionado con el pH, en donde se muestra que el ácido acético desnatura las proteínas y durante el proceso libera parte del agua que tenía ligada en la matriz (Tomaszewska-Gras y Konieczny, 2012). La desnaturación de las proteínas también se vio reflejada en la pérdida por cocción, resultando en un efecto negativo, a las 24 h la carne marinada llegó a los mismos ( $P > 0.05$ ) niveles de pérdida de cocción que los controles.

A las 120 h no se encontró un cambio significativo ( $P > 0.05$ ) en el pH de las muestras almacenadas a 4 °C. Solamente el control almacenado a los 12 °C tuvo un incremento significativo del pH ( $P < 0.05$ ) lo cuál podría ser atribuido a la fragmentación de las proteínas. De acuerdo con resultados de Kuo *et al.* (2004), se puede generar un incremento en el pH aproximadamente después de las 36 h, este cambio es posiblemente generado por la degradación de las proteínas en una temperatura mayor. Las proteínas al degradarse generan  $\text{NH}_3$  elevando el pH de las muestras, también se argumenta la posible presencia de bacterias proteolíticas que estén afectando el pH, por ejemplo *Pseudomonas*.

De acuerdo con Todar (2012) esto fue posible en la carne control debido a que el crecimiento óptimo de *Pseudomonas* es entre 6.60 y 7.00, lo cual está bastante cercano a las medias obtenidas en dicho tratamiento. Por otro lado Todar (2012) también señala que el pH mínimo para el crecimiento de *Pseudomonas* es de 5.6, por lo que se espera una inhibición en la muestra marinada al estar por oscilando por debajo de este nivel de pH.

Por el otro lado el descenso en el pH a las 120 h se atribuye a las bacterias ácido lácticas. Si bien este grupo heterogéneo de bacterias también se conoce que tienen la capacidad de desdoblar la proteína, es importante mencionar que este proceso también está condicionado por temperatura y el pH del alimento. De acuerdo con los resultados de Kaur (2013) obtuvieron la mayor actividad proteolítica con un pH de 7.0 y a los 37 °C al evaluar bacterias ácido lácticas.

**Fase III. Efecto del marinado en la sobrevivencia de *Salmonella* spp.** El nivel inicial del inóculo (1:1) fue de  $8.70 \pm 0.73 \log_{10}$  UFC/ml. La carga promedio inicial de *Salmonella* en la muestras previo a la inoculación fue de  $< 3.00 \log_{10}$  UFC. La carga promedio inicial después de la inoculación para el nivel de inóculo bajo y alto fue de  $3.97 \pm 0.00 \log_{10}$  UFC/g y  $6.82 \pm 0.12 \log_{10}$  UFC/g respectivamente. El nivel de inóculo no fue significativo ( $P > 0.05$ ) para este experimento pero dentro de los inóculos la interacción entre la temperatura de almacenamiento, el tiempo y el marinado fueron significativas ( $P < 0.05$ ). Por lo tanto se han desglosado los datos como se presentan en los Cuadros 9 y 10, y ambos inóculos tuvieron una correlación significativa ( $P < 0.05$ ) con la  $a_w$  (3 y 6  $\log_{10}$  UFC/g respectivamente  $\text{CCP} = 0.412$  y  $\text{CCP} = 0.457$ ) y el pH (3 y 6  $\log_{10}$  UFC/g

CCP=0.417 y CCP= 0.391) a pesar que todas las correlaciones fueron positivas fueron débiles.

Cuadro 9. Sobrevivencia de *Salmonella* spp. inoculada en carne de cerdo. Resultados expresados en log<sub>10</sub> UFC/g. Nivel de inóculo 3 log<sub>10</sub> UFC/g.

Tiempo (h)	4 °C		12 °C	
	Control	Marinada	Control	Marinada
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
0	3.93 ± 0.20 <sup>AaX</sup>	3.16 ± 0.15 <sup>Abx</sup>	3.93 ± 0.20 <sup>AaX</sup>	3.16 ± 0.15 <sup>Abx</sup>
24	3.81 ± 0.23 <sup>AaX</sup>	3.47 ± 0.26 <sup>Aax</sup>	3.89 ± 0.69 <sup>AaX</sup>	3.05 ± 0.33 <sup>Abx</sup>
120	3.16 ± 0.28 <sup>BaX</sup>	3.16 ± 0.28 <sup>Aax</sup>	7.17 ± 0.12 <sup>BaY</sup>	3.63 ± 0.24 <sup>Bby</sup>
CV (%)	11.42	7.92	33.50	10.49

DE: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación. <sup>A-B</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre horas (P<0.05). <sup>a-b</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre control y marinado (P<0.05). <sup>X-Y</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre temperaturas para controles (P<0.05). <sup>x-y</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre temperaturas para carne marinada (P<0.05).

En las lecturas iniciales (0 h) la carne marinada fue significativamente menor (P<0.05) comparada a las muestras control. A las 24 h no se observó un cambio significativo (P>0.05) entre las muestras almacenadas a 4 °C. La muestra marinada a 12 °C fue significativamente menor al control (P<0.05) y de igual forma fue significativamente menor (P<0.05) a la muestra marinada a 4 °C. A las 120 h tampoco se encontró diferencias significativas (P>0.05) entre las muestras almacenadas a 4 °C pero en las muestras almacenadas a 12 °C el control fue significativamente mayor (P<0.05).

Cuadro 10. Supervivencia de *Salmonella* spp. inoculada en carne de cerdo. Resultados expresados en log UFC/g. Nivel de inóculo 6 log UFC/g.

Tiempo (h)	4 °C		12 °C	
	Control	Marinada	Control	Marinada
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
0	6.80 ± 0.29 <sup>AaX</sup>	6.25 ± 0.06 <sup>Abx</sup>	6.80 ± 0.29 <sup>AaX</sup>	6.25 ± 0.06 <sup>Abx</sup>
24	6.67 ± 0.10 <sup>AaX</sup>	6.58 ± 0.19 <sup>Aax</sup>	6.92 ± 0.42 <sup>AaX</sup>	6.53 ± 0.10 <sup>Aax</sup>
120	6.32 ± 0.21 <sup>BaX</sup>	6.19 ± 0.04 <sup>Bax</sup>	8.91 ± 0.19 <sup>BaY</sup>	6.62 ± 0.34 <sup>AbY</sup>
<b>CV (%)</b>	4.31	3.24	14.10	3.76

DE: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación. <sup>A-B</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre horas (P<0.05). <sup>a-b</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre control y marinado (P<0.05). <sup>X-Y</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre temperaturas para controles (P<0.05). <sup>x-y</sup>: medias con letras distintas son significativamente diferentes entre temperaturas para carne marinada (P<0.05).

En las lecturas iniciales (0 h) la carne marinada fue significativamente menor (P<0.05) a la carne control. A las 24 h no se observó cambio significativo (P>0.05) en ninguna de las muestras. A las 120 h las muestras almacenadas a 4 °C se mantuvieron iguales (P>0.05) pero la muestra control almacenada a 12 °C fue significativamente mayor a la muestra marinada (P<0.05).

A las 0 h se observa una diferencia significativa (P<0.05) de la carga inicial entre los controles y la carne marinada en ambos niveles de inóculo. De acuerdo con Rhoades *et al.* (2013) esta diferencia podría atribuirse a que las bacterias no pudieron fijarse en la carne y pasaron al marinado, sin embargo, el marinado como tal resulta ser un ambiente hostil para *Salmonella*. Por esto se menciona un segundo supuesto en donde el efecto antimicrobiano y los cambios en las características fisicoquímicas que causan los ingredientes dentro de la carne marinada provocan la reducción de la carga inicial de *Salmonella* en la carne.

En apoyo al segundo supuesto, el efecto antimicrobiano de los ingredientes usados ha sido estudiado por varios autores. De forma general se conocen tres mecanismos de acción antimicrobiana los cuales se resumen en la ruptura física de la pared celular, disipación de la fuerza motriz de los protones y la inhibición de la actividad enzimática asociada a la membrana celular (Gyawali *et al.*, 2014). Dentro del marinado se espera un efecto antimicrobiano generado por el vinagre, el ajo, la mostaza y la pimienta. Y de acuerdo con Ceylan y Fung (2004) estos ingredientes podrían actuar de una forma sinérgica entre ellos y al combinarse con otros factores extrínsecos como la temperatura de almacenamiento.

El vinagre es el mayor componente dentro del marinado (53%) y se ha estudiado ampliamente el mecanismo acción del ácido acético (principal ácido del vinagre). Este ácido se podría catalogar dentro de la teoría antimicrobiana de los ácidos débiles, se discute que su efecto también podría estar ligado junto a otros mecanismos dado que su

eficiencia es mayor a otros ácidos. La teoría de los ácidos débiles nos indica que las moléculas de ácidos débiles asociados son más lipofílicas y son capaces de penetrar la membrana celular y se disocian dentro, por ende acidifican el citoplasma de la célula (Gurtler y Mai, 2014). La célula se dedica a controlar este cambio interno e impide su reproducción y en algunos casos incluso causa la muerte cuando sus esfuerzos de sobrevivencia son excesivos y consumen toda la energía de la célula (Adams, 2014).

Por otra parte, en el mecanismo de acción del ajo se reconoce a la alicina como su componente antimicrobiano. Este compuesto tiene varios efectos inhibidores en los sistemas enzimáticos tior dependientes, siendo alguno de estos efectos letales para las células (Ankri y Mirelman, 1999). Feldberg *et al.* (1988) estudió el efecto *in vitro* de la alicina en *Salmonella Typhimurium* midiendo su efecto en concentraciones de 0.2 a 0.5 mM, pero el efecto se catalogó más bacteriostático que bactericida. En sus estudios también plantearon que la alicina produce un daño en la pared celular y que también inhibe parcialmente el ADN y la síntesis de proteínas. También observaron que hubo una inhibición inmediata de la síntesis de ARN, por lo que su estudio sugirió que este es el principal objetivo del mecanismo de acción de la alicina.

También se han estudiado los aceites esenciales de muchas otras especias y sus efectos antimicrobianos en el ejemplo de la mostaza el mayor compuesto de su aceite esencial es el alil isotiocianato y se ha demostrado que este puede ser efectivo en contra de *Salmonella* y otras bacterias Gram negativas. Su mecanismo de acción se enfoca en la ruptura de la membrana celular y esto conlleva a la fuga de metabolitos celulares (Lin *et al.*, 2000). A pesar que Ceylan y Fung (2004) presentan que este compuesto puede ser considerado de alta actividad antimicrobiana, en realidad su comportamiento está bastante limitado por otros factores. Por ejemplo, Lin *et al.* (2000), encontraron que este compuesto es efectivo en forma gaseosa, mientras que Olaimat y Holley (2012) también encontraron un efecto contra *Salmonella* pero este era condicionado por el pH de la matriz y la temperatura de almacenamiento.

En el caso de la pimienta también se han hecho estudios del efecto antimicrobiano pero el compuesto de piperina presenta una actividad antimicrobiana débil (Ceylaan y Fung, 2004). Su mecanismo de acción también está ligado a la ruptura de la pared celular, de acuerdo con Karsha y Lakshmi (2010) se necesita una concentración de 250 ppm de piperina pura en agua destilada para visualizar un efecto antimicrobiano.

A las 24 h en el nivel de inóculo de  $3 \log_{10}$  UFC/g se observa que se mantiene una brecha significativa ( $P < 0.05$ ) entre el control y marinado, sin embargo esta muestra también resulta ser menor a la muestra almacenada a 4 °C. Por lo tanto se le atribuye este descenso a un posible estrés y mala recuperación de células al momento del muestreo. También es importante mencionar que el agar XLD no es considerado un medio favorable para rehabilitar células dañadas (Rhoades *et al.*, 2013). En ambos niveles de inóculo no se encontró diferencias entre las demás muestras, esto concuerda con los resultados de Rhoades *et al.* (2013), en donde tampoco se observó un cambio significativo a las 24 h. De acuerdo con Velugoti (2011), esto se puede deber a que *Salmonella* a temperaturas de almacenamiento de 10 y 15 °C todavía se encuentra en período de adaptación a las 24 h.

Mientras que Barayani *et al.* (2000), también argumenta que este periodo se ve prologado por la competencia con la flora natural del alimento.

A las 120 h tanto la carne marinada y la control almacenados a 4 °C resultaron ser iguales en ambos inóculos y se muestra un decrecimiento en el tiempo. Se muestra un comportamiento similar de *Salmonella* en el estudio de Pathania *et al.* (2010) la población se reduce significativamente ( $P < 0.05$ ) en los marinados muestreados al pasar las 32 h. También cabe mencionar que el pH de la carne almacenada a 4 °C no se alteró ( $P > 0.05$ ) en las muestras no inoculadas, por lo que refuerza la idea de ausencia de crecimiento microbiológico en el alimento.

Por el otro lado, los controles almacenados a 12 °C tuvieron un incremento significativo en ambos niveles de inóculo y en el nivel de inóculo de 3 log<sub>10</sub> UFC/g también se observó un aumento en la muestra marinada pero fue mucho menor. Cuando se observa el comportamiento en ambos inóculos se puede ver un mayor crecimiento en el nivel de inóculo de 3 log<sub>10</sub> UFC/g que en el nivel de inóculo de 6 log<sub>10</sub> UFC/g, a pesar que no son comparables estadísticamente este comportamiento es esperado por la variabilidad que introduce el nivel de inóculo (NACMCF, 2010).

En el caso de un nivel de inóculo alto (6 log<sub>10</sub> UFC/g) se esperaba un menor crecimiento. De acuerdo con la NACMCF (2010) los niveles se pueden comparar con lo que sucede en la etapa estacionaria, dado que una concentración alta de bacterias representaría una mayor competencia por alimento y espacio. Esto concuerda con los resultados de este estudio dado que las muestras marinadas almacenadas a 12 °C se comportaron igual a través del tiempo y la muestra control almacenada a 12 °C tuvo un menor crecimiento en contraste con el nivel de inóculo bajo (3 log<sub>10</sub> UFC/g). Rhoades *et al.* (2013) trabajó con un nivel inóculo inicial similar a 6 log<sub>10</sub> UFC/g y confirma este supuesto, dado que en su curva de crecimiento de *Salmonella* a las 120 h a 15 °C se encuentra en su fase estacionaria con una población de aproximadamente de 8.80 log<sub>10</sub> UFC/g.

En el caso del nivel de inóculo bajo representa condiciones más reales de contaminación y a la vez es comparable con la fase exponencial de la curva de crecimiento (NACMCF, 2010), lo cual concuerda con los resultados de este estudio dado a 12 °C se muestra un crecimiento en la muestra marinada en el nivel de inóculo bajo pero no en el alto. Aparte Velugoti (2011) trabajó con un nivel inóculo inicial similar a 3 log<sub>10</sub> UFC/g y reafirma este supuesto, dado que en su curva de crecimiento para *Salmonella* a 15 °C se encuentra en su fase exponencial a las 125 h, donde la población de *Salmonella* oscila entre 7.00 y 7.80 log<sub>10</sub> UFC/g.

En general, el efecto antimicrobiano solo se observó al momento de aplicar el marinado y su efecto en el tiempo resultó ser bacteriostático más no bactericida, ya que inhibió el crecimiento de *Salmonella* durante el almacenamiento pero llegó a ser letal. Este comportamiento fue bastante similar a lo encontrado por Rhoades *et al.* (2013) ya que el marinado en su estudio tampoco fue capaz de reducir la población de *Salmonella* durante el tiempo de almacenamiento y el efecto antimicrobiano se observa solo al momento de la aplicación del marinado.

## 4. CONCLUSIONES

- Los consumidores estaban poco familiarizados con el sabor del romero y a pesar que no lo rechazaron, prefirieron otros más conocidos como la mostaza.
- El marinado y sus condiciones de almacenamiento afectan las propiedades fisicoquímicas de la carne para asar de cerdo; la presencia de ácido, sal e ingredientes higroscópicos disminuye el pH y la  $a_w$ , mientras que la pérdida por cocción aumenta a través del tiempo.
- El efecto antimicrobiano se observa únicamente al momento de la aplicación del marinado y no hubo un efecto letal a través del tiempo, pero el marinado junto con las condiciones de almacenamiento inhiben el crecimiento de *Salmonella* spp. en la carne para asar de cerdo.



## **5. RECOMENDACIONES**

- Realizar evaluaciones a través del tiempo con intervalos más cortos para establecer un tiempo de marinado mínimo, óptimo y máximo.
- Realizar un estudio completo de vida de anaquel de la carne marinada, evaluando otros parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales.

## 6. LITERATURA CITADA

Adams, M. 2014. Food Safety Management: Acids and fermentation. Elsevier. p 467–479.

Ankri, S., D. Mirelman. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection* 2:125-129.

Baer, A., M. Miller, A. Dilger. 2013. Pathogens of Interest to the Pork Industry: A Review of Research on Interventions to Assure Food Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12: 183-217.

Baizabal, R. 2010. Evaluación de la capacidad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial y del polvo de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) en queso fresco de vaca. Tesis Ing. Puebla, México. Univesidad de las Américas Puebla.

Barayani, J., R. Bovill, J. Bew, N. Cook. M. D'Agostino, N. Wilkinson. 2000. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology* 59: 157–165.

Ceylan, E., D. Fung. 2004. Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 12: 1-55.

Choi, Y., Y. Bae, K. Kim, B. Kim, M. Rhee. 2009. Effects of supercritical carbon dioxide treatment against generic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *E. coli* O157:H7 in marinades and marinated pork. *Meat Science* 82: 419–424.

Comisión del Codex Alimentarius. 2014. Prevención y control de *Salmonella* en las piaras de cerdos. Consultado el 2 de julio de 2015. Disponible en: [ftp://ftp.fao.org/CODEX/Meetings/CCFH/ccfh46/CRDs/FH46\\_CRD07s.pdf](ftp://ftp.fao.org/CODEX/Meetings/CCFH/ccfh46/CRDs/FH46_CRD07s.pdf)

Devasahayam, S., J. Zachariaiah, E. Jayashree, K. Kandiannan, D. Prasath, S. Eapen, B. Sasikumar, V. Srinivasan, R. Suseela Bhai. 2015. Black Pepper. ICAR-Indian Institute of Spices Research. Consultado el 12 de octubre de 2015. Disponible en: <http://www.spices.res.in/pdf/package/pepper.pdf>

Djurkovic-Djakovic, O., B. Bobic, A. Nikolic, I. Klun, J. Dupouy-Camet. 2013. Pork as a source of human parasitic infection. *Clinical Microbiology and Infection* 19: 586–594.

Feldberg, R., S. Chang, A. Kotik, M. Nadler, Z. Neuwirth, D. Sundstrom, N. Thompson. 1988. In Vitro Mechanism of Inhibition of Bacterial Cell Growth by Allicin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 32: 1763-1768.

Gurtler, J., T. Mai. 2014. *Traditional Preservatives: Organic Acids*. Elsevier. p 1729-1737.

Gyawali, R., S. Hayek, S. Ibrahim. 2014. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Elsevier. p 53.

Henchion, M., M. McCarthy, V. Resconi, D. Troy. 2014. Meat consumption: Trends and quality matters. *Meat Science* 98: 561–568.  
<http://learningstore.uwex.edu/assets/pdfs/B3474.pdf>

Karsha, P., O. Lakshmi. 2010. Antimicrobial activity of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) with especial reference to its mode of action on bacteria. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 1: 213-215.

Kaur, N. 2013. *Proteolytic Profile of Lactic Acid Bacteria*. Tesis M.Sc. Patiala, India. Thapar University. 83 p.

Kuo, H., M. Chen, D. Liu, L. Lin. 2004. Relationship between Thermal Properties of Muscle Proteins and Pork Quality. Consultado el 12 de octubre de 2015. Disponible en: [http://www.ajas.info/upload/pdf/18\\_67.pdf](http://www.ajas.info/upload/pdf/18_67.pdf)

Lammers, P., D. Stender, M. Honeyman. 2007. *Niche Pork Production*. Consultado el 12 de octubre de 2015. Disponible en: <http://www.ipic.iastate.edu/publications/610.PorkQuality.pdf>

Lin, C., J. Preston, C. Wei. 2000. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. *Journal of Food Protection* 63:27-34.

Miller, R. 2006. *Functionality of Non-Meat Ingredients Used In Enhanced Pork*. Consultado el 13 de octubre de 2015. Disponible en: <http://old.pork.org/filelibrary/factsheets/pigfactsheets/newfactsheets/12-05-02g.pdf>

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). 2010. Parameters for Determining Inoculated Pack/Challenge Study Protocols. *Journal of Food Protection* 73: 140–202.

Odesky, S. 1967. Handling the Neutral Vote in Paired Comparison Product Testing. *Journal of Marketing Research* 4: 199-201

Olaimat, A., R. Holley. 2012. Effects of changes in pH and temperature on the inhibition of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* by Allyl isothiocyanate. *Food Control* 34: 414-419.

Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (OMAFRA). 2001. Meat pH and Pork Quality (en línea). Consultado el 12 de octubre de 2015. Disponible en: [http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/swine/facts/info\\_qs\\_meatph.htm](http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/swine/facts/info_qs_meatph.htm)

Pathania, A., S. McKee, S. Bilgili, M. Singh. 2010. Antimicrobial activity of commercial marinades against multiple strains of *Salmonella* spp. *International Journal of Food Microbiology* 139:214–217.

Przybylski, W., G. Monin, M. Kocwin, E. Krzecio. 2006. Glycogen metabolism in muscle and its effects on meat quality in pigs – a mini review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 15/56:257-262.

Rhoades, J., C. Kargiotou, E. Katsanidis, K. Koutsoumanis. 2013. Use of marination for controlling *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in raw beef. *Food Microbiology* 36: 248-253.

Schmidt, S., A. Fontana. 2008. *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Appendix E: Water Activity Values of Select Food Ingredients and Products. 14 p.  
Serge, D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection* 2:125-129.

Sheard, P., A. Tali. 2012. Injection of salt, tripolyphosphate and bicarbonate marinade solutions to improve the yield and tenderness of cooked pork loin. *Meat Science* 68: 305–311.

Tajkarimi, M., S. Ibrahim, D. Cliver. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21:1199-1218.

Todar, K. 2012. *Nutrition and Growth of Bacteria* (en línea). Consultado el 24 de octubre de 2015. Disponible en: [http://textbookofbacteriology.net/nutgro\\_4.html](http://textbookofbacteriology.net/nutgro_4.html)

Tomaszewska-Gras, J., P. Konieczny. 2012. Effect of Marination on the Thermodynamic Properties of Chicken Muscle Proteins Studied by DSC. *Czech Journal of Food Science* 30: 302-308.

Velugoti, P., L. Bohra, V. Juneja, L. Huang, A. Wessenling, J. Subbiah, H. Thippareddi. 2011. Dynamic model for predicting growth of *Salmonella* spp. in ground sterile pork. *Food Microbiology* 28: 796-803.

Yusop, S., M. O’Sullivan, J.F. Kerry, J.P. Kerry. 2010. Effect of marinating time and low pH on marinade performance and sensory acceptability of poultry meat. *Meat Science* 85:657–663.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1. Ejemplo de boleta de prueba de preferencia.

Fecha: \_\_\_\_\_

Delante de usted se presentan dos muestras de carne para asar de cerdo, por favor pruebe cada una de ellas empezando de izquierda a derecha. Y circule la muestra el código de su muestra favorita. Por favor limpiar su paladar con un sorbo de agua y galleta soda ente muestra y muestra.

**270** **132**

Comentarios:

### Anexo 2. Modelo lineal general para pH. Suma de cuadrados tipo III.

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
HORA	2	1.4292722	0.71463611	56.03	<.0001
MC	1	7.2271361	7.22713611	566.64	<.0001
TEMP	1	0.0200694	0.02006944	1.57	0.223
REP	2	0.0715389	0.03576944	2.8	0.082
HORA*MC*TEMP	2	0.4159056	0.20795278	16.3	<.0001
HORA*MC	2	0.4875389	0.24376944	19.11	<.0001
HORA*TEMP	2	0.1376389	0.06881944	5.4	0.012
MC*TEMP	1	0.2288028	0.22880278	17.94	3E-04

Source: fuente de variabilidad. DF: Grados de libertad. Type III SS: Suma de cuadrados tipo III. F Value: valor F. MC: Marinado o Control. TEMP: Temperatura de almacenamiento. REP: repetición.

**Anexo 3.** Modelo lineal general para  $a_w$ . Suma de cuadrados tipo III.

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Type III SS</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>Pr &gt; F</b>
HORA	2	0.0002804	0.00014019	3.27	0.057
MC	1	0.0031923	0.00319225	74.51	<.0001
TEMP	1	1.36E-06	0.00000136	0.03	0.86
REP	2	7.2E-07	0.00000036	0.01	0.992
HORA*MC*TEMP	2	4.506E-05	0.00002253	0.53	0.598
HORA*MC	2	0.0006635	0.00033175	7.74	0.003
HORA*TEMP	2	7.772E-05	0.00003886	0.91	0.418
MC*TEMP	1	1.003E-05	0.00001003	0.23	0.633

Source: fuente de variabilidad. DF: Grados de libertad. Type III SS: Suma de cuadrados tipo III. F Value: valor F. MC: Marinado o Control. TEMP: Temperatura de almacenamiento. REP: repetición.

**Anexo 4.** Modelo lineal general para pérdida por cocción. Suma de cuadrados tipo III.

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Type III SS</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>Pr &gt; F</b>
HORA	2	0.0011704	0.0005852	1.18	0.325
MC	1	0.0004507	0.00045066	0.91	0.35
TEMP	1	0.0105795	0.01057954	21.37	1E-04
REP	2	1.94E-06	0.00000097	0	0.998
HORA*MC*TEMP	2	0.006316	0.00315798	6.38	0.007
HORA*MC	2	0.0145775	0.00728875	14.72	<.0001
HORA*TEMP	2	0.0107399	0.00536994	10.85	5E-04
MC*TEMP	1	0.0019897	0.00198968	4.02	0.057

Source: fuente de variabilidad. DF: Grados de libertad. Type III SS: Suma de cuadrados tipo III. F Value: valor F. MC: Marinado o Control. TEMP: Temperatura de almacenamiento. REP: repetición.

**Anexo 5.** Modelo lineal general para sobrevivencia de *Salmonella* spp. inoculada en carne de cerdo. Nivel de inóculo 3 log UFC/g. Suma de cuadrados tipo III.

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
HORA	2	1.49977999	0.74988999	13.96	0.0001
MC	1	3.92486808	3.92486808	73.07	<.0001
TEMP	1	2.58777676	2.58777676	48.18	<.0001
REP	2	0.03386604	0.01693302	0.32	0.7328
HORA*MC*TEMP	7	9.31093836	1.33013405	24.76	<.0001

Source: fuente de variabilidad. DF: Grados de libertad. Type III SS: Suma de cuadrados tipo III. F Value: valor F. MC: Marinado o Control. TEMP: Temperatura de almacenamiento. REP: repetición. NIVEL: nivel de inóculo.

**Anexo 6.** Modelo lineal general para sobrevivencia de *Salmonella* spp. inoculada en carne de cerdo. Nivel de inóculo 6 log UFC/g. Suma de cuadrados tipo III.

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
HORA	2	1.49977999	0.74988999	13.96	0.0001
MC	1	3.92486808	3.92486808	73.07	<.0001
TEMP	1	2.58777676	2.58777676	48.18	<.0001
REP	2	0.03386604	0.01693302	0.32	0.7328
HORA*MC*TEMP	7	9.31093836	1.33013405	24.76	<.0001

Source: fuente de variabilidad. DF: Grados de libertad. Type III SS: Suma de cuadrados tipo III. F Value: valor F. MC: Marinado o Control. TEMP: Temperatura de almacenamiento. BLK: repetición. NIVEL: nivel de inóculo.

**Anexo 7.** Correlación de análisis fisicoquímicos.

Variable	$a_w$	pH	Pérdida
$a_w$	1.000	0.521	-0.008
		0.001	0.965
pH	0.521	1.000	-0.218
	0.001		0.201
Pérdida	-0.008	-0.218	1.000
	0.965	0.201	

Coefficiente de correlación de Pearson (arriba)/ Pr > r (abajo). Pérdida: pérdida por cocción.

**Anexo 8.** Correlación de análisis fisicoquímicos y sobrevivencia de *Salmonella* spp. inoculada en carne de cerdo. Nivel de inóculo 3 log UFC/g.

<b>Variable</b>	<b>log<sub>10</sub></b>	<b>a<sub>w</sub></b>	<b>pH</b>
<b>log<sub>10</sub></b>	1.000	0.412	0.417
		0.012	0.011
<b>a<sub>w</sub></b>	0.412	1.000	0.521
	0.012		0.001
<b>pH</b>	0.417	0.521	1.000
	0.011	0.001	

Coefficiente de correlación de Pearson (arriba)/ Pr > r (abajo). log<sub>10</sub>: sobrevivencia de *Salmonella* spp.

**Anexo 9.** Correlación de análisis fisicoquímicos y sobrevivencia de *Salmonella* spp. inoculada en carne de cerdo. Nivel de inóculo 6 log UFC/g.

<b>Variable</b>	<b>log<sub>10</sub></b>	<b>a<sub>w</sub></b>	<b>pH</b>
<b>log<sub>10</sub></b>	1.000	0.457	0.391
		0.005	0.018
<b>a<sub>w</sub></b>	0.457	1.000	0.521
	0.005		0.001
<b>pH</b>	0.391	0.521	1.000
	0.018	0.001	

Coefficiente de correlación de Pearson (arriba)/ Pr > r (abajo). log<sub>10</sub>: sobrevivencia de *Salmonella* spp.