



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**PREDICCIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE *Listeria*
monocytogenes EN CHORIZO DE CERDO EN FUNCIÓN DEL PH
DEL PRODUCTO Y LA TEMPERATURA DE
ALMACENAMIENTO**

Por:

Mario Alberto Gutiérrez Chocoza

TESIS APROBADA POR LA

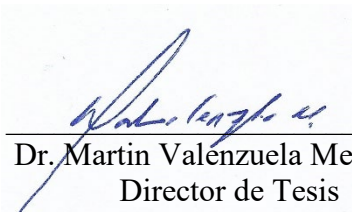
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

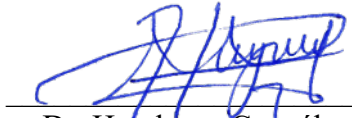
MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Mario Alberto Gutiérrez Chocoza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias



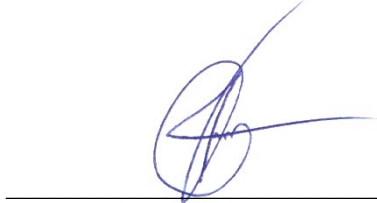
Dr. Martin Valenzuela Melendres
Director de Tesis



Dr. Humberto González Ríos
Integrante del comité de tesis



Dr. Alfonso García Galaz
Integrante del comité de tesis



Dr. Julio César López Romero
Integrante del comité de tesis

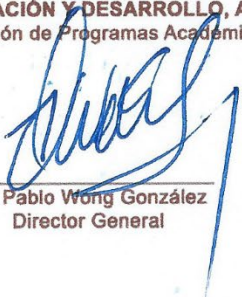
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Predicción de la Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en Chorizo de Cerdo en Función del pH del Producto y la Temperatura de Almacenamiento” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, Mario Alberto Gutiérrez Chocoza, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de los estudios de Maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C), por permitirme formar parte del programa de posgrado y ayudar a aumentar mi formación académica con la realización de esta Tesis de Maestría.

Al Dr. Pablo Wong González, por haberme dado la oportunidad de ingresar a este posgrado en CIAD y ayudar a mi superación profesional y académica.

A la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA), por darme la oportunidad de trabajar en esta área de investigación y el uso de sus instalaciones, así como el apoyo académico e institucional brindado a lo largo de estos dos años.

A mi Director de Tesis, el Dr. Martín Valenzuela Melendres por permitirme formar parte de su equipo de investigación, por su contribución a la realización del trabajo y su apoyo en todo momento. Gracias por los conocimientos compartidos y por permitirme aprender de usted.

A los miembros de mi comité de tesis, Dr. Juan Pedro Camou Arriola (†), Dr. Humberto González Ríos, Dr. Alfonso García Galaz y Dr. Julio Cesar López Romero, por su apoyo a lo largo de toda la tesis, por el tiempo dedicado y contribuciones a este trabajo de investigación. Gracias a todos por su apoyo académico, su asesoría, dedicación y sus consejos oportunos para que este trabajo se realizara.

A la Q.B. Thalia Y. Islava Lagarda, por su amabilidad y su apoyo en el laboratorio. Al I.Q. Germán Cumplido Barbeitia, por sus comentarios y la ayuda técnica que fueron muy valiosos para mi formación académica y la culminación de este proyecto.

Al resto de los miembros de la CTAOA, la Dra. Aída Peña, por su apoyo y a la Dra. Susana María Sheuren Acevedo, por su apoyo y por el uso del laboratorio de microbiología. A mis compañeros del Laboratorio, CDC. Anna Báez, CDC Julio González, gracias por sus consejos y su apoyo.

Al Dr. Juan Pedro Camou Arriola (†), y Ana Laura Flores Saucedo (†), que a pesar que no se encuentran con nosotros forman parte de esta etapa, gracias por los consejos y por el tiempo que compartimos, un abrazo al cielo.

A mis amigos Nallely, Cynthia y Alejandro, por haber compartido esta etapa desde el inicio y salir

adelante juntos y por siempre apoyarnos mutuamente en todo momento tanto en lo académico como en lo personal, muchísimas gracias.

A mi familia, mi mamá, mi hermana, mi tía y a mi abuelo, por impulsarme a conquistar nuevas metas y apoyarme siempre en mis decisiones, siendo una parte importante para mí.

A mi novia, por estar en los buenos y malos momentos, por apoyarme a seguir adelante, muchas gracias.

Al resto de mis amistades que a lo largo de los años han contribuido a mi formación personal, siempre brindándome palabras de apoyo para continuar adelante con mis estudios o en cualquier aspecto que me proponga. ¡GRACIAS!

DEDICATORIA

A mi madre, por todo su cariño y motivación para ser mejor cada día y apoyarme en todos mis propósitos

A mi hermana, por su interés, comprensión y motivación a seguir adelante

A mi tía, que gracias a ella entre a la maestría y su preocupación por continuar mis estudios

A mi abuelo, que siempre me motivó a estudiar y superarme

A mi novia, que me apoyó en todo momento y por sus palabras cálidas

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACION INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
LISTADO DE FIGURAS	9
LISTADO DE CUADROS	10
LISTADO DE ECUACIONES	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCION	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Impacto de Enfermedades Transmitidas por Alimentos en la Salud	16
2.1.1. Bacterias Implicadas en las Enfermedades Transmitidas por Alimentos	17
2.2. Microbiología de la Carne y Productos Cárnicos	18
2.3. Relevancia de la Inocuidad de la Carne y Productos Cárnicos	19
2.3.1. Relación de la Contaminación Cruzada Durante el Procesamiento de Carne y Productos Cárnicos	20
2.4. Producción de Carne de Cerdo en México	21
2.4.1. Productos de Cerdo Típicos de México	21
2.4.2. Elaboración de Chorizo de Cerdo en México	22
2.5. <i>Listeria monocytogenes</i> . Generalidades e Impacto a la Salud	22
2.5.1. Curva de Crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	23
2.5.2. Resistencia Antimicrobiana de <i>Listeria monocytogenes</i>	24
2.6. Uso de Antimicrobianos en la Producción de Cárnicos	26
2.6.1. Incorporación de Ingredientes con Características Antimicrobianas	27
2.6.2. Uso de Ácido Acético en Productos Cárnicos	28
2.7. Efecto de la Temperatura sobre el Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	29
2.8. Microbiología Predictiva	30
3. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVOS	35
4.1. Objetivo General	35
4.2. Objetivos Específicos	35
5. MATERIALES Y METODOS	36
5.1. Diseño Experimental	36
5.2. Cepa Bacteriana y Preparación del Inóculo	36
5.3. Preparación e Inoculación de Chorizo de Cerdo	38

CONTENIDO (continuación)

5.4. Enumeración de Bacterias Supervivientes	38
5.5. Ajuste de las Curvas de Supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	39
5.6. Análisis Estadístico	40
6. RESULTADOS Y DISCUSION	41
6.3. Importancia de los Modelos de Regresión	52
6.4. Optimización de las Condiciones de Temperatura y pH para Disminuir el Crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	52
7. CONCLUSIÓN	54
8. RECOMENDACIONES	55
9. REFERENCIAS.....	56

LISTADO DE FIGURAS

Figura		Página
1	Nivel de PH en chorizo de cerdo añadido con diferente porcentaje de vinagre.	41
2	Relación entre el pH y el color del chorizo de cerdo.....	43
3	Ajuste de los datos experimentales de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en chorizo de cerdo almacenado a A) 5 °C y B) 30 °C, usando el modelo de Gompertz modificado para estimar la fase lag, el tiempo de generación y la velocidad de crecimiento exponencial.....	45
4	Ajuste de los datos experimentales de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en chorizo de cerdo formulado a pH de A) 4.5 y de B) 6.5, usando el modelo de Gompertz modificado para estimar la fase lag, el tiempo de generación y la velocidad de crecimiento exponencial.....	46
5	Relación entre los valores experimentales y predichos por el modelo para A) fase lag, B) tiempo de generación y C) velocidad de crecimiento exponencial de <i>L. monocytogenes</i> en chorizo de cerdo.....	49
6	Gráficas de superficie de respuesta de la interacción temperatura y pH para A) fase lag, B) velocidad de crecimiento exponencial y, C) tiempo de generación de <i>L. monocytogenes</i> en chorizo de cerdo.....	51

LISTADO DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Valores codificados y experimentales en el DCC, para el estudio de los factores pH y temperatura en chorizo de cerdo.....	37
2	Valores experimentales y valores predichos por los modelos de regresión para la fase lag, velocidad de crecimiento exponencial y tiempo de generación de <i>Listeria monocytogenes</i> en chorizo de cerdo.....	47
3	Coeficiente de regresión estimados y análisis de varianza de los modelos de regresión para la fase lag, velocidad de crecimiento exponencial y tiempo de generación de <i>Listeria monocytogenes</i> en chorizo de cerdo.....	48

LISTADO DE ECUACIONES

Ecuación	Página
1 El modelo McKellar	31
2 El modelo de Buchanan	31
3 El modelo de Hills	32
4 El modelo de Hills	32
5 Ecuación modificada de Gompertz	32
6 El modelo de Ratkowsky	33
7 Velocidad de crecimiento exponencial	39
8 Tiempo de generación	39
9 Duración de la Fase lag	39
10 Metodología de superficie de respuesta	40
11 Ecuación de superficie de respuesta para Fase lag	53
12 Ecuación de superficie de respuesta para Tiempo de generación.....	53
13 Ecuación de superficie de respuesta para Velocidad de crecimiento exponencial.....	53

RESUMEN

La elaboración del chorizo es principalmente de forma artesanal, preparado a temperatura ambiente y su almacenamiento sujeto a variaciones de temperatura. Por su preparación artesanal, el tipo y cantidad de los ingredientes pueden variar, como el vinagre que se utiliza para realzar los sabores y para controlar el crecimiento de microorganismos. *Listeria monocytogenes* es uno de los patógenos que podría estar presente en el chorizo, lo más destacable de esta bacteria es su gran resistencia a condiciones extremas del medio como pH y temperatura. Los métodos tradicionales para la detección de patógenos consumen tiempo, dinero y esfuerzo; por lo tanto, el uso de estrategias como la microbiología predictiva puede ser efectivo para cuantificar los riesgos de crecimiento de patógenos al variar las condiciones del medio. En este trabajo se estudiaron condiciones de abuso de temperatura (5-30 °C) y pH (4.5-6.5) del producto para modelar el tiempo de generación (TG), velocidad de crecimiento exponencial (VCE) y duración de la fase lag (FL) de *L. monocytogenes*, haciendo uso de la metodología de superficie de respuesta. Se realizaron inoculaciones del patógeno en muestras de chorizo de cerdo siguiendo un diseño central compuesto. Para cada variable estudiada se obtuvieron modelos predictivos que fueron significativos ($p < 0.05$), no tuvieron falta de ajuste ($p > 0.05$) y presentaron un $R^2 > 0.94$. Estos criterios indican que los modelos describen satisfactoriamente los datos experimentales y pueden ser utilizados para estimar la FL, TG y VCE de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo en función del pH y temperatura de almacenamiento dentro de los límites estudiados. El factor de mayor efecto sobre cada variable estudiada fue la temperatura, seguido del pH; además, se encontró un efecto de interacción entre los factores donde a baja temperatura el efecto del pH fue más evidente. Las condiciones óptimas de pH y temperatura que maximizan la FL y TG, y minimizan la VCE fueron: pH = 4.79 y temperatura = 8.66 °C. Bajo estas condiciones, se predijo una FL = 142 h, un TG = 22.3 h y una VCE = 0.0135 Log (UFC/mL)/h. Los modelos generados en el presente estudio pueden ser utilizados por productores de chorizo de cerdo para predecir el riesgo potencial de crecimiento de *L. monocytogenes* al variar las condiciones de pH en el producto y abuso de temperatura dentro de los límites establecidos en este trabajo.

Palabras clave: chorizo de cerdo, *L. monocytogenes*, microbiología predictiva, metodología de superficie de respuesta

ABSTRACT

The chorizo is mainly made by hand, prepared at room temperature, and its storage is subject to temperature variations. Due to its artisan preparation, the type and quantity of ingredients can vary, such as the vinegar that is used to enhance the flavors and to control the growth of microorganisms. *Listeria monocytogenes* is one of the pathogens that could be present in chorizo, the most remarkable thing about this bacterium is its great resistance to extreme environmental conditions such as pH and temperature. Traditional pathogen detection methods consume time, money, and effort; therefore, the use of strategies such as predictive microbiology can be effective to quantify the risks of pathogen growth when the conditions of the environment variables. In this work, conditions of abuse of temperature (5-30 °C) and pH (4.5-6.5) of the product were studied to model the generation time (GT), exponential growth rate (EGR), and duration of the lag phase of *L. monocytogenes*, using the response surface methodology. Inoculations of the pathogen were carried out in samples of pork sausage following a central compound design. For each variable studied, predictive models were obtained that were significant ($p < 0.05$), had no lack of adjustment ($p > 0.05$), and presented an $R^2 > 0.94$. These criteria indicate that the models satisfactorily describe the experimental data and can be used to estimate the phase lag, GT, and EGR of *L. monocytogenes* in pork chorizo as a function of pH and storage temperature within the studied limits. The factor with the greatest effect on each variable studied was temperature, followed by pH; Furthermore, an interaction effect was found between the factors where at low temperature the effect of pH was more evident. The optimal pH and temperature conditions that maximize phase lag and GT, and minimize EGR were: pH = 4.79 and temperature = 8.66 °C. Under these conditions, phase lag = 142 h, GT = 22.3 h, and EGR = 0.0135 Log (CFU/mL)/h were predicted. The models generated in this study can be used by pork sausage producers to predict the potential risk of growth of *L. monocytogenes* by varying the pH conditions in the product and abuse of temperature within the limits established in this work.

Key words: pork chorizo, *L. monocytogenes*, predictive microbiology, response surface methodology

1. INTRODUCCION

La carne de cerdo es uno de los alimentos más importantes en la cocina mexicana, con un consumo *per cápita* de 19 kg durante 2019, ocupando el octavo lugar a nivel mundial de consumo de carne de cerdo (COMECARNE, 2019). La carne de cerdo por sus características intrínsecas es propensa a contaminación por microorganismos patógenos pudiendo representar un riesgo importante de enfermedades transmitidas por los alimentos. Solo en los Estados Unidos, el consumo de carne de cerdo contaminada es responsable de más de 525,000 infecciones, 2,900 hospitalizaciones y 82 muertes al año (Self *et al.*, 2017). Los patógenos encontrados en la carne y de interés en salud pública incluyen a *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *L. monocytogenes* (Baer *et al.*, 2013). *L. monocytogenes* es un microorganismo Gram positivo, no esporulado, anaerobio facultativo, con capacidad de proliferar a temperaturas que oscilan entre 1 y 45 °C, en rangos de pH de 4.4 a 9.6 y actividad de agua tan baja como 0.9 (Lianou *et al.*, 2017). *L. monocytogenes* causa una enfermedad llamada listeriosis con una tasa de mortalidad entre 20-30%, afectando principalmente a mujeres embarazadas, recién nacidos, adultos mayores y personas inmunodeprimidas (Jordan *et al.*, 2018).

La prevalencia de *L. monocytogenes* en carne de cerdo es frecuente. Figueroa-López *et al.* (2019), reportaron una incidencia de *L. monocytogenes* del 15.9% en muestras obtenidas en rastros Tipo Inspección Federal del Estado de Sonora, México. Por su parte, Gutiérrez *et al.* (2020), reportaron una prevalencia de este patógeno en el 33.3% de las muestras recolectadas en supermercados de la Ciudad de México. Lo anterior, demuestra que la utilización de carne de cerdo bajo estas condiciones podría representar un riesgo al momento de su consumo.

La carne de cerdo es una de las principales materias primas para la elaboración de muchos productos típicos mexicanos como el chorizo. El chorizo en México es un embutido muy popular elaborado con distintas fuentes cárnicas, pero principalmente con carne de cerdo (70-80%) y grasa dorsal (15-20%), color rojo característico, sazonado con especias, sal, orégano en polvo y vinagre (Velasco *et al.*, 2014). A diferencia de los chorizos españoles, no se utilizan cultivos iniciadores para acidificar el producto que controla el crecimiento de patógenos; en su lugar se adiciona vinagre o se deja reposar para que la microbiota autóctona prolifere y disminuya el pH. Debido a su bajo costo y fácil preparación, es frecuente que el producto se elabore en casa o en pequeños

comercios que lo distribuyen en mercados mayores. Por su preparación artesanal, este producto está sujeto a una gran diversidad de recetas con variaciones importantes en los ingredientes, principalmente el vinagre asociado al control del pH. Su preparación a temperatura ambiente, falta de higiene y deficiencias en los sistemas de refrigeración a través de la cadena de suministro son otros factores que comprometen la inocuidad del producto (Sánchez *et al.*, 2019). Aunque el chorizo está destinado a ser consumido una vez que es cocinado, los ingredientes que contiene pueden impartirle una apariencia de cocinado cuando no lo está, representando un riesgo para quien lo consume.

Determinar los riesgos microbiológicos de un alimento debido a variaciones ambientales implica inversión de tiempo, dinero y esfuerzo si se utilizan los métodos de cuantificación de bacterias tradicionales. La microbiología predictiva es una herramienta matemática muy utilizada para determinar los riesgos de crecimiento de microorganismos ante variaciones temperatura, pH, concentración de sal, entre otros (Ross *et al.*, 1994). Por ejemplo, en una investigación realizada por López-Pino *et al.* (2020), utilizaron la metodología de superficie de respuesta para determinar los efectos e interacciones de temperatura, carvacrol y grasa sobre *E. coli* O157: H7 en carne molida de res. Encontraron que la temperatura fue el principal factor de inactivación y la grasa mostró un efecto protector sobre el patógeno. Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue generar y validar un modelo de predicción para estimar la supervivencia de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo en función del pH del alimento y abuso en la temperatura de almacenamiento.

2. ANTECEDENTES

2.1 Impacto de Enfermedades Transmitidas por Alimentos en la Salud

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se han convertido en uno de los principales problemas de salud pública, ya que son causantes de una gran variedad de enfermedades infecciosas e intoxicaciones, con una gran tasa de morbilidad y mortalidad. Estas son originadas por una ingesta de alimentos contaminados con microorganismos patógenos, como pueden ser bacterias, virus, hongos o parásitos. Logrando afectar a diferentes grupos poblacionales de bajos recursos, niños, mujeres embarazadas, adultos mayores o personas inmunocomprometidas, lo que implica una pérdida económica y gastos en los sistemas de salud (Forero *et al.*, 2017).

En países industrializados las ETA forman parte importante de las causas de morbilidad y mortalidad, siendo que entre un 5 a 10% de la población sufre por lo menos un caso de estas enfermedades. Debido al uso de estándares en la calidad de los alimentos los brotes por el consumo de alimentos contaminados han disminuido, aun así, según la OMS, 1.8 millones de personas por año fallecen debido a la ingesta de alimentos contaminados (Benítez *et al.*, 2019).

En 2016 sucedió un brote de infecciones por el consumo de carne asada de cerdo en España donde se reportaron 112 casos, de los cuales la edad media era de 36 años, el cuadro clínico que se presentó fue diarrea en el 98% de los casos, fiebre severa en 61%, vómitos en el 39% y fiebre prolongada en el 20%. Además, catorce casos necesitaron hospitalización, donde se identificó que el patógeno causante de este brote fue *Salmonella* spp (de Frutos *et al.*, 2018).

Un estudio que se realizó en Durango, México analizó la presencia de microorganismos patógenos en 76 canales de pollo localizados en 19 carnicerías, se recolectaron 38 muestras congeladas y 38 en refrigeración. El análisis se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana-114-SSA1-1994 y al Manual de Procedimientos para el aislamiento y la identificación de *Campylobacter* spp. Se encontró presencia de *Salmonella* spp en el 63% de las muestras y *Campylobacter* spp en el 81% de las muestras, con mayor presencia en las muestras en congelación en ambos casos (Ceniceros *et al.*, 2016).

Un aspecto importante para disminuir las ETA son las prácticas de inocuidad de los alimentos. La

implementación de nuevas técnicas y tecnologías de producción así como el control de los alimentos durante su manipulación, almacenamiento y distribución hasta llegar al consumo humano, son esenciales para la obtención de alimentos microbiológicamente aptos para su consumo (Palomino-Camargo *et al.*, 2014).

2.1.1 Bacterias Implicadas en las Enfermedades Transmitidas por Alimentos

Los principales microorganismos implicados en las ETA son derivados de una mala manipulación de los alimentos durante el procesamiento de la materia prima, distribución y transporte, influyen además las variaciones de temperatura de almacenamiento e incumplimiento de los lineamientos sanitarios en la cadena de producción. Dentro de los patógenos más importante encontrados en los alimentos, se incluyen a *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* y *Shigella* sp (Sánchez-Valdés *et al.*, 2016). Los principales alimentos que representan un mayor riesgo de estar contaminados o de contaminarse durante su producción son, salsas, cremas, derivados lácteos, huevos, carnes, productos cárnicos, aves, pescados, repostería y alimentos listos para comer debido a la gran manipulación que se les da (OMS, 2016). Dentro de los patógenos implicados en brotes alimentarios se encuentran *Salmonella* spp, *E. coli* y *L. monocytogenes* ya que causan el 91% de ellos, debido a que pueden estar presentes en alimentos con mucha distribución como verduras, carnes y frutas frescas (CDC, 2021b)

La carne y sus productos son alimentos que fácilmente pueden contaminarse por microorganismos patógenos debido a que durante su procesamiento están en contacto con superficies, utensilios y pueden ser manipulados bajo condiciones que favorecen el crecimiento bacteriano (Rojas-Allieri, 2019). Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés), continuamente reportan los brotes de infecciones causadas por patógenos, incluyendo aquellos que involucran el consumo de productos cárnicos contaminados con *L. monocytogenes*. Durante septiembre de 2021 estos Centros reportaron brotes relacionado con el consumo de productos de pollo listos para consumir y carne en rodajas. En el primero se tuvieron

tres hospitalizaciones y una muerte, mientras que en el segundo fueron 10 hospitalizaciones y una muerte. En enero de este mismo año, los productos involucrados fueron salami y mortadela, reportándose 12 hospitalizaciones y una muerte.

En cuanto a la presencia de *L. monocytogenes* en carne de cerdo a nivel local, Figueroa-López *et al.* (2019), realizaron un estudio para llevar a cabo la identificación y frecuencia de *L. monocytogenes* en lomo de cerdo y superficies de rastros tipo inspección federal (TIF), y mataderos no TIF en Sonora, México. Recolectaron 103 muestras en el periodo de 2015-2017, donde fueron incluidas 79 muestras de lomo de cerdo y 24 muestras de superficies inertes. De las 103 pruebas, en 21 pruebas se logró aislar *L. monocytogenes*, de las cuales 7 fueron aisladas de lomo de cerdo de rastro TIF, 9 en rastro no TIF y 7 de superficies de rastro TIF. En la ciudad de México, Gutiérrez *et al.* (2020), reportaron una prevalencia de este patógeno en el 33.3% de las muestras de carne de cerdo recolectadas en supermercados de la localidad.

2.2 Microbiología de la Carne y Productos Cárnicos

Los alimentos cárnicos presentan un ambiente favorable para el crecimiento bacteriano siendo uno de los principales reservorios para bacterias como *Salmonella* spp. en carne de pollo, carne de cerdo y carne de res. En el caso de *E. coli*, ésta tiene más presencia en productos del ganado bovino con una fácil transmisión debido a malas prácticas de manipulación y fallas en la producción de alimentos. La bacteria *L. monocytogenes*, igualmente se presenta en carnes y diferentes tipos de productos cárnicos listos para su consumo como chorizo, jamón y salchichas (Soto *et al.*, 2016).

Los factores que intervienen en la supervivencia y crecimiento en la población bacteriana dependen de la resistencia que la bacteria presente. Algunos de los factores que favorecen el crecimiento bacteriano son las temperaturas mayores a los 5 °C, un valor neutro de pH o bajos niveles de NaCl, además de la actividad de agua. Los nutrientes como las proteínas, vitaminas y minerales presentes en la carne y productos cárnicos son también importantes en la supervivencia de las bacterias (Cashman *et al.*, 2017). La grasa en los productos cárnicos es también un factor importante pues se ha evidenciado que altos niveles en los alimentos actúan como barrera contra el calor durante los tratamientos térmicos (López-Pino *et al.*, 2020). Otro aspecto a considerar son

los ingredientes añadidos a los productos cárnicos dando disponibilidad de otros nutrientes como los hidratos de carbono, además que esto implica una mayor manipulación del producto durante su producción, generando un aumento en la carga bacteriana del producto (de Castilho *et al.*, 2020).

2.3 Relevancia de la Inocuidad de la Carne y Productos Cárnicos

La conservación de la carne y sus productos comenzó desde su primer consumo, primeramente, fue con la intención de alargar la vida útil del producto donde se empezaron a utilizar técnicas como salar la carne o el secado de la misma. En el siglo XIX hubo un aumento en el conocimiento microbiológico respecto a la carne y el estudio para prevenir su deterioro. Fue en el siglo XX cuando se dieron las primeras normas enfocadas en la inocuidad de los alimentos. Tras el brote de infecciones producidas por bacterias presentes en alimentos se tomaron medidas para el manejo de patógenos durante la producción de alimentos (Weinroth *et al.*, 2018).

Es necesario implementar estrategias efectivas para promover la seguridad microbiológica en la industria cárnica con el fin de mejorar la calidad y garantizar inocuidad de sus productos. De ahí surge el planteamiento del uso de sistemas que garanticen la inocuidad, como el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP), las buenas prácticas de manufactura (BPM), las Normas Oficiales Mexicanas, entre otras (Hung *et al.*, 2015). El sistema HACCP ha sido implementado por muchas de las empresas productoras de carne y productos cárnicos como un medio efectivo para disminuir los riesgos microbiológicos. Este sistema tiene como base siete principios: 1) análisis de peligros, 2) determinación de puntos críticos de control (PCC), 3) especificación de límites críticos, 4) procedimientos para vigilar los PCC, 5) medidas correctivas, 6) descripción de procedimientos de verificación y, 7) creación de un sistema de registro.

Garantizar la inocuidad de la carne y productos cárnicos detectando o descartando la presencia de bacterias es otro de los aspectos importantes a tomar en cuenta en toda la cadena de producción. Actualmente se conocen métodos de detección de bacterias patógenas como pruebas bioquímicas, pruebas de aglutinación, pruebas genéticas para toxinas o caracterización microbiológica por métodos moleculares que dependiendo el proceso podría tomar tiempos prolongados afectando la eficacia de las estrategias de vigilancia (FAO, 2014).

2.3.1 Relación de la Contaminación Cruzada Durante el Procesamiento de Carne y Productos Cárnicos

A todo lo largo de la cadena de producción en la industria de la carne y productos cárnicos es de gran importancia llevar a cabo un control estricto sobre la inocuidad del alimento, con el fin de garantizar que el producto final sea de calidad y no presente un riesgo a la salud para el consumidor. Para ello se toman medidas de prevención para evitar o mantener al mínimo el crecimiento bacteriano mediante la utilización de agentes tanto sintéticos como conservadores naturales (Ruiz *et al.*, 2017).

La contaminación cruzada en el hogar y plantas procesadoras de alimentos tiene un papel importante en la transmisión de microorganismos patógenos, donde factores como una mala manipulación del alimento, una sanitización deficiente del equipo y métodos inapropiados de preparación, son los que llegan a contaminar las superficies y utensilios de limpieza y representan las principales vías de contaminación (González-Rivas *et al.*, 2016). La limpieza de las superficies es de suma importancia ya que en ésta se pueden adherir patógenos que logran sobrevivir a sanitizantes gracias a que generan biopelículas (Bonsaglia *et al.*, 2014).

Se ha encontrado que la persistencia de *L. monocytogenes* en plantas procesadoras se debe a la formación de biopelículas, estas se pueden conservar gracias a que se forman en superficies dañadas, telas, uniones de materiales inertes, entre otros. Las biopelículas son creadas a partir de materia celular y extracelular que protegen al patógeno de un medio ambiente estresante y fomenta la interacción con nutrientes, metabolitos y material genético que promueve el crecimiento y supervivencia del patógeno incluso la adquisición de genes asociados con resistencia a los factores estresantes (Ferreira *et al.*, 2014).

Las biopelículas son estructuras compuestas por microorganismos que se adhieren a superficies, proporcionando una capa protectora contra las estrategias de sanitización química o física, siendo fundamental la prevención de contaminación de la materia prima y del producto durante su procesamiento, uso de utensilios, superficies y todo lo que llegue a estar en contacto con la carne o producto cárnico en cualquiera de sus presentaciones (Castro *et al.*, 2017). Kahraman *et al.* (2010) reportaron una incidencia de *L. monocytogenes* en 5.17% de muestras de utensilios y equipos de procesamiento de plantas de alimentos cárnicos en Turquía. Gudbjörnsdóttir *et al.*

(2004), evidenciaron una prevalencia de *L. monocytogenes* de 0 a 15.1% en muestras de diferentes plantas procesadoras de carnes de los países nórdicos. A nivel local, Figueroa-López *et al.* (2019) realizaron una investigación donde evaluaron la prevalencia de *L. monocytogenes* en superficies de rastros TIF y encontraron presencia en el 20.8% de las superficies muestreadas en un rastro TIF del estado de Sonora.

2.4 Producción de Carne de Cerdo en México

En 2019, se produjeron 1,600,446 toneladas de carne de cerdo, siendo Jalisco, Sonora, Puebla, Yucatán y Veracruz los estados con mayor producción de carne de cerdo (SIAP, 2019). En el año 2020 se han producido 1,649,337 toneladas (SIAP, 2021). Comparando la producción de cerdo en otro país, en Colombia en 2019 hubo una producción de 446,602 toneladas (Fajardo-López, 2020). En Brasil la producción de carne de cerdo fue de 4.436 millones de toneladas en 2020 (ABPA, 2020)

El consumo per cápita de carne de cerdo en México en 2019 fue de 19 kg por persona, en comparación con la EUA con un consumo de 31 kg y en la Unión Europea de 40 kg por persona (COMECARNE, 2019)

2.4.1 Productos de Cerdo Típicos de México

La carne de cerdo ocupa el segundo lugar del consumo en los hogares, después de la carne de ave. Los cortes de carne de cerdo más consumidos son la costilla, bistec, pierna en trozo y la pulpa en trozo. Respecto a los productos cárnicos procesados éstos incluyen al chorizo, longaniza, jamón, chicharrón, salchicha, salchichón, entre otros (Alvarado *et al.*, 2017).

La producción de chorizo en México se mantuvo fue de 37,796 toneladas en 2016 y tuvo un pequeño aumento a 33,506 toneladas de consumo nacional aparente en 2017. La producción de chorizo en 2018 llegó hasta 33,570 toneladas y 35,193 toneladas en 2019 (COMECARNE, 2019)

2.4.2 Elaboración de Chorizo de Cerdo en México

La conquista de México por los españoles conllevó a un gran intercambio cultural, incluyendo la gastronomía, lo que provocó que México adoptara la creación de salchichas con ingredientes locales dando como resultado el chorizo, siendo popular en el país desde la época colonial (Romero *et al.*, 2010). El chorizo en México es un embutido crudo, obtenido de una mezcla de carne y grasa la cual es picada, amasada y embutida en tripa natural, con la característica que ésta puede ser hecha con diferentes matrices cárnicas, haciendo que sea un alimento común en México (Velasco *et al.*, 2014).

El chorizo artesanal, tradicional en la Región Altos Sur de Jalisco, es un producto cárnico curado, elaborado con una variedad de restos cárnicos crudos y molidos de res, pollo y cerdo, que incluyen carne de pierna, pechuga, lomo, papada, cachete o trompa, así como de una mezcla de pimienta negra, comino, vinagre, ajo, chile guajillo y sal de mesa, embutidos en tripa natural (Frausto *et al.*, 2019).

Por otro lado, en el valle de Toluca, estado de México, existen empresas productoras a pequeña escala de chorizos rojos y verdes, los cuales se comercializan en mercados grandes y ambulantes por la ciudad. La elaboración de chorizo en Toluca es de gran importancia ya que sostiene la economía de la región. La problemática con estos chorizos es su preparación artesanal sujeta a una gran diversidad de recetas con variaciones importantes en los ingredientes, principalmente el vinagre asociado al control del pH para limitar el crecimiento de los patógenos. Su preparación a temperatura ambiente, falta de higiene y deficiencias en los sistemas de refrigeración son otros factores que comprometen la inocuidad del producto y que podrían conducir a un brote de alguna infección por patógenos (Sánchez *et al.*, 2019).

2.5 *Listeria monocytogenes*. Generalidades e Impacto a la Salud

L. monocytogenes es un bacilo gram positivo, anaerobio facultativo, no formador de esporas. Existen seis especies del género *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*,

L. welshimeri y *L. marthii*, y solo *L. monocytogenes* es patógena para el humano. Dentro de los serotipos de *L. monocytogenes*, 1/2a, 1/2b y 4b son causantes de la mayoría de los casos clínicos (Rodríguez-Auad, 2018). *L. monocytogenes* se relaciona con las enfermedades transmitidas por alimentos con la posibilidad de ser una enfermedad leve hasta una enfermedad sistémica con alta tasa de hospitalización y mortalidad. Principalmente afecta a mujeres embarazadas, recién nacidos, adultos mayores y personas inmunodeprimidas (Leong *et al.*, 2014). Esta bacteria puede ser aislada de superficies, agua, vegetales, alimentos cárnicos frescos y procesados, alimentos listos para comer, carne de res, porcina y aves, embutidos ahumados y fermentados (Rodrigues *et al.*, 2016). La listeriosis humana es una enfermedad con tasa de mortalidad alta (20 a 30%), que incluye padecimientos severos como la meningitis, septicemias y abortos espontáneos. La listeriosis durante el embarazo implica enfermedad tanto para la madre como al neonato. En Reino Unido, Estados Unidos de América e Israel hay una incidencia de listeriosis en neonatos de 3.4, 8.6 y 25.5 por cada 100,000 nacimientos respectivamente (Sapuan *et al.*, 2017). Según la CDC la listeriosis es una infección seria, normalmente causada por el consumo de alimentos contaminados. Se estima aproximadamente 1600 casos de infecciones al año y 260 muertes (CDC, 2021a).

Lewis et al. (2017) realizaron un estudio para describir la incidencia de meningitis neonatal en 53 neonatos, se encontró una incidencia de 1,5 por mil nacidos vivos y una letalidad de 3,8%. Los síntomas frecuentes fueron fiebre, hipotonía e hipoactividad. Las bacterias más frecuentes fueron *L. monocytogenes* (16,9%) y *Staphylococcus coagulasa* negativo (11,3%).

Son escasos los estudios epidemiológicos sobre la incidencia de *L. monocytogenes* en alimentos ya que esta se toma como una enfermedad gastrointestinal típica; sin embargo en México existe información sobre listeriosis con una tasa de mortalidad del 20% y una dosis infectiva de 10^4 UFC/g de alimento (Castañeda-Ruelas *et al.*, 2014).

2.5.1 Curva de Crecimiento de *Listeria monocytogenes*

Las curvas de crecimiento bacteriano están compuestas por distintas fases, la primera es la fase *lag*, en esta se representa el tiempo necesario para adaptar al nuevo medio el metabolismo de las bacterias; se continua con la fase exponencial o de crecimiento, en esta fase se encuentran

disponibles suficientes nutrientes para aumentar la población bacteriana exponencialmente; en la fase estacionaria los nutrientes no son tan abundantes y por lo tanto no hay el mismo ritmo de proliferación lo que ocasiona que se nivelen las tasas de proliferación y muerte; por último se llega a la fase de muerte, en la cual los nutrientes empiezan a agotarse y es cuando la tasa de mortalidad supera a la de proliferación y la población en general decae (López, 2016).

La curva de crecimiento de los patógenos depende de muchos factores en los alimentos, siendo uno de los principales el tipo y composición del alimento en el que se desarrolla. Por ejemplo, en un estudio donde se determinó si los tiempos utilizados de cocción de chorizo por los consumidores era suficiente para la inactivación de *L. monocytogenes*, se utilizaron 80 muestras de chorizo comercial y se inocularon las cepas en 20 mL de caldo BHI. Uno de los resultados que encontraron fue que en promedio las curvas de crecimiento la fase lag ocurrió entre las 2 y 8 horas y se alcanzó la fase estacionaria entre las 10-12 horas (Molina-Moreno *et al.*, 2009).

En otro estudio se investigó la interacción de bacterias ácido lácticas (BAL), antagonistas de *L. monocytogenes* ambas incubadas en co-cultivos durante 24 horas. Las BAL tuvieron una población inicial de 6.5 Log UFC/mL y aumentaron su población (fase lag) en 8 horas con una concentración máxima de 8.69 Log UFC/mL en el total de 24 horas, mientras que la concentración inicial de *L. monocytogenes* fue de 3.72 Log UFC/mL, y se alcanzó el crecimiento máximo a las 14 horas en incubación; a las 24 horas se llegó a un tamaño de población constante, tiempo final hasta el cual se realizó la experimentación (8.01 log UFC/mL) (Echeverry *et al.*, 2018).

2.5.2 Resistencia Antimicrobiana de *Listeria monocytogenes*

La resistencia antimicrobiana de patógenos es conocida como un problema de salud pública en el mundo ya que éstos se pueden encontrar en personas, animales, comida, medio ambiente como agua, superficies y aire (Doyle *et al.*, 2013). Los agentes antimicrobianos se desarrollaron con el fin de prevenir, controlar y tratar enfermedades infecciosas en seres vivos, desafortunadamente el abuso en el uso de estos agentes ha hecho que aumente la resistencia a antimicrobianos, haciendo que exista mayor proliferación durante la cadena de producción de alimentos, lo que lleva a un aumento de la morbilidad, mortalidad y mayores costos de tratamientos médicos (JVARM, 2013).

El control de *L. monocytogenes* es fundamental en los productos cárnicos. En la literatura existen varios estudios donde se plantean algunas estrategias de control. Se investigó el comportamiento de *L. monocytogenes* durante la madurez de jamón serrano e ibérico para validar la seguridad del producto, fueron aisladas las cepas S2 (serotipo 1/2a), S4-2 (serotipo 1/2b), S12-1 (serotipo 1/2c) y S7-2 (serotipo 4b). Se utilizaron 28 piezas de jamón serrano fresco y 28 piezas de jamón ibérico, ambos fueron inoculados en su superficie con un total de 10 log UFC y se sometieron a un procesamiento de curado en seco durante 24 meses. El conteo de *L. monocytogenes* disminuyó de 6.6 log UFC/g en los primeros 2 meses a 4 °C, a partir de los 4 meses el conteo de listeria disminuyó hasta 2 log UFC/g en jamón y a partir de los 6 meses no se observó una disminución significativa en su población, aunque de los 9 meses en adelante ya no se pudo detectar la presencia de *L. monocytogenes* en los jamones. Concluyendo que el proceso de curado en seco 4 meses es efectivo para la inactivación de *L. monocytogenes* (Montiel *et al.*, 2020).

En un estudio se hizo una comparación de los perfiles de resistencia a antimicrobianos en *L. monocytogenes* aislada en 85 muestras de carne de pollo en 2012 y 50 muestras recolectadas en 2017, siendo un total de 135 piezas de pollo crudo, las muestras fueron obtenidas de 9 supermercados al azar en Fukuoka, Japón. Se hizo una extracción de DNA utilizando un kit comercial con el fin de detectar los genes que dan la característica de resistencia a antimicrobianos por medio de PCR. Para la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos se aislaron 75 muestras del 2012 y 29 de las muestras del 2017 y se inocularon individualmente con distintos antimicrobianos, los cuales fueron anticuerpos como Listeria-8-antisera, químicos en forma de ampicilina, cefazolina, cefmetazol, cefoxitina, clindamicina, eritromicina, formaldehído, formalina, fosfomicina, gentamicina, levofloxacina, minociclina, oxacilina, sulfametoxazol, tetraciclina y tetraciclina. El estudio concluyó que la resistencia a antimicrobianos está relacionada a los distintos serotipos siendo los 1/2a, 1/2b, 1/2 y 4b/4e de los más resistentes de los aislados en 2012 y los serotipos 1/2a y 1/2b los que mayor resistencia presentan de los aislados en 2017 (Maung *et al.*, 2019).

La principal preocupación es la resistencia que adquieren los patógenos debido a que durante la producción de carne los animales son suplementados con antibióticos adicionados en los alimentos, siendo que esto genera una resistencia a los medicamentos utilizados contra la listeriosis. Por otro lado, esto también puede generar una mayor resistencia a sanitizantes utilizados en la industria cárnica para la producción de alimentos, afectando al tratamiento térmico y dificultando la eliminación de esta bacteria en alimentos (Carvalho *et al.*, 2019).

2.6 Uso de Antimicrobianos en la Producción de Cárnicos

La conservación de los productos cárnicos es de suma importancia ya que son afectados por cambios químicos o por la presencia de patógenos que pueden ser adquiridos durante la producción, almacenamiento y/o distribución, ocasionando un impacto en la calidad del producto y por lo tanto en las ventas del mismo (Ibrahim *et al.*, 2008). Los agentes antimicrobianos afectan los mecanismos físicos, fisicoquímicos y diversas reacciones bioquímicas de los microorganismos impactando en su supervivencia que conducen a la muerte de la bacteria. Su utilización puede ser tanto en el alimento como en superficies y equipos de procesamiento. El uso de estos agentes produce un efecto de bloqueo en el crecimiento, actuando sobre la síntesis de compuestos de la pared celular, la membrana, proteínas o ácidos nucleicos (Cerón-Carrillo *et al.*, 2014).

En muchas ocasiones la presencia de patógenos en los alimentos se debe a contaminación cruzada debido a contactos con superficies de procesamiento con una deficiente sanitización. El uso de compuestos químicos como el cuaternario de amonio comúnmente usado en la industria cárnica para la limpieza de equipos y superficies de procesamiento puede generar resistencia en las bacterias que ahí proliferan. Martínez-Suarez *et al.* (2021), evidenciaron la resistencia de *L. monocytogenes* al cuaternario de amonio usado en ambientes de procesamiento de alimentos. Mencionan que este compuesto normalmente usado en concentraciones de 200 a 1000 ppm es efectivo contra las bacterias, pero en ocasiones se pueden generar gradientes de concentración debido a efectos de dilución y degradación en zonas y superficies muy húmedas o con alta cantidad de materia orgánica; como resultado, los microorganismos se exponen con frecuencia a concentraciones subinhibitorias del sanitizante contribuyendo a su adaptación y persistencia ambiental.

El uso de compuestos naturales adicionados directamente en el alimento es una opción prometedora para los productores de cárnicos. Los aceites esenciales extraídos de plantas tienen la capacidad de alargar la vida útil de los alimentos, según lo demuestran varios estudios reportados en la literatura. Zapata-Álvarez *et al.* (2019), realizaron un estudio para evaluar el crecimiento de *L. monocytogenes* y *E. coli* inoculada en salchichas y mortadela en concentraciones de 2-3 Log UFC/g, almacenada a 4 °C y utilizando un extracto de romero como antimicrobiano a concentraciones de 0.65%. Encontraron que el antimicrobiano natural inhibe el 100% de la

población de *E. coli* y *L. monocytogenes* para la segunda y tercera semana de almacenamiento, respectivamente. Churklam *et al.* (2020), estudiaron los efectos combinado de carvacrol y nisina sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada en bolonia en rodajas. Sus resultados indican que la combinación de carvacrol y nisina podría ser una opción natural eficaz para controlar este patógeno en los alimentos.

Con base a lo anterior una forma de evitar el crecimiento bacteriano es el uso de agentes antimicrobianos naturales para la prevención y control de patógenos minimizando la incidencia de microorganismos y la contaminación cruzada, sobre todo cuando hay alimentos listos para comer. Sin embargo, es fundamental el uso de programas de limpieza y desinfección en la cadena de producción para asegurar la inocuidad del alimento (Castro *et al.*, 2017).

2.6.1 Incorporación de Ingredientes con Características Antimicrobianas

Hoy en día los consumidores no solo le dan importancia al riesgo que presentan los microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, también influye en la calidad del alimento el uso de conservadores químicos o sintéticos para controlar patógenos; por ello, el consumidor exige un mayor uso de conservadores naturales (Puche *et al.*, 2017). Este cambio en las preferencias de los consumidores ha llevado a la industria a utilizar conservadores naturales en vez de aditivos sintéticos o químicos, aunque esto representa una búsqueda de nuevos métodos para mejorar la calidad microbiológica de los alimentos (Purba *et al.*, 2014).

En los últimos años se ha dado la tendencia de utilizar cultivos de bacterias no patógenas con fines de bioconservadores (Field *et al.*, 2018). Las bacterias ácido lácticas han sido utilizadas por la industria alimentaria para fermentar productos y se ha demostrado la capacidad de estas bacterias de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos en diferentes alimentos (Íncili *et al.*, 2020). Otros compuestos estudiados son los derivados de plantas, siendo examinados como alternativas en estrategias para tratar a los microorganismos patógenos, en especial los aceites esenciales. Estas sustancias son compuestos fenólicos obtenidos extractos naturales. Teniendo en común los compuestos puros extraídos de fuentes naturales (Méndez-Zamora *et al.*, 2015).

Existen estudios sobre el efecto antibacteriano de aditivos. Graciano-Cristóbal *et al.* (2017),

evaluaron la interacción de tres aditivos comestibles elaborados con especias sobre carne de cerdo cruda inoculada con *E. coli* O157:H7, el aditivo 1 contenía cebolla, cilantro, orégano, jugo de limón y una mezcla de canela y clavo; el aditivo 2, cebolla, cilantro, hojas de laurel, jugo de limón y mezcla de canela y clavo; y el aditivo 3 se constituía de cebolla, cilantro, pimienta negra, chile verde, ajo, sal, cálices de jamaica verde, jugo de limón y mezcla de canela y clavo. Cada aditivo fue centrifugado para incorporarse en la carne para hamburguesa que estaba compuesta por lomo de cerdo, grasa dorsal, sal, agua y el aditivo acuoso. Los tres aditivos mostraron un efecto bacteriostático logrando reducir la velocidad de crecimiento de los patógenos, aunque el aditivo 3 fue el más sobresaliente ya que redujo un 41.2% la velocidad de crecimiento, mientras que los aditivos 1 y 2 la redujeron en 38.85 y 23.38% respectivamente.

El uso de alguna estrategia para reducir o detener el aumento de la población microbiana ha tenido un gran impacto en las técnicas de procesamiento; por lo tanto, el desarrollo de nuevas tecnologías y métodos de preparación de alimentos da pie a la utilización de una o más estrategias, como puede ser el caso del marinado en los alimentos, el cual implica el uso de emulsiones que pueden contener ácidos orgánicos, ácidos esenciales, especias, hierbas y sales con el fin de mejorar las características organolépticas y la calidad microbiana del alimento (Karyotis *et al.*, 2017).

2.6.2 Uso de Ácido Acético en Productos Cárnicos

La utilización del ácido acético es parte de diferentes estrategias donde se busca crear un medio ácido en el alimento con el fin de provocar un paro en el crecimiento de la población bacteriana, aunque se debe tener en cuenta la cantidad de ácido acético que se debe utilizar. Se ha demostrado que una concentración menor al 3.5% reduce su eficacia; dependiendo del alimento, en ocasiones debe emplearse una concentración mayor de 2.5% para observar su funcionalidad (Torres-Intriago *et al.*, 2019).

Laranjo *et al.* (2018), realizaron un estudio sobre la adición de vinagre para extender la vida útil de un producto cárnico a base carne de cerdo, se probaron dos tratamientos, uno control y el otro con vinagre, almacenados durante tres meses, la muestra del grupo con vinagre fue sumergida en una solución de 50% agua y 50% vinagre y fue empaquetada inmediatamente y se realizaron

análisis al momento previo de empacar, después del primero, segundo y tercer mes. Los resultados que obtuvieron mostraron que en el grupo sin vinagre hubo aumento de 2 Log UFC/g en la población bacteriana de *L. monocytogenes* inoculada. Por otro lado, en el grupo con vinagre su conteo fue menor a 1 Log UFC/g.

Sengun *et al.* (2021), estudiaron el comportamiento de *Salmonella Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 en carne de res marinada con vinagre de diferentes fuentes y almacenada a 4 °C por 24 h. Las muestras de carne fueron inoculadas por separado con los patógenos de interés a una concentración de 6 Log UFC/g y después del periodo de almacenamiento, la carga microbiana para *Salmonella Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 disminuyó de 1.040 a 1.225, 1.420 a 1.913 y 1.232 a 1.435 log UFC/g, respectivamente.

El efecto de los ácidos orgánicos se fundamenta principalmente en la reducción del pH del medio, debido a que, a un menor nivel de pH, hay mayor efecto antimicrobiano asociado a una acidificación del citoplasma bacteriano. Las aplicaciones que pueden tener los ácidos orgánicos son la característica acidulante, capacidad de regular el pH, agente quelante de iones metálicos, emulsificante y efectos organolépticos (Domínguez, 2014).

2.7 Efecto de la Temperatura sobre el Crecimiento de *L. monocytogenes*

Las bajas temperaturas se han utilizado para la conservación de los alimentos como la carne y productos cárnicos evitando el crecimiento de patógenos debido a que al enfriarse el producto se presenta un secado de la superficie (Carhuallanqui-Pérez *et al.*, 2020). *L. monocytogenes* crece en un amplio rango de temperaturas que oscila entre 1 y 45 °C y representa un serio problema en los alimentos refrigerados en equipos con altas variaciones de temperatura o con un control deficiente de la misma.

La variación de temperatura en los refrigeradores de los hogares es relativamente frecuente, tal como lo evidencia Evans y Redmond (2016) en un estudio llevado a cabo en refrigeradores domésticos. Los investigadores estudiaron el comportamiento de la temperatura de operación de equipos durante 6.5 días en 43 hogares y encontraron que ninguno de los refrigeradores operó a

una temperatura menor a 5 °C durante todo el periodo de estudio y que el promedio en el 91% de ellos excedió de los 5 °C. Ante estas variaciones de temperatura, las superficies interiores de los refrigeradores corren un riesgo potencial de contaminarse con patógenos, aumentando a su vez el riesgo de contaminación cruzada con los alimentos que ahí se almacenan. Jackson *et al.* (2007), estudiaron la incidencia de microorganismos patógenos en una muestra de 342 refrigeradores domésticos. De acuerdo a sus resultados, *Staphylococcus aureus* fue recuperado en el 6.4% de las muestras, mientras que *L. monocytogenes* y *E. coli* en el 1.2% de ellas. El riesgo de contaminación es de particular importancia en los alimentos listos para consumir pues no reciben un tratamiento térmico posterior que asegure su inocuidad.

El uso de modelos predictivos es una herramienta eficaz para determinar los riesgos de crecimiento de patógenos ante variaciones de temperaturas. Lee *et al.* (2014), desarrollaron un modelo predictivo de crecimiento de *L. monocytogenes* en función de la temperatura para asegurar la inocuidad de carne de cerdo. El modelo desarrollado fue aceptable de acuerdo a los criterios estadísticos establecidos y fue útil para determinar el crecimiento del patógeno en carne de cerdo cruda; además, mencionan que el modelo propuesto puede garantizar la seguridad de las carnes y ayudar a establecer normas para evitar la contaminación microbiana. Por su parte, Ye *et al.* (2013), desarrollaron y validaron un modelo para describir el crecimiento de *L. monocytogenes* en carne de cerdo empacada al vacío. Concluyen que el uso del modelo generado reduce el riesgo de proliferación del patógeno y realza la seguridad de la carne y productos cárnicos.

2.8 Microbiología Predictiva

La microbiología predictiva tiene la función de simplificar procesos mediante hipótesis sobre el comportamiento microbiano por medio de un modelo matemático, normalmente se obtienen coeficientes de regresión que se obtienen y estiman a partir de los datos experimentales, lo cual permite la predicción del crecimiento bacteriano durante la cadena alimentaria bajo diferentes condiciones (principalmente de temperatura) y así poder explicar un proceso microbiológico a través de la interpretación del modelo (Chambi *et al.*, 2021).

La utilización de esta herramienta permite la evaluación de riesgos cuantitativos que ayudan en la

toma de decisiones sobre la situación microbiológica en los alimentos, con el fin de establecer interacciones entre el proceso y los posibles problemas que se puedan presentar tanto en la salud humana como en la salud pública (Troncoso, 2018). Existen diferentes modelos que predicen el crecimiento bacteriano y pueden clasificarse como primarios y secundarios.

Modelos Primarios

Estos modelos son los más sencillos ya que solo se basa en el tiempo y en las unidades formadoras de colonias y son analizadas en una o más condiciones experimentales. Su objetivo es descubrir la cinética de crecimiento de microorganismos con el mínimo de factores. La información que proporciona son el tiempo de generación (t_0), la duración de la fase de latencia o *lag* (λ), la velocidad de crecimiento (μ_{max}) o el tiempo de formación de toxinas, si es el caso (Tremarin *et al.*, 2017).

El modelo McKellar propone que una población puede no ser homogénea y que esta puede ser expresada mediante dos células en estado de crecimiento o no crecimiento. Suponiendo que todo el crecimiento se da en una pequeña fracción de la población total de células que están presentes en el compartimento de crecimiento en $t = 0$. El crecimiento posterior se basa en la siguiente ecuación logística:

$$\frac{dG}{dt} = G \cdot \mu \cdot \left(1 - \frac{G}{N_{max}}\right) \dots \text{(Ec. 1)}$$

Donde G es el número de células en estado de crecimiento, Nmax es la concentración máxima

El modelo de Buchanan, es utilizado normalmente en una versión trifásica del modelo matemático para ajustar los datos experimentales de patógenos. Debido a que no es común el interés en modelar la fase estacionaria se ha propuesto una versión modificada de dos fases que solo se ajusta al retraso y fases exponenciales.

$$N1 = N0 + 1F(tlag, 0, \mu, (t - tlag)) \dots \text{(Ec. 2)}$$

Donde N es la población Log en t tiempo, N0 es la población inicial, t es el tiempo transcurrido y tlag es el tiempo que termina la fase lag.

El modelo de Hills se caracteriza por el crecimiento bacteriano en un sistema heterogéneo, estructurado por un modelo cinético con uno de descripción de transporte de nutrientes, basándose en la síntesis de DNA y división celular.

$$M(t) = M(0) \exp(At) \dots (\text{Ec. 3})$$

$$N(t) = N(0)(Kn \exp(At) + A \exp(-knt))/(A + kn) \dots (\text{Ec. 4})$$

Donde A y kn son constantes, dependiendo de los factores ambientales, N(t) crecimiento de población o síntesis de DNA, M es el total de biomasa y N es el total de número de células

Una de las ecuaciones muy utilizadas es la ecuación modificada de Gompertz, usa funciones parecidas a la curva de crecimiento bacteriana:

$$y_t = A + C \exp(-\exp(-B(t-M))) \dots (\text{Ec. 5})$$

Donde y_t representa la concentración celular en log UFC/g al tiempo t, A representa la concentración en log UFC/g a medida que t disminuye indefinidamente (conteo inicial de bacterias), B representa la velocidad de crecimiento a M, donde M es el tiempo en el cual la velocidad de crecimiento es máxima, C es la concentración en log UFC/g a medida que t aumenta indefinidamente (McKellar & Lu, 2003).

Modelos Secundarios

Estos modelos utilizan los parámetros del modelo primario incluyendo los factores de temperatura, pH, actividad de agua, entre otros (Fujikawa *et al.*, 2006). Los beneficios de los modelos predictivos es que son reproducibles frente a estos factores ya que se basan en el crecimiento bacteriano en los alimentos, por lo tanto, estos comportamientos se pueden concentrar en distintos modelos matemáticos como podría ser la superficie de respuesta (Ross *et al.*, 2003).

La metodología de superficie de respuesta es un diseño estadístico el cual permite optimizar y modelar los factores que influyen en la variable de respuesta, además la aplicación de este diseño puede resultar en un mayor rendimiento, optimización de tiempos, procesos y evitar variabilidad de resultados (Ferrer-Romero *et al.*, 2019; Rodríguez *et al.*, 2012)

Un modelo secundario muy utilizado para el cálculo apropiado de temperatura durante el crecimiento de microorganismos, es el propuesto por Ratkowsky:

$$\sqrt{\mu \max} = b \cdot (T - T_{min}) \dots (\text{Ec. 6})$$

Donde b es una constante y T es temperatura, T_{min} es temperatura mínima para crecimiento (5 a 10 °C).

3. HIPÓTESIS

La supervivencia de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo puede predecirse mediante la aplicación de un modelo matemático en función del pH del producto y la temperatura de almacenamiento.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Generar y validar un modelo de regresión para predecir la supervivencia de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo en función del pH del alimento y la temperatura de almacenamiento.

4.2 Objetivos Específicos

- Estudiar la supervivencia de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo en función del pH del alimento y la temperatura de almacenamiento, haciendo uso de modelos de regresión.
- Determinar el efecto del pH sobre los parámetros de color en chorizo de cerdo.
- Establecer modelos de regresión para predecir el riesgo microbiológico de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo en función de pH y temperatura de almacenamiento del producto.
- Predecir las condiciones mínimas de acidez en chorizo de cerdo que eviten el crecimiento de *L. monocytogenes* ante condiciones de abuso de temperatura.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Diseño Experimental

Se evaluaron los efectos e interacciones de pH (4.5 a 6.5) y abuso de temperatura (5 a 30 °C) sobre la fase lag (FL), tiempo de generación (TG) y velocidad de crecimiento exponencial (VCE) de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo usando un diseño central compuesto (DCC). El diseño experimental consistió de cuatro puntos factoriales, cuatro puntos axiales a una distancia de ± 1.41 unidades del centro, y cinco réplicas del punto central para un total de 13 tratamientos (Cuadro 1). El experimento completo se repitió dos veces y en cada repetición cada tratamiento se realizó por duplicado.

5.2. Cepa Bacteriana y Preparación del Inóculo

Se utilizó la cepa ATCC 7644 de *L. monocytogenes* perteneciente al Laboratorio de Microbiología Polifásica y Bioactividades del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. de Hermosillo, Sonora. La cepa se conservó en viales a -80 °C en caldo cerebro-corazón (Labline-Thermo Scientific, Melrose Park, IL.) con un 15% (vol/vol) de glicerol.

Para la preparación del inóculo se siguió la metodología de Juneja y Novak (2003). Se descongeló el vial con la cepa y se cultivó mediante la transferencia de 0.1 mL del cultivo descongelado a 10 mL de caldo cerebro-corazón, seguido de 24 h de incubación a 37 °C (Labline-Thermo Scientific, Melrose Park, Illinois). Este procedimiento se realizó por duplicado y posteriormente, se tomó 0.1 mL del cultivo para ser inoculado en tubos con 50 mL de caldo cerebro-corazón e incubado a 37 °C durante 24 h.

Cuadro 1. Valores codificados y experimentales en el DCC, para el estudio de los factores pH y temperatura en chorizo de cerdo.

Corrida	Valores codificados		Valores experimentales	
	A	B	pH	Temperatura (°C)
1	-1	-1	4.79	8.66
2	1	-1	6.21	8.66
3	-1	1	4.79	26.34
4	1	1	6.21	26.34
5	-1.414	0	4.50	17.50
6	1.414	0	6.50	17.50
7	0	-1.414	5.50	5.00
8	0	1.414	5.50	30.00
9	0	0	5.50	17.50
10	0	0	5.50	17.50
11	0	0	5.50	17.50
12	0	0	5.50	17.50
13	0	0	5.50	17.50

A: pH, B: Temperatura. Corridas 1-4 son puntos factoriales, 5-8 son puntos axiales, 9-13 son puntos centrales

Para la preparación de la suspensión de bacterias utilizadas en el ensayo se tomó 0.1 mL del cultivo y fue transferido a un matraz con 50 mL de caldo cerebro-corazón y se incubó por 24 h a 37 °C. Pasadas 24 h los cultivos se centrifugaron (Eppendorf, modelo 5810R, Hamburgo, Alemania) a 5000 x g durante 15 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en 9.9 mL de agua peptonada al 1% (BD Diagnostics Systems, Sparks, MD), para una nueva centrifugación bajo las mismas condiciones. El precipitado fue finalmente disuelto en 2 mL de agua peptonada al 1% obteniendo un inóculo de aproximadamente 8 Log UFC/mL. Se realizaron diluciones del inóculo hasta obtener una concentración de aproximadamente 4 Log UFC/mL que se empleó para inocular la muestra.

5.3 Preparación e Inoculación de Chorizo de Cerdo

El chorizo de cerdo se preparó siguiendo una formulación previamente establecida. Todos los materiales fueron adquiridos del comercio local. Se tomaron porciones de 5.0 ± 0.1 g de cada tratamiento y se colocaron en bolsas estériles para vacío de 9 x 14 cm (Whirl Pak®, USA). Las muestras se congelaron a -40 °C para posteriormente irradiarlas (60Cobalto, Gammacell®220E, MDS Nordion, Ont, CAN) hasta lograr una dosis de 4.32 kGy para eliminar la microbiota nativa. Después de la irradiación, muestras al azar fueron analizadas para corroborar la efectividad del proceso. Las muestras se congelaron nuevamente hasta su uso posterior

5.4 Enumeración de Bacterias Supervivientes

En los días de prueba, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y fueron inoculadas con 0.1 mL de la solución bacteriana en agua peptonada al 1% para obtener una concentración aproximada de 3 log UFC/g. Posteriormente se mezclaron en el stomaker (Stomacher 80, Lab System, Steward) durante 1 min para lograr una distribución homogénea de la bacteria en el producto. Después de esto, cada bolsa se comprimió en una capa delgada (0.5 a 1 mm de espesor) antes de sellarla térmicamente.

Las muestras preparadas para cada tratamiento se colocaron en una incubadora con una temperatura fijada según el DCC del Cuadro 1. Los intervalos de tiempo para el muestreo se establecieron en función de la temperatura de incubación y osciló entre 4 h a 30 °C y 72 h a 5 °C. Después del periodo de incubación, las muestras se sumergieron en un baño de hielo-agua durante 10 min para lograr su rápido enfriamiento hasta temperatura ambiente. Cada bolsa se abrió asépticamente; se añadieron 5 mL de agua peptonada al 1% y se homogenizaron para recoger la suspensión de líquido resultante de la interacción con la carne. Después de esto, se realizaron diluciones seriadas transfiriendo 0.1 mL del filtrado a 9.9 mL de agua de peptona, y se inocularon sobre agar Oxford (Difco, BD, Sparks, MD). Las colonias se enumeraron después de 24 h de incubación a 37 °C en una incubadora (Thermo Scientific, Herathem IMH 180, Robert Bosch

Strasse, Ger). Cada corrida experimental se realizó por duplicado y se utilizó la media de las UFC/g de dos placas de cada punto de muestreo para determinar la supervivencia de la bacteria.

5.5 Ajuste de las Curvas de Supervivencia de *Listeria monocytogenes*

El modelo modificado de Gompertz (Ec. 1) es un modelo primario empírico comúnmente utilizado para modelar el crecimiento de bacterias que fue utilizada en el presente estudio para ajustar las curvas de supervivencia de *L. monocytogenes*.

La ecuación (Ec.1) que representa a dicho modelo es la siguiente:

$$y_t = A + C \exp(-\exp(-B(t-M))) \dots \text{(Ec. 5)}$$

Donde y_t representa la concentración celular en log UFC/g al tiempo t , A representa la concentración en log UFC/g a medida que t disminuye indefinidamente (conteo inicial de bacterias), B representa la velocidad de crecimiento a M , donde M es el tiempo en el cual la velocidad de crecimiento es máxima, C es la concentración en log UFC/g a medida que t aumenta indefinidamente (McKellar et al., 2003).

A partir de la ecuación de Gompertz modificada, se estimó la velocidad de crecimiento exponencial, el tiempo de generación y duración de la fase lag de la siguiente manera:

Velocidad de crecimiento exponencial (VCE)	$[\log(\text{UFC/g})/h] = BC/e \dots \text{Ec. 7.}$
--	---

Tiempo de generación (TG)	$[h] = \text{Log}(2) e/BC \dots \text{Ec. 8.}$
---------------------------	--

Duración de la fase lag (FL)	$[h] = M - (1/B) \dots \text{Ec. 9.}$
------------------------------	---------------------------------------

Los parámetros de la curva de crecimiento (FL, TG y VCE) de *L. monocytogenes* fueron modelados en función de las condiciones de pH del medio (4.5 a 6.5) y abuso de temperatura de almacenamiento (5 a 30 °C) mediante la metodología de superficie de respuesta siguiendo un diseño central compuesto.

5.6 Análisis Estadístico

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta para desarrollar los modelos predictivos. Para cada modelo, se determinó el análisis de varianza (ANOVA), coeficiente de determinación (R^2) y falta de ajuste utilizando el paquete estadístico Design Expert (V.7.6.1, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN).

El modelo matemático correspondiente al DCC fue:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \dots \text{ (Ec. 10)}$$

Donde y son las variables respuestas (fase lag, velocidad de crecimiento exponencial y tiempo de generación), β_0 , β_i , β_{ii} , y β_{ij} son los coeficientes del intercepto y los términos lineales, cuadráticos y de interacción, respectivamente; y X_{i-j} son las variables independientes (pH del medio y abuso de temperatura).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Ajuste de pH y Color instrumental del Chorizo de Cerdo

Se estimó una ecuación de regresión para predecir el pH del producto en función de la cantidad de vinagre añadido. Se partió de un producto cárnico con un valor de pH = 6.43. El producto fue dividido en 13 lotes de 150 g cada uno a los cuales se les adicionó vinagre en cantidades de 0 a 12%. Los valores de pH en función de la cantidad de vinagre añadido se muestran en la Figura 1. Claramente se observa que a medida que se incrementa la cantidad de vinagre en el producto, el pH disminuye hasta alcanzar valores de 4.72 (9% de adición de vinagre). La ecuación de regresión que predice el pH en función de la cantidad de vinagre añadido al producto fue: $\text{pH} = 6.099 - 0.147 (\% \text{ vinagre})$, con un coeficiente de determinación de 0.94. Esta ecuación fue utilizada para ajustar los valores de pH en los 13 tratamientos del diseño central compuesto (DCC). En el Cuadro 1 se muestran las 13 corridas experimentales del DCC, donde se especifica el pH ajustado para cada uno de los tratamientos. Además del pH, también se realizó la medición del contenido de grasa resultando ésta de 14.6%. El contenido de grasa del chorizo de cerdo es muy importante puesto que este macronutriente está involucrado en la resistencia de *L. monocytogenes* ante el medio (Juneja *et al.*, 2000). Por ser un factor importante en el crecimiento de la bacteria, el contenido de grasa en el producto en estudio fue uniformizado en los valores antes mencionados.

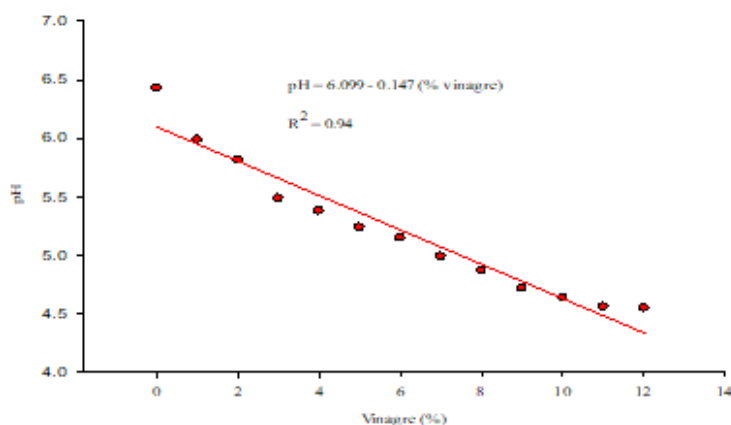


Figura 1. Nivel de PH en chorizo de cerdo añadido con diferente porcentaje de vinagre.

Una vez que se tuvieron los valores ajustados de pH, se midió el color instrumental (L^* , a^* , b^*) en todos los tratamientos. Se observa que el tratamiento con el menor valor L^* fue aquel con el pH más alto (tratamiento 6), mientras que el valor de L^* más alto correspondió al tratamiento 9 con un pH = 5.7. El mismo comportamiento se observa tanto para el matiz rojo-verde (valor a^*) como para el matiz amarillo-azul (valor b^*), estos valores se observan en la Figura 2. El color es una de las propiedades más importantes en los alimentos pues influye en la decisión de compra del consumidor. En un estudio realizado por Leyton-Portilla (2017), evaluaron el efecto de la cocción sobre la sinéresis en chorizo parrillero, uno de los datos encontrados fue que, a un mayor pH, cercano al neutro existe una mayor capacidad de retención de agua (CRA), por lo tanto, al haber un nivel menor de pH hay menos CRA haciendo que exista más agua libre en el producto debido a el punto isoelectrico de las proteínas y su interacción con el nivel de pH lo que ocasiona que haya mayor reflexión de la luz. Resultados similares encontraron Jaramillo-López *et al.* (2020) en una investigación donde analizaron el color de la carne de ovinos con diferentes niveles de pH (6.0 y 5.2) donde observaron que a un pH ácido aumenta el valor L^* . Por otro lado el valor de a^* se debe a que el chile colorado de la formulación para el chorizo de cerdo contiene carotenoides, el fitoeno es un carotenoide incoloro aunque posteriormente de instaurarse una cadena hidrocarbonada le proporciona a la molécula la capacidad de absorber luz y provoca la pigmentación del chorizo de cerdo (García-Jiménez *et al.*, 2018).

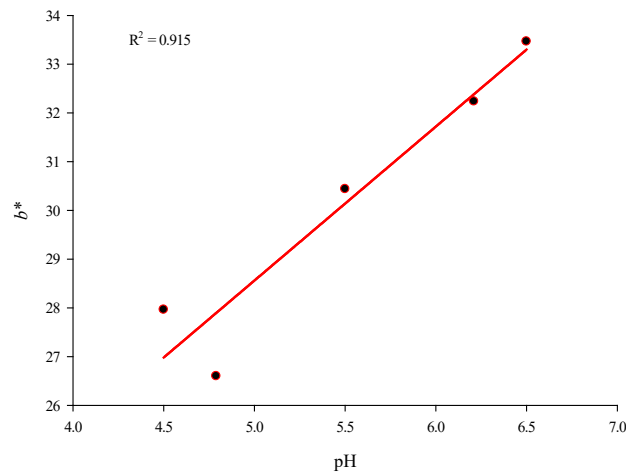
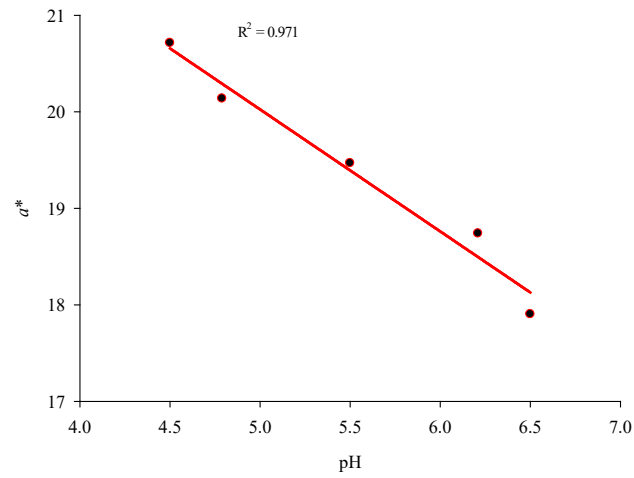
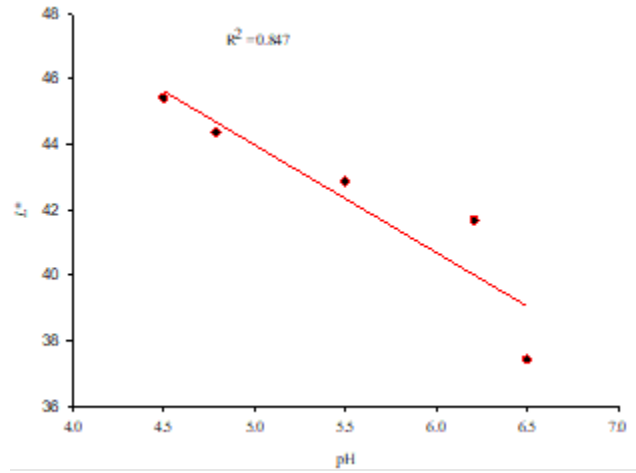


Figura 2. Relación entre el pH y el color del chorizo de cerdo.

6.2 Efecto de pH de Chorizo de Cerdo y Abuso de Temperatura sobre la FL, VCE y TG

Se determinaron los efectos e interacciones del pH y abuso de temperatura sobre la supervivencia de *L. monocytogenes* inoculada en chorizo de cerdo, estimando los valores de la FL, VCE y TG. Los valores experimentales obtenidos y los valores predichos por los modelos se presentan en el Cuadro 2 para cada una de las variables estudiadas. La FL (tiempo en horas de adaptación del microorganismo al medio antes de iniciar su crecimiento) y el TG (tiempo en horas necesario para duplicar la población bacteriana) aumentan a medida que la temperatura de almacenamiento disminuye. Un comportamiento contrario en la FL y TG se obtiene cuando la temperatura de almacenamiento aumenta. Estos contrastes se observan claramente en la Figura 3a y 3b en la que se presenta el ajuste de los datos experimentales con el modelo de Gompertz modificado. Se observa que a la temperatura de almacenamiento más baja probada en el experimento (5 °C), la FL y TG fueron de 122.5 h y 28.02 h, respectivamente, mientras que a la temperatura más alta (30 °C) la FL y TG fueron de 3.8 h y 1.36 h, respectivamente, en ambas condiciones manteniendo el pH del producto constante (5.5). Por otro lado, la disminución del pH provocado por la adición de vinagre en el chorizo de puerco ocasionó un aumento de la FL y el TG. El efecto del pH sobre la FL y TG se observa claramente en la Figura 4a y 4b, donde el tratamiento con un pH de 4.5 resultó en una FL y TG de 71.7 h y 7.95 h, respectivamente, mientras que en condiciones de pH de 6.5, la FL y TG resultante fue de 19.6 h y 4.34 h, respectivamente, en ambas condiciones a una temperatura de almacenamiento del producto constante de 17.5 °C.

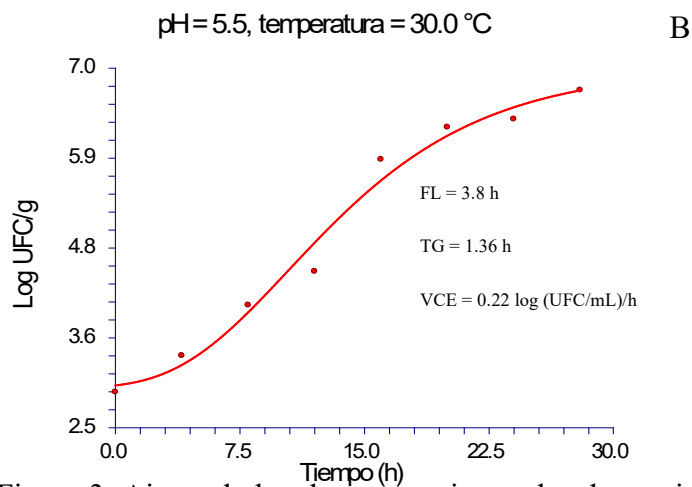
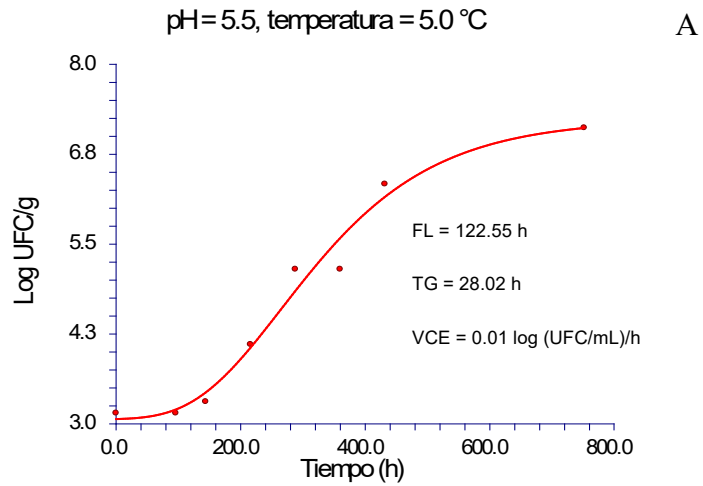


Figura 3. Ajuste de los datos experimentales de crecimiento de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo almacenado a A) 5 °C y B) 30 °C, usando el modelo de Gompertz modificado para estimar la fase lag, el tiempo de generación y la velocidad de crecimiento exponencial.

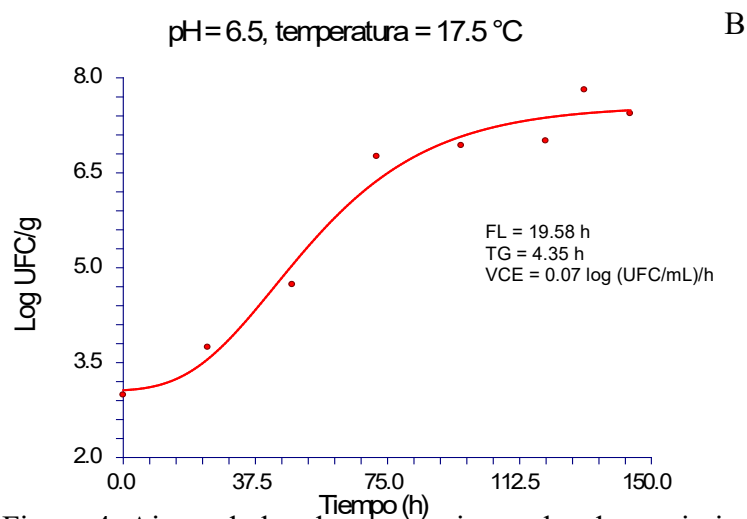
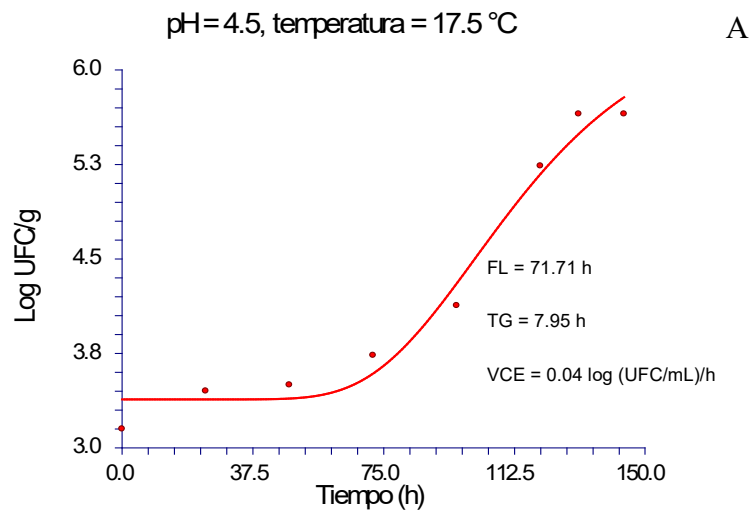


Figura 4. Ajuste de los datos experimentales de crecimiento de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo formulado a pH de A) 4.5 y de B) 6.5, usando el modelo de Gompertz modificado para estimar la fase lag, el tiempo de generación y la velocidad de crecimiento exponencial.

Cuadro 2. Valores experimentales y valores predichos por los modelos de regresión para la fase lag, velocidad de crecimiento exponencial y tiempo de generación de *Listeria monocytogenes* en chorizo de cerdo.

Corrida	Fase lag (h)		VCE [log (UFC/mL)/h]		Tiempo de generación (h)	
	Exp	Pred	Exp	Pred	Exp	Pred
1	116.96	124.17	0.014	-0.005	22.00	22.31
2	48.09	54.76	0.020	0.023	15.32	16.19
3	5.06	9.69	0.14	0.15	2.17	1.46
4	2.37	6.45	0.20	0.17	1.49	1.35
5	71.71	65.69	0.038	0.042	7.95	8.26
6	19.58	14.32	0.069	0.082	4.34	3.85
7	122.55	115.08	0.011	0.001	28.02	27.22
8	3.80	-0.026	0.22	0.21	1.36	1.99
9	10.10	16.76	0.071	0.11	4.25	3.16
10	18.35	16.76	0.089	0.11	3.37	3.16
12	17.26	16.76	0.14	0.11	2.18	3.16
13	19.76	16.76	0.12	0.11	2.52	3.16

VCE = velocidad de crecimiento exponencial

Exp = valor obtenido experimentalmente

Pred = valor predicho por el modelo de regresión

Respecto a los efectos del pH y temperatura de almacenamiento sobre la VCE (incremento en el número de bacterias por unidad de tiempo) de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo, pueden también observarse en las Figuras 3 y 4, respectivamente. El comportamiento de la VCE fue contrario al observado para la FL y TG. Condiciones de pH de 4.5 y 6.5 en el producto resultaron en una VCE de 0.04 log (UFC/mL)/h y 0.07 log (UFC/mL)/h, respectivamente, manteniendo constante la temperatura de almacenamiento (17.5°C). Mientras que condiciones de almacenamiento del producto de 5 y 30 °C a pH constante de 5.5, resultaron en una VCE de 0.01 log (UFC/mL)/h y 0.22 log (UFC/mL)/h, respectivamente.

En el Cuadro 3 se presentan los modelos de regresión para la FL, TG y VCE. Se muestra, además, los coeficientes de determinación (R^2) y la falta de ajuste para cada uno de ellos. Los coeficientes de regresión obtenidos para la FL, TG y VCE de 0.99, 0.99 y 0.95, respectivamente, indican que existe una concordancia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo, tal como se observa en la Figura 5a, 5b y 5c respectivamente. Además, los modelos estimados presentaron un nivel de probabilidad en el error <0.001 y no tuvieron falta de ajuste ($p>0.05$). Estos criterios indican que los modelos describen satisfactoriamente los datos experimentales y pueden ser utilizados para estimar la FL, TG y VCE de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo en función del pH y temperatura de almacenamiento dentro de los límites establecidos en el presente estudio.

De acuerdo a la información presentada en el Cuadro 3, se observa que la temperatura de almacenamiento del producto es el factor que más influye en la FL (CR = - 40.7), TG (CR = - 8.92) y VCE (CR = 0.076) de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo. Los signos negativos de los coeficientes de regresión para la FL y TG, indican que a medida que la temperatura de almacenamiento aumenta, tanto la FL como el TG disminuyen, mientras que el signo positivo del coeficiente de regresión para la VCE indica que cuando la temperatura aumenta, también esta variable lo hace. *L. monocytogenes* es una bacteria capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas (0.4 a 45 °C) con un crecimiento óptimo entre los 30-37 °C. A la temperatura óptima, el movimiento de las moléculas es más rápido, las enzimas aceleran el metabolismo y la bacteria aumenta su población rápidamente; pero, por encima de cierto valor, las enzimas comienzan a desnaturalizarse, el crecimiento celular se detiene y la bacteria muere. A temperaturas más bajas, las moléculas se mueven más lentamente, las enzimas no pueden mediar en las reacciones químicas y la viscosidad del interior de la célula detiene toda la actividad del microorganismo (Jay *et al.*, 2008).

Cuadro 3. Coeficiente de regresión estimados y análisis de varianza de los modelos de regresión para la fase lag, velocidad de crecimiento exponencial y tiempo de generación de *Listeria monocytogenes* en chorizo de cerdo.

	Fase lag		VCE		Tiempo de generación	
	CR	EE	CR	EE	CR	EE
Intercepto	16.76*	3.06	0.10*	0.009	3.16*	0.39
pH	-18.16*	2.42	0.014	0.007	-1.56*	0.31
Temp	-40.70*	2.42	0.076*	0.007	-8.92*	0.31
pH*Temp	16.54*	3.42	0.014	0.011	1.50*	0.44
pH*pH	11.62*	2.59	-0.021*	0.008	1.45*	0.33
Temp*Temp	20.38*	2.59	0.01	0.008	5.72*	0.33
R ²	0.984		0.943		0.994	
Valore <i>p</i>						
Regresión	<0.0001		0.0003		<0.0001	
Falta de ajuste	0.056		0.957		0.377	

VCE = velocidad de crecimiento exponencial

CR = coeficiente de regresión

EE = error estándar

* *p* < 0.05

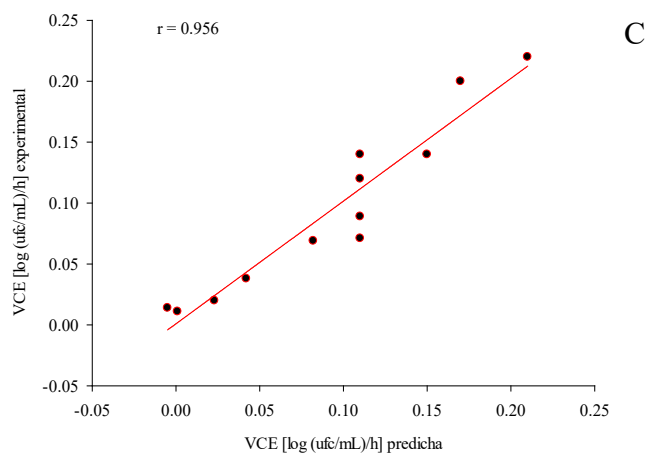
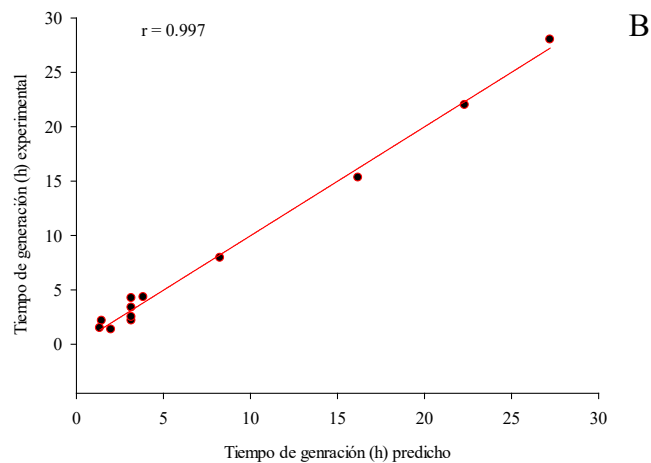
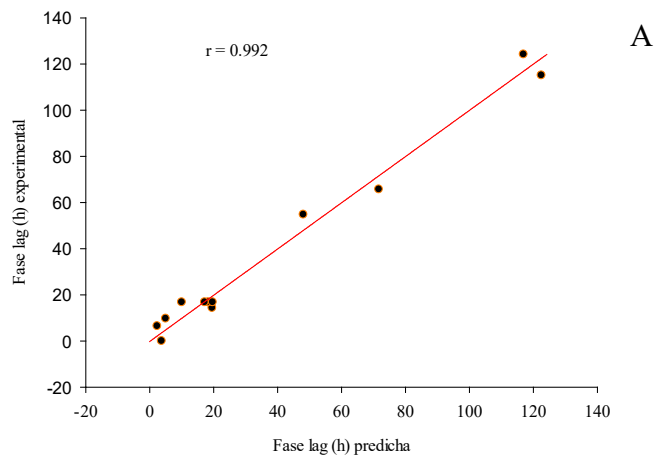


Figura 5. . Relación entre los valores experimentales y predichos por el modelo para A) fase lag, B) tiempo de generación y C) velocidad de crecimiento exponencial de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo.

Por otro lado, se observó un efecto cuadrático importante de la temperatura tanto en la FL como en el TG (CR de 20.38 y 5.72, respectivamente). Estos efectos se aprecian en las gráficas 3D de superficie de respuesta de la Figura 6a, 6b y 6c. Se aprecia una curvatura entre los 20 y 22 °C, donde más allá de ésta temperatura, los valores de la FL y TG permanecen bajos y relativamente constantes, independientemente del pH del producto. Se observó, además, un efecto de interacción entre el pH y temperatura para estas mismas variables (CR para la FL = 16.54 y CR para el TG = 1.50). De acuerdo a la información de la Figura 6a, esta interacción mostró que el efecto del pH es más marcado a bajas temperaturas, pues a temperaturas elevadas, cercanas al óptimo de crecimiento, ésta por sí sola es suficiente para disminuir significativamente estas variables. Es de destacar que entre los 8 y 13 °C de almacenamiento, una disminución del pH en el producto cobra importancia pues limita el crecimiento de *L. monocytogenes*. Por ejemplo, haciendo uso de los modelos de regresión obtenidos, condiciones de pH de 4.8 en el producto almacenado a 10 °C estiman una FL y TG de 115.07 y 20.69 h, respectivamente, significativamente mayores si las condiciones de pH fueran de 6.2, donde el modelo estima una FL y TG de 51.51 y 15.10 h, respectivamente.

Para la VCE, además del efecto lineal de la temperatura, se observó un efecto cuadrático importante del pH (CR = -0.21). Dicho efecto se aprecia visualmente en la gráfica de superficie de respuesta de la Figura 6b. Una disminución del pH, a partir de un valor aproximado de 5.5 mostró un efecto de disminución marcado de la VCE, condición que no se aprecia a valores de pH más allá de 5.5, independientemente de la temperatura de almacenamiento.

A diferencia de otras bacterias patógenas de importancia en alimentos, *L. monocytogenes* es un microorganismo que tiene la capacidad de crecer en un amplio rango de pH (4.0 a 9.6) con un óptimo entre los 6.0 y 8.0. El ácido acético en cantidades de hasta el 5% en chorizo de cerdo, desciende el pH hasta valores de 5.37 (Figura 1), disminuyendo el crecimiento de *L. monocytogenes*, pero no deteniéndolo por completo. De acuerdo Jay *et al.* (2008) cuando la bacteria es colocada en un medio ácido, su habilidad para proliferar depende de la capacidad de modificar su pH interno a un pH más favorable. *L. monocytogenes* lo logra produciendo aminas libres que elevan el pH al decarboxilar aminoácidos por acción de enzimas aminoácido decarboxilasas que se activan a pH ácidos.

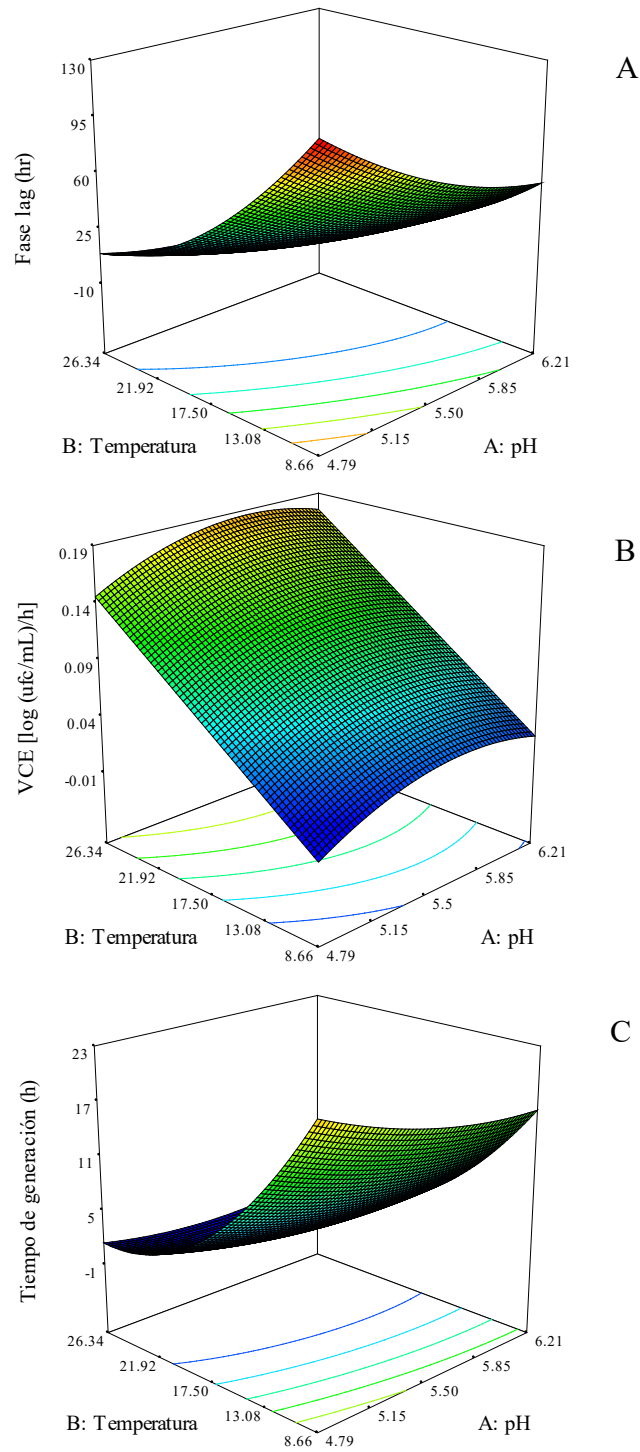


Figura 6. Gráficas de superficie de respuesta de la interacción temperatura y pH para A) fase lag, B) velocidad de crecimiento exponencial y, C) tiempo de generación de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo.

6.3 Importancia de los Modelos de Regresión

L. monocytogenes es uno de los patógenos más virulentos causantes de infecciones alimentarias, con una tasa de mortalidad entre 20% y 30%, más alta que casi todas las restantes tóxicas infecciones alimentarias (Jordan *et al.*, 2018). Por tal razón, en muchos países, incluyendo México, se ha implementado una política de cero tolerancia en alimentos listos para consumir.

En muchos casos, este patógeno está presente en la carne de cerdo en niveles bajos o moderados, pero los alimentos implicados en brotes de listeriosis son aquellos en los que el organismo se ha multiplicado hasta alcanzar niveles significativamente superiores a 3 Log UFC/g debido a su dosis infectiva (Thévenot *et al.*, 2006). Los modelos de predicción, como los aquí propuestos, son útiles para aquellos productores de alimentos que han implementado medidas para cuantificar los riesgos potenciales de crecimiento de patógenos al cambiar las condiciones del medio en que se encuentra el alimento. Por dar un ejemplo y usando la información generada en el presente trabajo, al simular un funcionamiento deficiente del sistema de refrigeración con elevación de la temperatura hasta 25 °C, una sola bacteria de *L. monocytogenes* no sería detectada por los métodos tradicionales en chorizo de cerdo, pero el riesgo de proliferar hasta niveles de 3 Log UFC/g es alto, pues requerirá de solo 16.9 h a pH de 6.2 en el producto ($TG = 1.69 \text{ h} \times 10$ ciclos de duplicación). Con un mejor control del pH del producto, ese riesgo disminuye al aumentar el tiempo de su crecimiento hasta 37.7 h a pH de 4.5 en el producto ($TG = 3.77 \text{ h} \times 10$ ciclos de duplicación), esto bajo las mismas condiciones de abuso de temperatura. Con los modelos aquí propuestos, los riesgos potenciales de crecimiento de *L. monocytogenes* pueden cuantificarse ante cualquier variación de temperatura de almacenamiento y pH del producto, entre los límites de 5 a 30 °C y 4.5 a 6.5, respectivamente.

6.4 Optimización de las Condiciones de Temperatura y pH para Disminuir el Crecimiento de

Listeria monocytogenes

De acuerdo a los límites utilizados en esta investigación para los factores de temperatura (5-30 °C) y de pH (4.5-6.5), las ecuaciones del modelo fueron las siguientes:

$$FL= 16.76 - 18.16A - 40.70B + 16.54AB + 11.62A^2 + 20.38B^2 \dots \text{(Ec. 11)}$$

$$TG=3.16 - 1.56A - 8.92B + 1.50AB + 1.45A^2 + 5.72B^2 \dots \text{(Ec. 12)}$$

$$VCE= 0.10 + 0.014A + 0.076B + 0.014AB - 0.021A^2 + 0.01B^2 \dots \text{(Ec. 13)}$$

Donde:

FL = fase lag (h), TG = tiempo de generación (h), VCE = velocidad de crecimiento exponencial [log (UFC/mL)/h], A = pH, B = temperatura.

Con los modelos de regresión generados en este trabajo, se determinaron las condiciones de temperatura de almacenamiento y pH del producto que minimizan el crecimiento de *L. monocytogenes*. Los resultados indicaron que a condiciones de 8.66 °C y pH en el producto de 4.79, se estimó una FL máxima de 124 h, un TG máximo de 22.3 log UFC/g y una VCE mínima de 0.0135 Log (UFC/mL)/h, siendo éstas las condiciones óptimas que limitan el crecimiento de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo. En un estudio realizado por López-Pino *et al.* (2020) utilizaron un modelo de regresión para predecir el crecimiento de un patógeno bajo efectos combinados de calor y un antimicrobiano concluyendo que el modelo matemático es adecuado para la predicción de crecimiento del patógeno.

7. CONCLUSIÓN

Se modeló el crecimiento de *L. monocytogenes* en función del pH del chorizo de cerdo y la temperatura de almacenamiento.

Una relación entre el pH y el color del producto fue observada; al disminuir los valores de pH en chorizo de cerdo, los valores de L^* y a^* , aumentaron, mientras que el valor b^* disminuyó.

Se generaron modelos de regresión con un alto valor predictivo para predecir la fase lag, tiempo de generación y velocidad de crecimiento exponencial de *L. monocytogenes* en chorizo de cerdo en función del pH y abuso de temperatura de almacenamiento. La temperatura fue el factor que mayor efecto presentó en la FL, TG y VCE. A medida que los valores de pH en el producto disminuyeron, la FL y el TG aumentaron y disminuyó la VCE. Las condiciones óptimas de pH y temperatura que minimizan el TG y VCE, y maximizan la FL fueron: pH = 4.79 y temperatura = 8.66 °C. Bajo estas condiciones, se predice una FL = 142 h, un TG = 22.3 h y una VCE = 0.0135 Log (UFC/mL)/h.

Los modelos generados en el presente estudio pueden ser utilizados por productores de chorizo de cerdo para predecir el riesgo potencial de crecimiento de *L. monocytogenes* al variar el pH del producto y la temperatura de almacenamiento.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda estudiar el comportamiento de otros patógenos de interés como *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7.

El vinagre adicionado al chorizo de cerdo afecta las propiedades de calidad, por eso en futuras investigaciones se requiere estudiar su efecto sobre las propiedades sensoriales del producto, además de su estabilidad a través del tiempo de almacenamiento.

9. REFERENCIAS

- ABPA. (2020). Estatística do Setor. Recuperado de <https://abpa-br.org/mercados/>
- Alvarado, J., Puente, A., Rubio, M., y Villarreal, F. 2017. La cadena de valor de embutidos y otras conservas de carne de cerdo en México. En: N. Oddone, Padilla, R. (Ed.), Fortalecimiento de cadenas de valor rurales. CEPAL Santiago, 29-80 pp.
- Baer, A. A., Miller, M. J., y Dilger, A. C. 2013. Pathogens of interest to the pork industry: a review of research on interventions to assure food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science Food Safety*, 12(2), 183-217.
- Benítez, A., Martínez, C., y Sánchez, S. 2019. Características epidemiológicas y clínicas de los brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Paraguay 2015-2016. *Rev. Salud Pública Parag.*, 9(1), 33-40.
- Bonsaglia, E., Silva, N., Júnior, A. F., Júnior, J. A., Tsunemi, M., y Rall, V. 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food control*, 35(1), 386-391.
- Carhuallanqui-Pérez, A., Salazar-Salvatierra, M. E., y Ramos-Delgado, D. 2020. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(1), 25-33.
- Carvalho, F., Vieira, B., Vallim, D., Carvalho, L., Carvalho, R., Pereira, R., y Figueiredo, E. 2019. Genetic similarity, antibiotic resistance and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat and chicken-meat processing environment in Mato Grosso, Brazil. *LWT*, 109, 77-82.
- Cashman, K. D., y Hayes, A. 2017. Red meat's role in addressing 'nutrients of public health concern'. *Meat science*, 132, 196-203.
- Castañeda-Ruelas, G., Eslava-Campos, C., Castro-del Campo, N., León-Félix, J., y Chaidez-Quiroz, C. 2014. Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Pública de México*, 56(6), 654-659.
- Castro, N., y Salazar, M. 2017. Formación de biopelículas y su resistencia frente a dos desinfectantes en *Listeria monocytogenes* aisladas de embutidos y superficies. *Ciencia e Investigación*, 20(1), 15-20.
- CDC. (2021a). Listeria (Listeriosis). USA. Recuperado de <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>
- CDC. (2021b). Microbios y enfermedades transmitidos por los alimentos. USA. Recuperado de <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/foodborne-germs-es.html>
- Ceniceros, R., Hernández, F., Sandoval, H., Medina, J., y Ramos, M. 2016. Presencia de *Campylobacter* y *Salmonella* en pollo a la venta en Gómez Palacio Durango, México. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 17(6), 1-7.
- Cerón-Carrillo, T., Munguía-Pérez, R., García, S., y Santiesteban-López, N. 2014. Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de chile (*capsicum*). *Revista*

- Iberoamericana de Ciencias*, 1(1), 2334-2501.
- Chambi, A., y Torres-Jiménez, A. 2021. Modelos cinéticos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Saccharomyces boulardii*. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 23(1), 47-54.
- COMECARNE. (2019). Compendio estadístico 2019. Ciudad de México. Recuperado de <https://comecarne.org/compendio-estadistico-2019/>
- de Castilho, N., Todorov, S., Oliveira, L., dos Santos-Bersot, L., y Nero, L. 2020. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fresh sausage by bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* UFV-NPAC1 and its semi-purified bacteriocin. *LWT*, 118, 108757.
- de Frutos, M., López-Urrutia, L., Berbel, C., Allue, M., Herrera, S., Azcona, J. M., Beristáin, X., Aznar, E., Albert, M., y Ruiz, C. 2018. Brote de *Salmonella* Typhimurium monofásica asociada al consumo de carne asada de cerdo. *Revista Española de Quimioterapia*, 31(2), 156.
- Domínguez, D. (2014). Efecto de la refrigeración y la aplicación de ácido láctico sobre la presencia de *Listeria monocytogenes* en canales bovinas en un centro de beneficio de Lima-Perú. (Tesis de Título Profesional), Universidad nacional mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Doyle, M., Loneragan, G., Scott, H., y Singer, R. 2013. Antimicrobial resistance: challenges and perspectives. *Comprehensive Reviews in Food Science Food Safety*, 12(2), 234-248.
- Echeverry, J., Iral, J., y Mazo, S. 2018. Control de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en co-cultivo con *Lactobacillus plantarum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 68-77.
- Evans, E. W., y Redmond, E. C. 2016. Time-temperature profiling of United Kingdom consumers' domestic refrigerators. *Journal of food protection*, 79(12), 2119-2127.
- Fajardo-López, J. 2020. La economía porcícola colombiana 2010-2019. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(40), 5-7.
- FAO. (2014). Control de higiene e inocuidad. USA. Recuperado de <https://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/quality.html>
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., y Stasiewicz, M. 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of food protection*, 77(1), 150-170.
- Ferrer-Romero, J., Mas-Diego, S., Beltrán-Delgado, Y., Rodríguez-Quiala, Y., y Morris-Quevedo, H. 2019. Optimización del medio de cultivo para la producción de biomasa y compuestos fenólicos por *Pleurotus ostreatus* en fase sumergida utilizando la metodología de superficie de respuesta. *Tecnología Química*, 39(1), 1-16.
- Field, D., Ross, R., y Hill, C. 2018. Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. *Current Opinion in Food Science*, 20, 1-6.
- Figueroa-López, A. M., Maldonado-Mendoza, I. E., López-Cervantes, J., Verdugo-Fuentes, A. A., Ruiz-Vega, D. A., y Cantú-Soto, E. U. 2019. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from pork meat and on inert surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(3), 817-824.
- Forero, Y., Galindo-Borda, M., y Ramírez, G. 2017. Patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes escolares de Colombia. *Revista chilena de*

nutrición, 44(4), 325-332.

- Frausto, J. J., Gutierrez, S., Farias, T., Sánchez, M., López, M., Elisondo, A., Almanza, M., Maciel, A., y Villarruel, C. 2019. Calidad sanitaria de la longaniza y chorizo artesanal que se comercializa en la Región Altos Sur del Estado de Jalisco. *Avances de Investigación en Inocuidad de Alimentos*, 2.
- Fujikawa, H., y Morozumi, S. 2006. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology*, 23(3), 260-267.
- García-Jiménez, F., Romero-Castillo, P., y Reyes-Dorantes, A. J. P. 2018. Presencia de carotenoides en chile ancho y pasilla (*Capsicum annum* L.) en muestras de 10 años y recientes. (46), 259-272.
- González-Rivas, F., Umaña, F., y Jerez, J. 2016. Biofilms: contaminación cruzada en industria alimentaria. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 28(29), 215-234.
- Graciano-Cristóbal, M., Sumaya-Martínez, M., Balois-Morales, R., Rodríguez-Carpena, J., Jiménez-Ruiz, E., Bautista-Rosales, P., y Madrigal-Santillán, E. 2017. Efecto antimicrobiano de aditivos naturales en carne de cerdo cruda. *Rev. Acta Agrícola y Pecuaria*, 3(2), 32-40.
- Gudbjörnsdóttir, B., Suihko, M. L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjöberg, A. M., y Bredholt, S. 2004. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology*, 21(2), 217-225.
- Gutiérrez, R., Alquicira, E. P., Varela, D. B., y Chabela, M. d. L. P. 2020. Prevalencia de microorganismos patógenos en carne de cerdo al menudeo en supermercados de la Ciudad de México. *Nacameh*, 14(1), 31-40.
- Hung, Y.-T., Liu, C.-T., Peng, I.-C., Hsu, C., Yu, R.-C., y Cheng, K.-C. 2015. The implementation of a Hazard Analysis and Critical Control Point management system in a peanut butter ice cream plant. *Journal of food drug analysis*, 23(3), 509-515.
- Ibrahim, S., Yang, H., y Seo, C. 2008. Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Chemistry*, 109(1), 137-143.
- İncili, G., Akgöl, M., Aydemir, M., Alan, S., Mutlu, M., İlhak, O., y Öksüztepe, G. 2020. Fate of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in homemade marinade and on marinated chicken drumsticks, wings and breast meat. *LWT*, 134, 110231.
- Jackson, V., Blair, I. S., McDowell, D. A., Kennedy, J., y Bolton, D. J. 2007. The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. . *Food control*, 18(4), 346-351.
- Jaramillo-López, E., Peraza-Mercado, G., y Itzá-Ortiz, M. 2020. Edad de sacrificio y tiempo de muestreo sobre pH y color de la carne de ovinos de pelo. *Abanico veterinario*, 10.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., y Golden, D. A. 2008. Modern food microbiology: Springer Science & Business Media. New York. 810 pp
- Jordan, K., y McAuliffe, O. 2018. *Listeria monocytogenes* in foods. *Advances in food nutrition research*, 86, 181-213.

- Juneja, V. K., y Eblen, B. S. 2000. Heat inactivation of *Salmonella typhimurium* DT104 in beef as affected by fat content. *Letters in Applied Microbiology*, 30(6), 461-467.
- Juneja, V. K., y Novak, J. S. 2003. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in cook-in-bag ground beef as affected by pH and acidulant. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(3), 297-304.
- JVARM. 2013. A report on the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring system 2008 to 2011. *National Veterinary Assay Laboratory*, 88.
- Kahraman, T., Cetin, O., Dumen, E., y Buyukunal, S. K. 2010. Incidence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on equipment surfaces and personnel hands in meat plants. *Revue De Medecine Veterinaire*, 162(3), 108-113.
- Karyotis, D., Skandamis, P., y Juneja, V. 2017. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in sous-vide processed marinated chicken breast. *Food Research International*, 100, 894-898.
- Laranjo, M., Potes, M., Véstia, J., Fraqueza, A., Gomes, M., y Elias, M. 2018. Adición de vinagre para prolongar la vida útil de la cabeza de xara. *Archivos de Zootecnia*, 67, 197-200.
- Lee, Y. J., Jung, B. S., Yoon, H. J., Kim, K. T., Paik, H. D., y Lee, J. Y. 2014. Predictive model for the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in raw pork meat as a function of temperature. *Food control*, 44, 16-21.
- Leong, D., Alvarez-Ordóñez, A., y Jordan, K. 2014. Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. *Frontiers in Microbiology*, 5, 436.
- Lewis, G., Schweig, M., Guillén-Pinto, D., y Rospigliosi, M. L. 2017. Meningitis neonatal en un hospital general de Lima, Perú, 2008 al 2015. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34, 233-238.
- Lianou, A., Panagou, E. Z., y Nychas, G.-J. E. 2017. Meat Safety—I Foodborne Pathogens and Other Biological Issues. En: Lawrie' s Meat Science. Elsevier, 521-552 pp.
- López-Pino, J. I., Valenzuela-Melendres, M., Camou, J. P., González-Ríos, H., Ayala-Zavala, F., y Peña-Ramos, A. 2020. Predicción de la resistencia térmica de *Escherichia coli* O157: H7 en carne molida de res en función de la temperatura y las concentraciones de carvacrol y grasa. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 23, 47-54.
- López, L. (2016). Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes. (Tesis de Pregrado), Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.
- Martínez-Suárez, J. V., Ortiz, S., y López-Alonso, V. 2016. Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, 7, 638.
- Maung, A. T., Mohammadi, T. N., Nakashima, S., Liu, P., Masuda, Y., Honjoh, K.-i., y Miyamoto, T. 2019. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat in Fukuoka, Japan. *International journal of food microbiology*, 304, 49-57.
- McKellar, R. C., y Lu, X. 2003. Modeling microbial responses in food: CRC press. Canada. 343 pp

- Méndez-Zamora, G., García-Macías, J., Durán-Meléndez, L., Herman-Lara, E., Santellano-Estrada, E., y Silva-Vázquez, R. 2015. Aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) en variables de calidad de la canal de pollo. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), 41-51.
- Molina-Moreno, S. N., Mercado-Reyes, M., y Carrascal-Camacho, A. K. 2009. Efecto de tiempo y temperatura de cocción en chorizo inoculados artificialmente con *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*, 14(2-3), 198-205.
- Montiel, R., Peiróten, Á., Ortiz, S., Bravo, D., Gaya, P., Martínez-Suárez, J., Tapiador, J., Nuñez, M., y Medina, M. 2020. Inactivation of *Listeria monocytogenes* during dry-cured ham processing. *International journal of food microbiology*, 318, 108469.
- OMS. (2016). Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Washington, D.C. Recuperado de https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=es
- Palomino-Camargo, C., y González-Muñoz, Y. 2014. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31, 535-546.
- Puche, Y., Villadiego, A., y Correa, D. 2017. Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos. *Biotechnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 15(1), 56-65.
- Purba, R., Suseno, S. H., Izaki, A. F., y Muttaqin, S. 2014. Application of liquid smoke and chitosan as natural preservatives for tofu and meatballs. *International Journal of Applied Science and Technology*, 4(2), 212-217.
- Rodrigues, C., Sá, C., y Melo, C. 2016. An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. *Ciência Rural*, 47(2), 1-8.
- Rodríguez-Auad, J. P. J. R. c. d. i. 2018. Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. 35(6), 649-657.
- Rodríguez, M., y Lemma, A. 2012. Diseño experimental y optimización de procesos. 2012 (Vol. 2): Ediciones casa do espiritu amigo fraternidad fe e amor, Campinas. Brazil. 358 pp
- Rojas-Allieri, A. R. (2019). Determinación de la concentración de Coliformes totales y *Escherichia coli*, en carne molida en sitios de comercialización en la ciudad de Guayaquil. (Tesis de Título en Ingeniería ambiental), Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil, Guayaquil.
- Romero, A., Viesca-González, F., y Hernandez-Tellez, M. 2010. Formación del patrimonio gastronómico del Valle de Toluca, México. *Ciencia Ergo Sum*, 17(3), 239-252.
- Ross, T., y McMeekin, T. A. 1994. Predictive microbiology. *International journal of food microbiology*, 23(3-4), 241-264.
- Ross, T., Ratkowsky, D., Mellefont, L., y McMeekin, T. 2003. Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology*, 82(1), 33-43.
- Ruiz, M., Colello, R., Padola, N., y Etcheverría, A. 2017. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. *Revista argentina*

de microbiología, 49(2), 174-177.

- Sánchez-Valdés, J., Colín-Navarro, V., López-González, F., Avilés-Nova, F., Castelán-Ortega, O., y Estrada-Flores, J. 2016. Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan, Estado de México. *Salud Pública de México*, 58, 461-467.
- Sánchez, A. L. B., Garcíab, O. D., Domínguez-López, A., Coteroc, D. A., y Quintero-Salazar, B. J. R. M. C. P. 2019. Hygienic quality of the traditional red chorizo commercialized in the city of Toluca, State of Mexico. 10(1), 172-185.
- Sapuan, S., Kortsalioudaki, C., Anthony, M., Chang, J., Embleton, N., Geethanath, R., Gray, J., Greenough, A., Lal, M., y Luck, S. 2017. Neonatal listeriosis in the UK 2004–2014. *Journal of Infection*, 74(3), 236-242.
- Self, J. L., Luna-Gierke, R. E., Fothergill, A., Holt, K. G., y Vieira, A. R. 2017. Outbreaks attributed to pork in the United States, 1998–2015. *Epidemiology Infection*, 145(14), 2980-2990.
- Sengun, I. Y., Turp, G. Y., Cicek, S. N., Avci, T., Ozturk, B., y Kilic, G. 2021. Assessment of the effect of marination with organic fruit vinegars on safety and quality of beef. *International journal of food microbiology*, 336, 108904.
- SIAP. (2019). Servicio de Información y Estadística agroalimentaria y pesquera. México. Recuperado de <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>
- SIAP. (2021). Producción Ganadera. México. Recuperado de <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>
- Soto, Z., Pérez, L., y Estrada, D. 2016. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105-122.
- Thévenot, D., Dernburg, A., y Vernozy-Rozand, C. 2006. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), 7-17.
- Torres-Intriago, C., y Vera Sánchez, G. (2019). Efecto del porcentaje de ácido acético en la vida útil de una conserva de pollo desmenuzado en escabeche. (Tesis de Título de Ingeniero Agroindustrial), ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ, Calceta.
- Tremarin, A., Aragão, G., Salomão, B., Brandão, T., y Silva, C. 2017. Modeling the soluble solids and storage temperature effects on *Byssoschlamys fulva* growth in apple juices. *Food Bioprocess Technology*, 10(4), 720-729.
- Troncoso, A. 2018. Pátógenos emergentes de interés alimentario y gestión de riesgos En: A. B. de Porrata-Doria (Ed.), Nuevas tendencias en microbiología de alimentos. PUBLICACIONES UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI, Tarragona, 26-27 pp.
- Velasco, J., Simental, S., Rodríguez, R., Álvarez, G., Pastrana, B., y Tenorio, R. G. 2014. Evaluación de parámetros de calidad de chorizos elaborados con carne de conejo, cordero y cerdo, adicionados con fibra de trigo. *Nacameh*, 8(1), 50-64.
- Weinroth, M., Britton, B., y Belk, K. 2018. Genetics and microbiology of meat. *Meat science*, 144, 15-21.

- Ye, K., Wang, H., Zhang, X., Jiang, Y., Xu, X., y Zhou, G. 2013. Development and validation of a molecular predictive model to describe the growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged chilled pork. *Food control*, 32(1), 246-254.
- Zapata-Álvarez, A., Mejía, C., y Restrepo-Molina, D. 2019. Efecto Protector de un Antimicrobiano Natural Frente a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* y *E. coli* en Salchicha y Mortadela. *Información tecnológica*, 30(2), 235-244.