

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

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MODELOS PREDICTIVOS DINÁMICOS
DEL CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* EN PRODUCTOS
CÁRNICOS PREVIO AL PROCESO DE COCCIÓN**

POR

Q.F.B. GUSTAVO RAMÍREZ BARRERA

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

COMO REQUISITO PARCIAL OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Octubre de 2011

APROBACIÓN

Los miembros del comité de tesis han aprobado satisfactoriamente la tesis de Gustavo Ramirez Buitera la cual cumple con los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestría en Ciencias en CIAD.

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos a CIAD, A.C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis.

Dr. Parshwardar Thoparandi

Firmado

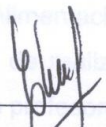
Dr. Juan F. Pacheco Aguilar


Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General

APROBACIÓN

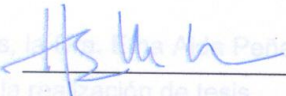
Los miembros del comité para revisar la tesis de Gustavo Ramírez Barrera, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias en CIAD.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., por abrirme las puertas y darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y por el conocimiento transmitido.

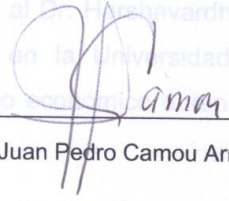

Dra. Etna Aida Peña Ramos
Directora de tesis

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante el tiempo que permaneci en el programa de maestría.

A mi directora de tesis, Dra. Etna Aida Peña Ramos, por su confianza, ayuda y disposición durante la realización de mi tesis.

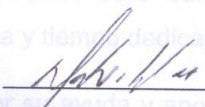

Dr. Harshavardhan Thippareddi

Un agradecimiento especial al Dr. Harshavardhan Thippareddi, por abrirme las puertas de su laboratorio en la Universidad de Nebraska-Lincoln, por su confianza, paciencia y apoyo durante el desarrollo experimental de mi tesis.


Dr. Juan Pedro Camou Arriola

A mis asesores el Dr. Juan Pedro Camou Arriola y M.C. Martín Valenzuela Melendres, por su ayuda y tiempo dedicado durante mis estudios.

Al grupo de Carnes, por abrirme las puertas de mi estancia en este centro de investigación. Especialmente a la M.C. Libertad Zamorano y a German Cumpido.


M.C. Martín Valenzuela Melendres

A esas excelentes personas que me acompañaron durante mi estancia en el CIAD, Nalleli Pérez, Sarahi Rangel, Ana Luisa Martínez, Vanessa Saracho y Nidia Valenzuela.

Muchas Gracias

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., por abrirme las puertas y darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y por el conocimiento transmitido por mis profesores.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante el tiempo que permanecí en el programa de maestría.

A mi directora de tesis, la Dra. Etna Aida Peña Ramos, por su confianza, ayuda y disposición durante la realización de tesis.

Un agradecimiento especial al Dr. Harshavardhan Thippareddi, por abrirme las puertas de su laboratorio en la Universidad de Nebraska-Lincoln, por su confianza, paciencia y apoyo económico durante el desarrollo experimental de mi tesis.

A mis asesores el Dr. Juan Pedro Camou Arriola y M.C. Martín Valenzuela Melendres, por su ayuda y tiempo dedicado durante mis estudios.

Al grupo de Carnes, por su ayuda y apoyo durante mi estancia en este centro de investigación.

A esas excelentes personas que me acompañaron durante mi estancia en el CIAD, Nalleli Pérez, Sarahí Rangel, Ana Luisa Martínez, Vanessa Saracho y Nidia Valenzuela.

Muchas Gracias

DEDICATORIAS

A Mis Padres:

Gustavo y Catalina, por apoyarme en cada decisión de vida que he tomado, la confianza depositada en mí y por el apoyo incondicional.

A Mis Hermanos:

Aminta y Julio, por el apoyo y cariño que me han proporcionado durante su vida.

Gracias...

INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	IX
INDICE DE TABLAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	3
2.1.MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA.....	3
2.1.1.MODELOS MATEMÁTICOS.....	4
2.1.1.1.PRIMARIOS.....	4
2.1.1.2.SECUNDARIOS.....	7
2.1.1.3.TERCARIOS.....	8
2.1.1.4.DINÁMICOS.....	10
2.1.2.VALIDACIÓN DE MODELOS MATEMÁTICOS.....	11
2.1.3.MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA EN LA INDUSTRIA CÁRNICA.....	13
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.2.1.ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA.....	19
2.2.2.RESERVORIOS.....	21
2.2.3.INTOXICACIÓN ESTAFILOCÓCICA.....	22
2.2.3.1.ETIOLOGÍA.....	22
2.2.3.2.INCIDENCIA.....	22
2.2.4.DESARROLLO DE <i>S. aureus</i> EN PRODUCTOS CÁRNICOS.....	23

2.3.MODELOS PREDICTIVOS DE <i>S. aureus</i>	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	27
4.1.OBJETIVO GENERAL.....	27
4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1.PREPARACIÓN DEL ROAST BEEF (RB)	28
5.2.PREPARACIÓN DEL JAMÓN DE CERDO.....	28
5.3.pH Y Aw	29
5.4.CUANTIFICACIÓN DE LA MICROFLORA INICIAL	30
5.5.ACTIVACIÓN INICIAL E INOCULACIÓN de CEPAS DE <i>S. aureus</i>	30
5.6.CRECIMIENTO DE <i>S. aureus</i> EN CONDICIONES ISOTÉRMICAS	31
5.7.CRECIMIENTO DE <i>S. aureus</i> EN CONDICIONES DINÁMICAS	31
5.8.MODELACIÓN MATEMÁTICA.....	32
5.8.1.MODELO PRIMARIO	32
5.8.2.MODELO SECUNDARIO	34
5.8.3.MODELO DINÁMICO	35
5.9.VALIDACIÓN.....	36
5.10.ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1.CARACTERÍSTICAS INICIALES ROAST BEEF y JAMÓN.....	38
6.2.CRECIMIENTO DE <i>S. aureus</i> EN CONDICIONES ISOTÉRMICAS	40

6.3.MODELOS PRIMARIOS	45
6.4.MODELOS SECUNDARIOS	48
6.5.MODELOS DINÁMICOS	53
6.6.VALIDACIÓN DEL MODELO DINÁMICO DEL CRECIMIENTO DE <i>S. aureus</i> EN ROAST BEEF	54
6.6.1.VALIDACIÓN CON ROAST BEEF-MODELO.....	54
6.6.2.VALIDACIÓN CON ROAST BEEF CON ANTIMICROBIANOS.....	57
6.7.VALIDACIÓN DEL MODELO DINÁMICO DEL CRECIMIENTO DE <i>S. aureus</i> EN JAMÓN DE CERDO	59
6.7.1.VALIDACIÓN CON JAMÓN-MODELO.....	59
6.7.2.VALIDACIÓN CON JAMÓN CON ANTIMICROBIANOS.....	62
6.8.EFECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS NATURALES.....	64
6.8.1.EFECTO SOBRE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS	64
6.8.2.EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>S. aureus</i>	65
7. CONCLUSIÓN	70
8. BIBLIOGRAFÍA	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de <i>S. aureus</i> de 20°C a 45°C en roast beef previo a la cocción ajustado al modelo de Baranyi.....	41
Figura 2. Crecimiento de <i>S. aureus</i> a 20°C a 45°C en jamón previo a la cocción ajustado al modelo de Baranyi.....	42
Figura 3. Velocidad máxima de crecimiento en función de la temperatura de <i>S. aureus</i> en roast beef crudo ajustada al modelo de Ratkowsky.....	49
Figura 4. Velocidad máxima de crecimiento en función de la temperatura de <i>S. aureus</i> en jamón previo a la cocción ajustada al modelo de Ratkowsky...	49
Figura 5. Crecimiento real de <i>S. aureus</i> en función de la temperatura en roast beef previo a la cocción ajustada al modelo de Ratkowsky.....	52
Figura 6. Crecimiento real de <i>S. aureus</i> en función de la temperatura en jamón previo a la cocción ajustada al modelo de Ratkowsky.....	52
Figura 7. Validación del modelo dinámico de <i>S. aureus</i> en RB-modelo previo a la cocción bajo un perfil de temperatura sinusoidal (10-40°C, 8h/ciclo) por 196 h.....	55
Figura 8. Validación del modelo dinámico de <i>S. aureus</i> en RB-modelo previo a la cocción bajo un perfil de calentamiento exponencial (5-60°C) por 24 h.....	55
Figura 9. Validación del modelo dinámico de <i>S. aureus</i> en roast beef con antimicrobianos previo a la cocción bajo un perfil de temperatura sinusoidal (10-40°C, 8h/ciclo) por 196 h.....	58
Figura 10. Validación del modelo dinámico de <i>S. aureus</i> en roast beef con antimicrobianos previo a la cocción bajo un perfil de calentamiento exponencial (5-60°C) por 24 h.....	58
Figura 11. Validación del modelo dinámico de <i>S. aureus</i> en jamón-modelo previo a tratamiento térmico bajo un perfil de temperatura sinusoidal (10-40°C, 8h/ciclo) por 196 h.....	60

Figura 12. Validación del modelo dinámico de <i>S. aureus</i> en jamón-modelo previo a tratamiento térmico bajo un perfil de calentamiento exponencial (5-60°C) por 24 h.....	60
Figura 13. Validación del modelo dinámico de <i>S. aureus</i> en jamón con antimicrobianos previo a cocción bajo un perfil de temperatura sinusoidal (10-40°C, 8h/ciclo) por 196 h.....	63
Figura 14. Validación del modelo dinámico de <i>S. aureus</i> en jamón previo a tratamiento térmico bajo un perfil de calentamiento exponencial (5-60°C) por 24 h.....	63
Figura 15. Efecto los antimicrobianos sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> en roast beef previo a la cocción un perfil de temperatura sinusoidal (10-40°C, 8h/ciclo) por 196 h.....	66
Figura 16. Efecto los antimicrobianos sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> en roast beef previo a la cocción bajo un perfil de calentamiento exponencial (5-60°C) por 24 h.....	66
Figura 17. Efecto de los antimicrobianos sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> en jamón previo a la cocción bajo un perfil de temperatura sinusoidal (10-40°C, 8h/ciclo) por 196	67
Figura 18. Efecto de los antimicrobianos sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> en jamón previo a la cocción bajo un perfil de calentamiento exponencial (5-60°C) por 24 h.....	67

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modelos predictivos.....	6
Tabla 2. Modelos predictivos desarrollados para la industria cárnica.....	15
Tabla 3. Límites de varios factores ecológicos para el desarrollo de <i>S. aureus</i>	23
Tabla 4. Parámetros de ajuste del modelo de Baranyi y criterios estadísticos de evaluación de ajuste de las curvas isotérmicas de crecimiento de <i>S. aureus</i> en roast beef previo a la cocción.....	46
Tabla 5. Parámetros de ajuste del modelo de Baranyi y criterios estadísticos de evaluación de ajuste de las curvas isotérmicas de crecimiento de <i>S. aureus</i> en jamón de cerdo previo a la cocción.....	47
Tabla 6. Parámetros de entrada del modelo dinámico.....	54
Tabla 7. Comparación de varios criterios estadísticos para la validación del modelo predictivo de <i>S. aureus</i> en roast beef previo a proceso de cocción.....	56
Tabla 8. Comparación de varios criterios estadísticos para la validación del modelo predictivo de <i>S. aureus</i> en jamón previo a proceso de cocción.....	61
Tabla 9. Efecto de los antimicrobianos sobre los parámetros fisicoquímicos iniciales de ambos productos cárnicos previo a la cocción.....	65

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar modelos dinámicos para estimar el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en roast beef (RB) y jamón de cerdo, previo al proceso de cocción, en condiciones fluctuantes de temperatura. Para el desarrollo de los modelos se elaboraron RB (RB-modelo) y jamón (jamón-modelo) a partir de una formulación la cual contenía los ingredientes básicos de ambos productos cárnicos. Estos productos cárnicos fueron inoculados con *S. aureus* e incubados a 12.5, 15, 20, 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 37.5, 40, 42.5, 45 y 47.5°C. Cada curva de crecimiento a temperatura constante fue ajustada al modelo primario de Baranyi, del cual se derivó la velocidad máxima de crecimiento, μ_{max} , y la carga máxima alcanzada, y_{max} . El efecto de la temperatura sobre estos parámetros fue ajustado al modelo de Ratkowsky. El modelo dinámico para predecir el crecimiento de *S. aureus* resultó de la combinación de las ecuaciones diferenciales del modelo de Baranyi y el modelo de la μ_{max} de Ratkowsky, al cual se le sustituyeron los parámetros específicos de crecimiento de *S. aureus* en cada matriz cárnica (y_0 , y_{max} , h_0 , a , b , T_{min} y T_{max}). La validación de los modelos dinámicos se realizó tanto en RB-modelo como en jamón-modelo con o sin los antimicrobianos MOstatin LV (RB-MO y jamón-MO) ó PURASAL Optiform S 4 (RB-Opt y jamón-Opt). Todos los productos fueron sometidos a dos perfiles de fluctuación de temperatura, un sinusoidal (10-40°C, 8 h/ciclo, 192 h) y un calentamiento exponencial (5-60°C, 24 h). Por último, el efecto de estos antimicrobianos sobre *S. aureus* fue determinado a partir de los datos derivados de los perfiles de temperatura fluctuantes. Tanto en RB, como en jamón, *S. aureus* no creció a 12.5, 15 y 47.5°C. El modelo de Baranyi mostró un buen ajuste sobre las curvas de crecimiento de 20 a 45°C de ambos productos. De igual manera, la ecuación de Ratkowsky mostró un buen ajuste al modelar el efecto de la temperatura sobre la μ_{max} y y_{max} . Los estudios de validación (perfil sinusoidal y exponencial)

mostraron que el modelo dinámico RB sobreestimó el crecimiento de *S. aureus* en RB-modelo. Contrariamente al modelo dinámico de jamón de cerdo, que subestimó el crecimiento de *S. aureus* en jamón-modelo. En los estudios de validación en los productos con antimicrobiano, en todos los tratamientos se observó sobreestimación por parte de sus respectivos modelos. Tanto en RB como en jamón, se observó un efecto bacteriostático por ambos antimicrobianos. La inhibición de *S. aureus* fue mayor en los tratamientos que incluyeron MOstatin LV en su formulación. El desarrollo de modelos predictivos del crecimiento de *S. aureus* y su validación, al igual que la determinación del efecto de los antimicrobianos sobre su desarrollo son importantes para asegurar la inocuidad de los productos cárnicos.

1. INTRODUCCIÓN

La microbiología predictiva es una herramienta estadístico-matemática que mediante el uso de modelos matemáticos estima la carga microbiana presente en el alimento cuando se conocen las condiciones en que éste se mantuvo. Existen varios tipos de modelos, entre ellos los primarios, los secundarios y los dinámicos. Los modelos primarios describen el desarrollo microbiano bajo condiciones ambientales constantes. En los modelos secundarios se observa cómo los parámetros derivados de los modelos primarios son afectados por las condiciones ambientales. Los modelos dinámicos, son una integración de los primarios y secundarios, los cuales predicen el crecimiento microbiano bajo condiciones fluctuantes ambientales.

Los modelos dinámicos modelos antes de aplicarse en situaciones reales deben ser validados. Todo esto, con el objetivo de asegurar que los modelos predicen el crecimiento microbiano de manera precisa, ya que estos serán utilizados durante la implementación de sistemas de seguridad alimentaria y evaluación de riesgos microbianos. La validación generalmente se realiza en condiciones las cuales no han sido probadas anteriormente en la matriz utilizada para el desarrollo del modelo. Sin embargo, en la industria alimenticia las formulaciones varían dependiendo del productor, por lo que, es necesario observar si los modelos son capaces de predecir el crecimiento microbiano cuando se incluyen otros ingredientes, tal como los antimicrobianos. Entre las bacterias de interés a modelar en la industria cárnica se encuentra *Staphylococcus aureus*.

La importancia de *S. aureus* en la industria cárnica es que algunos productos cárnicos, principalmente el jamón, han sido los vehículo implicados en brotes de intoxicación estafilocócica. El causante de la enfermedad no es en si la presencia de las células vegetativas en el alimento, si no, una enterotoxina producida por este patógeno. Ésta no es mortal en personas sanas, y

generalmente causa una intoxicación que no va más allá de diarrea y vómito, y los síntomas desaparecen a más tardar en 24 horas. Este padecimiento, aunque no causa daños considerables a la salud, sí trae repercusiones económicas y sociales que podrían evitarse. La enterotoxina es producida cuando se alcanza una carga estafilococos de 10^5 UFC/g. Debido a que es resistente a temperaturas de cocción, es importante evitar su presencia en el producto cárnico crudo. Mediante el desarrollo de un modelo dinámico que estime la carga de estafilococos presente en ellos, se podría asegurar la inocuidad del producto crudo. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue desarrollar modelos predictivos dinámicos del crecimiento de *S. aureus* en roast beef y jamón de cerdo previos al proceso de cocción y validarlos en condiciones fluctuantes de temperatura utilizando diferentes formulaciones cárnicas.

2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

2.1. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

En la actualidad, la industria alimentaria se basa en la tecnología de barreras, las técnicas clásicas y las pruebas rápidas para asegurar la inocuidad de los alimentos. Las técnicas clásicas son poco prácticas en la industria por su baja sensibilidad y lentitud, y las pruebas rápidas son costosas y aún requieren de pasos de pre-enriquecimiento para dar una respuesta detectable. En base a esto, una alternativa es la microbiología predictiva (McMeekin *et al.*, 2002).

La microbiología predictiva es una ciencia cuantitativa que evalúa de manera objetiva la respuesta microbiana hacia condiciones ambientales, como el efecto de las operaciones de procesamiento, distribución y almacenamiento sobre la seguridad y calidad microbiológica de los alimentos (McMeekin *et al.*, 2002). Esta es una herramienta estadístico-matemática donde las observaciones son resumidas en forma de modelos matemáticos con el objetivo de pronosticar la evolución cuantitativa de las poblaciones microbianas en la matriz alimentaria en tiempo real (Ferrer *et al.*, 2009; Velugoti *et al.*, 2010).

El desarrollo microbiano en los alimentos es un proceso de tres fases: latencia, exponencial y estacionaria. Los modelos en alimentos se enfocan en el efecto de la temperatura sobre las primeras dos fases, asumiendo que, si la población microbiana alcanza la fase estacionaria, el producto está deteriorado o representa un riesgo para la salud del consumidor (Tirado *et al.*, 2005).

Estos modelos tienen varias aplicaciones, principalmente en la industria. Algunos ejemplos en los que se hace uso de ellos son: durante la implementación de sistemas de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP), evaluación de riesgos microbianos, determinación de vida de anaquel microbiana, determinación de la calidad e inocuidad microbiana a partir del historial de temperatura del producto, entre otros (Tirado *et al.*, 2005).

2.1.1. MODELOS MATEMÁTICOS

Los modelos predictivos son formas simplificadas de representar la realidad aunque son herramientas de decisión de soporte útiles (Blocklehurst, 2004). Estos son expresiones matemáticas que describen el desarrollo, sobrevivencia, inactivación o proceso bioquímico de los microorganismos encontrados en alimentos (McDonald y Sun, 1999). Los modelos clásicos utilizados en la microbiología predictiva usualmente describen las poblaciones en base a variables macroscópicas (temperatura, pH o densidad celular) e individuales promedio (masa media) (Ferrer *et al.*, 2009).

Para que los modelos matemáticos sean una buena herramienta para la industria alimenticia y los consumidores, estos deben de ser: 1) validados en el propio alimento más que en el medio de cultivo, 2) tener en cuenta el efecto acumulativo de cualquier fluctuación de temperatura durante el procesamiento y distribución y 3) tener en cuenta la carga microbiana inicial, la cual es usualmente desconocida y puede estar por debajo del límite de detección (Shimonu y Labuza, 2000).

La clasificación propuesta por Whiting y Buchanan (1993) agrupa a los diferentes tipos de modelos en primarios, secundarios y terciarios.

2.1.1.1. PRIMARIOS

Los modelos primarios describen el cambio del número de células microbianas respecto al tiempo bajo condiciones ambientales constantes. El efecto sobre el desarrollo de los microorganismos en condiciones específicas puede medirse directamente por cuenta total viable, producción de toxina o metabolitos, o indirectamente por absorbancia, densidad óptica o impedancia. A partir de la curva obtenida y utilizando el modelo primario se genera información importante del comportamiento del microorganismo. Los

parámetros resultantes son el tiempo de generación (Tg), duración de la fase de latencia (λ), velocidad máxima de crecimiento exponencial (μ_{max}) y densidad máxima de población (y_{max}) (McDonald y Sun, 1999).

Muchos modelos empíricos primarios tal como el de Gompertz modificado y el Logístico han sido desarrollados para describir la curva de crecimiento bacteriano en condiciones isotérmicas (Velugoti *et al.*, 2010). Gibson *et al.* (1987), introdujeron por primera vez en la microbiología de alimentos estas dos funciones (Tabla 1). Ambas ecuaciones describen la cinética de crecimiento mediante ecuaciones diferenciales.

El modelo Logístico originalmente describe una curva sigmoide en un plano cartesiano ordinario, pero la curva de crecimiento bacteriano es un gráfico generalmente semisigmoide. Por esto, el modelo Logístico no puede producir una curva sigmoide en este gráfico, dando como resultado una curva sin fase de latencia. La modificación de Gibson *et al.* (1987) consistió en ajustar las curvas bacterianas de crecimiento a un gráfico semilogarítmico, aun así, este modelo carece de fase de latencia y da resultados de menor calidad respecto a Gompertz (Tirado *et al.*, 2005; Fujikawa y Morozumi, 2006).

El modelo de Gompertz modificado y propuesto por Gibson *et al.* (1987) se basa en que los cambios en la velocidad específica de crecimiento son inducidos por la limitación de nutrientes y la producción de metabolitos tóxicos (Shimoni y Labuza, 2000). Este es el modelo primario empírico más utilizado y genera una curva asimétrica que simula las fases de latencia, exponencial y estacionaria. El inconveniente es que subestima la velocidad de crecimiento, requiere de datos a lo largo de las fases de latencia, exponencial y estacionaria para una buena predicción y para modelos con temperatura fluctuante, sus parámetros deben ser obtenidos a partir de modelos secundarios (Tirado *et al.*, 2005).

Tabla 1. Modelos predictivos.

Modelo	Ecuación	Parámetros
Logístico¹	$y(t) = \frac{A + C}{\{+\exp[-B(t - M)]\}}$	y = cuenta microbiana al tiempo t A = inóculo inicial C = diferencia entre población inicial y final
Gompertz¹	$y(t) = A + C \exp \{-\exp[-B(t - M)]\}$	y ₀ = densidad poblacional inicial y _{max} = densidad máxima poblacional B = velocidad de crecimiento relativa M = tiempo al cual se da B en horas
	$\lambda = M - \left(\frac{1}{B}\right) + \frac{\text{Log}N(0) - A}{BC/e}$	λ = duración de la fase de latencia
	$\mu_{\max} = \frac{BC}{e} \quad Tg = \frac{\log(2)e}{BC}$	μ _{max} = velocidad máxima de crecimiento
Baranyi²	$y(t) = y_0 - \mu_{\max} F(t) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{\max} F(t)} - 1}{e^{(y_{\max} - y_0)}} \right)$	y(t) = concentración celular al tiempo t y ₀ = concentración celular inicial y _{max} = concentración máxima de células μ _{max} = velocidad de crecimiento máxima específica
	$F(t) = t + \frac{1}{v} \ln(e^{-vt} + e^{-h_0} e^{(-vt-h_0)})$	v = velocidad de aumento del reactivo limitante h ₀ = estado fisiológico de las células λ = duración de la fase de adaptación
Ratkowsky³	$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \{1 - \exp[c(T - T_{\max})]\}$	k = velocidad de crecimiento T = temperatura T _{min} = temperatura mínima de crecimiento b = constante de ajuste para k por debajo de la temperatura óptima T _{max} = temperatura máxima de crecimiento c = constante de ajuste para k por debajo de la temperatura óptima

¹ Gibson et al., 1987

² Baranyi y Roberts, 1994

³ Ratkowsky, 1983

En los modelos Logístico y Gompertz, cuando se sustituyen los parámetros de ajuste, A , C , B y M (Tabla 1), en diferentes ecuaciones se obtienen los valores de λ , μ_{max} y Tg , que son las variables en las que se observan los efectos de los factores intrínsecos y extrínsecos del alimento sobre los microorganismos (Gibson *et al.*, 1987).

Baranyi y Roberts (1994) desarrollaron un modelo semi-mecanístico (Tabla 1), el cual tiene un enfoque más biológico que los tradicionales Gompertz y Logístico, basado en una combinación el modelo logístico original y el modelo de cinética enzimática de Michaelis-Menten (Fujikawa y Morozumi, 2006)

El modelo de Baranyi introduce como variable al estado fisiológico de las células, h_0 , el cual es un parámetro virtual difícil de observar, validar y cuantificar experimentalmente (Huang, 2008). La duración de la fase de adaptación está determinada por el valor de esta variable en el momento de la inoculación y por el nuevo ambiente en el que se encuentra (Baranyi y Roberts, 1994). Este modelo asume que generalmente se observa una fase de adaptación y la transición de la fase de adaptación a la fase exponencial depende de la formación de una sustancia intracelular limitante. Esta sustancia es crítica para el crecimiento, ya que es necesario de que se llegue a cierto nivel intracelular para inducir el crecimiento de las células (Juneja *et al.*, 2007).

2.1.1.2. SECUNDARIOS

Los modelos secundarios describen la respuesta de uno o más parámetros del modelo primario (λ , μ_{max} , Tg) al modificar las condiciones de cultivo o ambientales (pH, A_w , T). La mayoría de las veces, la velocidad máxima de crecimiento, μ_{max} (parámetro derivado de un modelo primario), es la ajustada por los modelos secundarios en función de la temperatura (McDonald y Sun, 1999).

El modelo secundario más utilizado es el derivado del de Bělehrádek, el modelo de Ratkowsky (1983) (Tabla 1). El también llamado “modelo de la raíz cuadrada”, considera que el crecimiento microbiano en un rango de temperaturas subóptimas, son proporcionales a la segunda potencia de la temperatura por encima del umbral de temperatura que es específico de cada especie y hasta cepa (Ross *et al.*, 2011). Ratkowsky *et al.* (1983) observaron que esta relación se aplicaba en datos de crecimiento encontrados en la literatura para 30 cepas de bacterias en temperaturas que van desde la temperatura mínima hasta temperaturas por encima de la temperatura óptima, donde el crecimiento máximo ocurre. Este modelo ha sido utilizado en estudios de zoología implicando mamíferos, peces, reptiles e insectos, para modelar el efecto en microbios del suelo (por ejemplo: ciclos biogeoquímicos, biorremediación), y en astrobiología y predicción del cambio climático (Ross *et al.*, 2011).

Este modelo secundario permite modelar la velocidad de crecimiento en función de la temperatura e incorporarla en un modelo primario. El inconveniente es que solo garantiza una buena predicción en el rango de temperatura de los datos experimentales y que bajo condiciones fluctuantes continuas de temperatura no hay consistencia en el crecimiento microbiano que predice (Tirado *et al.*, 2005).

2.1.1.3. TERCARIOS.

Generalmente la industria para aplicar estas ecuaciones matemáticas en su sistemas de producción, no lo hace utilizando los modelos primarios y secundarios, si no, lo que utiliza son los modelos terciarios. Estos son una aplicación, en la cual se han integrado uno o más modelos primarios y secundarios, incorporados a un software de fácil manejo. Estos modelos

proviene de la integración de varias funciones tales como T, Aw o pH (McDonald y Sun, 1999).

Uno de estos modelos es el desarrollado por el Departamento de Agricultura de EUA (USDA), el Pathogen Modeling Program (PMP, <http://pmp.arserrc.gov>). Este software implica tanto modelos de crecimiento, como de enfriamiento, inactivación térmica, sobrevivencia y transferencia. En cuanto a los modelos de crecimiento, inicialmente solo incluía modelos desarrollados en medio de cultivo basados en la ecuación de Gompertz en combinación con análisis de superficie de respuesta. Estos modelos implican la T, pH, concentración de sal, ppm de NaNO_3 y atmosfera, dando como resultado una curva de crecimiento en condiciones isotérmicas. Actualmente incluye modelos en matrices alimenticias, tal como carne de pollo, res, salmón y cangrejo, estos en función de la temperatura.

Otro modelo terciario es el ComBase (<http://www.combase.cc>), el cual fue desarrollado por la USDA, el Instituto de Investigación en Alimentos de Reino Unido, y el Centro de Seguridad Alimentaria de Australia. Este está compuesto por varias herramientas, entre ellas el Predictor y la base de datos. El Predictor, es una herramienta que estima el crecimiento de 14 microorganismos patógenos, esto en función de la temperatura, concentración de sal, pH y en algunos casos la concentración de dióxido de carbono o ácidos orgánicos. Estas curvas de crecimiento fueron desarrolladas en medio de cultivo y ajustadas al modelo de Baranyi. Igualmente predice curvas de inactivación y supervivencia. Por otro lado, la base de datos, consta de un poco más de 50 mil curvas microbianas de crecimiento y supervivencia en una amplia variedad de alimentos que han sido desarrolladas en institutos de investigación y publicaciones.

2.1.1.4. DINÁMICOS

Aunque existen muchos modelos de predicción microbiana con gran exactitud bajo condiciones isotérmicas, estos no pueden estimar el crecimiento bajo condiciones dinámicas (Gumudavelli *et al.*, 2007). Los modelos dinámicos son aquellos que permiten un cálculo consistente del impacto de los diferentes pasos asociados a la producción, distribución y venta de los alimentos (caracterizado por condiciones que se modifican a través del tiempo) en el desarrollo microbiano (Bernaerts *et al.*, 2004).

Numerosos estudios han evaluado el efecto de los factores ambientales tal como la temperatura, oxígeno y niveles de población microbiana mixta en alimentos, sobre el crecimiento microbiano. Aunque el factor más importante a controlar y por lo mismo a modelar, es la temperatura, ya que es el factor ambiental que es más dado a cambiar durante el procesamiento y almacenamiento (Shimoni y Labuza, 2000). Por lo tanto, la mayoría de los modelos dinámicos desarrollados predicen el crecimiento bacteriano en alimentos bajo condiciones fluctuantes de temperatura (Gumudavelli *et al.*, 2007).

En tal caso, las predicciones pueden ser generadas por la integración de modelos primarios y un modelo secundario al relacionar los parámetros primarios típicos con las condiciones ambientales. A partir de esto, se asume implícitamente que los parámetros primarios, por ejemplo, la velocidad máxima de crecimiento, cambian inmediatamente de acuerdo a las variaciones de los factores ambientales, al igual que el modelo secundario (Bernaerts *et al.*, 2004). Por lo tanto, el ajuste tanto del modelo primario y secundario afectan la exactitud del modelo dinámico (Juneja *et al.*, 2008).

Para estimar el crecimiento bacteriano se utiliza la forma diferencial de los modelos primarios. Tanto los modelos empíricos (Gompertz y Logístico),

como el modelo de Baranyi son igualmente exactos para describir el crecimiento bacteriano en estas condiciones (Velugoti *et al.*, 2010). La forma diferencial de Baranyi puede ser directamente utilizada para estimar el crecimiento bacteriano bajo condiciones variables de temperatura (Baranyi y Roberts, 1994; Velugoti *et al.*, 2010).

2.1.2. VALIDACIÓN DE MODELOS MATEMÁTICOS

Durante el desarrollo de modelos uno de los pasos más importantes y siendo el final de ellos, es el de asegurar que las predicciones realizadas por los modelos sean aplicables en situaciones reales, este es el proceso de validación (Blocklehurst, 2004).

Un gran número de modelos matemáticos se han desarrollado para predecir la inocuidad microbiana de los alimentos, aunque, la mayoría de estos se han llevado a cabo en condiciones ideales de medio de cultivo (generalmente caldo). Debido a esto, se han encontrado algunas diferencias al momento de emplearlos en condiciones reales, ya que no todos los factores implicados son considerados en los modelos (Castillejo-Rodríguez *et al.*, 2002)

Por esto, en todos los casos el proceso de validación debería, idealmente, realizarse en condiciones ambientales fluctuantes tal como sucede en la realidad y en la matriz alimentaria de interés. La validación de estos modelos generalmente se realiza por comparación de los datos encontrados en la literatura o en laboratorio del desarrollo del organismo en el alimento contra el comportamiento predicho por la ecuación (Castillejo-Rodríguez *et al.*, 2002; Blocklehurst, 2004).

Es importante que el usuario final de los modelos tenga un entendimiento sobre el rango de aplicabilidad del modelo predictivo y las limitaciones de su desempeño. Uno de los principales intereses que están relacionados con el

desempeño del modelo, es si este es un modelo “falso peligroso”, esto quiere decir, que el modelo de cómo resultado estimaciones que subestiman el riesgo de deterioro o del crecimiento de un patógeno (Ross, 1996). Un modelo debe ser consistentemente “falso seguro”, esto es, las predicciones deben ser falsas en el lado seguro (por ejemplo, la velocidad de crecimiento y fase de latencia deberían ser mas rápidas y cortas que los valores experimentales, respectivamente) (Blocklehurst, 2004).

Existen algunas críticas sobre el término validación, estas giran sobre la dificultad en la cuantificación de que tan bien un modelo actúa en su papel predictivo. Los errores ocurren básicamente debido a los datos utilizados para el modelado y el ajuste de los modelos. Existen una variedad de posibles fuentes de error: la homogeneidad de los alimentos; la integridad de los factores ambientales utilizados para coleccionar los datos, la conversión de resultados empíricos hacia una función matemática, y el ajuste de los datos al modelo (Blocklehurst, 2004)

Con el objetivo de generar un método estándar o un criterio de evaluación para el ajuste de los modelos, Ross (1996) propuso el uso de índices simples del desempeño de los modelos como pasos para dar lugar a una definición objetiva del término “modelo validado”. Estos índices estiman el nivel de confianza que se puede tener en las predicciones dadas por el modelo (factor de exactitud, A_f) y si el modelo muestra alguna tendencia a poder dar lugar a predicciones “falsas-peligrosas” (factor de tendencia, B_f).

Existen otros índices estadísticos además de los desarrollados por Ross (1996) que se utilizan para la evaluación del ajuste de los modelos: cuadrado medio del error (MSE), media relativa del porcentaje de residual (MRPR), media absoluta del residuo relativo (MARR), raíz del cuadrado medio residual (RMSR), raíz del cuadrado medio del error (RMSE) (Jeyamkondan *et al.*, 2001).

2.1.3. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA EN LA INDUSTRIA CÁRNICA

Hasta la fecha una de las principales industrias que hace uso de los modelos matemáticos es la industria cárnica, debido a que la carne es susceptible al deterioro microbiano y en algunas ocasiones actúa como un vector de patógenos de origen animal y humano. Esto da lugar a grandes pérdidas económicas por su deterioro y por su participación en brotes de enfermedades transmisibles por alimentos (ETAs).

El principal problema es que toda carne cruda tiene cierto nivel de contaminación microbiana y no puede esperarse lo contrario a menos que sea procesada. Sin embargo, su carga y diversidad dependen de la condición de los animales previa a su sacrificio, a las prácticas sanitarias del rastro, la manipulación posterior y a las condiciones de almacenamiento, empaquetado y distribución (McDonald y Sun, 1999; Coll-Cárdenas *et al.*, 2008; Pérez-Chabela *et al.*, 2008).

La sobrevivencia y desarrollo de la población microbiana contaminante de la carne es afectada por la combinación e interacción de factores intrínsecos y extrínsecos. De estos últimos, la temperatura es uno de los factores más controlables y es el que ejerce un mayor efecto en el crecimiento microbiano (McDonald y Sun, 1999; Pérez-Chabela *et al.*, 2008).

La respuesta de la actividad microbiana a los cambios de temperatura son más inmediatos e intensos que los observados frente a otros factores (Fernández-Escartín, 2008). Por lo mismo, la vida de anaquel e inocuidad de un alimento dependen por los efectos acumulativos de la temperatura durante la cadena de frío (Tirado *et al.*, 2005). Para la mayoría de los alimentos, se recomienda que la cadena de frío se mantenga dentro de un rango de temperatura de -1 a 2°C, y que no sea superior de 5°C. Desafortunadamente, los sistemas de producción y los canales de distribución no siempre cuentan

con el equipamiento necesario para cumplir con esta recomendación (Tirado *et al.*, 2005).

Durante la comercialización existe el problema del abuso de temperatura, el cual es preocupante para la industria cárnica puesto que es la causa principal de disminución de la vida de anaquel en términos microbiológicos. En E.U.A. se reporta que el abuso de temperatura durante el almacenamiento de los alimentos es la principal causa de origen de casos de ETAs (Tirado *et al.*, 2005). Por lo mismo, en la mayoría de los sistemas HACCP para la industria alimenticia, la temperatura es un punto crítico de control (McDonald y Sun, 1999).

Este efecto de la temperatura sobre el desarrollo microbiano ha sido modelado por la microbiología predictiva. Por lo que se ha ajustado, desarrollado y validado una amplia variedad de modelos matemáticos que describen el crecimiento de microorganismos en diferentes matrices cárnicas (Tabla 2). Algunos de estos modelos, han sido integrados al PMP: *Yersinia pseudotuberculosis* en carne de res cruda (Bhaduri *et al.*, 2011), *Salmonella typhimurium* en carne de pollo cruda con microflora competitiva (Oscar, 2006), en piel de pollo (Oscar, 2009), salchichas de pollo (Oscar, 2008), *Salmonella* spp. en carne de pollo irradiada (Juneja *et al.*, 2007) y en carne de res irradiada (Juneja *et al.*, 2009), *Listeria* spp. en jamón molido (Hwang y Tamplin, 2007).

Un modelo terciario desarrollado para la industria cárnica es el THERM (http://www.meathaccp.wisc.edu/pathogen_modeling/therm.html) por Ingham *et al.* (2007), el cual utiliza como base el modelo de Baranyi. Esta herramienta ayuda a predecir el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en carne de res, res marinada, cerdo y aves crudas durante situaciones cortas de abuso de temperatura.

Tabla 2. Modelos predictivos desarrollados para la industria cárnica

Microorganismo	Matriz	Modelo			Observaciones	Referencia
		Primario	Secundario	Dinámico		
<i>Clostridium perfringens</i>	Carne de pollo cocida y curada	Modelo de Baranyi	Modelo de Ratkowsky		Modelo para predecir crecimiento durante enfriamiento.	Juneja y Marks, 2002
	Carne de res cocida	Modelo de Gompertz	Modelo de Ratkowsky	Solución numérica de 4to orden de Runge-Kutta		Huang, 2003
	Carne de res cocida	Modelo de Baranyi	Modelación de fase lag: regresión lineal y μ_{max} : modelo de Ratkowsky		Modelo para predecir crecimiento durante enfriamiento. Desarrollado a partir de condiciones no isotérmicas	Smith-Simpson y Schaffner, 2005
	Carne de res cocida	Modelo enfocado en Baranyi y Logístico	Modelo de Ratkowsky	Modelo de ecuaciones diferenciales	Crecimiento durante enfriamiento	Juneja <i>et al.</i> , 2008
	Roast Beef	Modelo de Gompertz			Crecimiento durante enfriamiento. Modelo desarrollado a partir de condiciones no isotérmicas	Sánchez-Plata <i>et al.</i> , 2005
	Jamón cocido de cerdo	Modelo de Baranyi	Modelo de Ratkowsky	Solución numérica de 4to orden de Runge-Kutta	Crecimiento durante enfriamiento. Integrado a un modelo de transferencia de calor.	Amézquita <i>et al.</i> , 2005
	Carne de cerdo curada y cocida	Modelo de Huang	Modelo de Ratkowsky	Solución numérica de 4to orden de Runge-Kutta		Juneja <i>et al.</i> , 2006
	Carne molida de cerdo cocida	Modelo de Baranyi (Baranyi y Roberts, 1994)	Modelo de Ratkowsky (McMeekin <i>et al.</i> , 1993)	Solución numérica de 4to orden de Runge-Kutta	Crecimiento durante enfriamiento.	Juneja <i>et al.</i> , 2010

Tabla 2. Modelos predictivos desarrollados para la industria cárnica (Continuación)

Microorganismo	Matriz	Modelo			Observaciones	Referencia
		Primario	Secundario	Dinámico		
Bacterias Ácido Lácticas	Emulsiones cárnicas empacadas al vacío	Modelo de Gompertz	Modelo de Ratkowsky		Ajustados a temperaturas de refrigeración	Cayré <i>et al.</i> , 2003
	Carne de cerdo curada empacada al vacío	Modelo de Gompertz y Baranyi	Ecuación de Arrhenius	Modelo dinámico de Baranyi		Mataragas <i>et al.</i> , 2006
Bacterias Ácido Lácticas, Cuenta total aerobia, <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> ,	Carne molida de cerdo cruda	Modelo de Baranyi	Ecuación de Arrhenius	Solución numérica basada en el modelo de Baranyi	Combinaron el efecto del pH de la carne a temperaturas de almacenamiento (0-20°C)	Koutsoumanis <i>et al.</i> , 2006
<i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> Y <i>Escherichia coli</i>	Carne de res molida	Modelo de Gompertz	Ecuación de Arrhenius		Observaron efecto del pH, empacado y presencia de lactatos. Temperaturas de refrigeración.	Coll-Cardenas <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas spp.</i>	Pollo crudo en condiciones aeróbicas		Modelo de Ratkowsky		Obtuvieron datos de μ_{max} de publicaciones de <i>Pseudomonas spp.</i> para obtener modelo secundario y lo validaron en pollo crudo	Domínguez y Schaffner, 2007
<i>Listeria spp.</i> y <i>Pseudomonas spp.</i>	Carne de res cruda	Ecuaciones polinomiales			Modelaron el efecto del pH, T y % Sal. Al validar solo el modelo de <i>Pseudomonas</i> da buenas predicciones.	Lebert <i>et al.</i> , 2000
<i>Listeria monocytogenes</i>	Carne de res: Tejido magro y Tejido graso	Regresión lineal	Ecuación de Arrhenius y Ecuación de Davey			Grau y Vanderline, 1993
	Productos cárnicos cocidos empacados en atmósferas modificadas	Modelo de Gompertz	Modelo de Ratkowsky Superficie de respuesta		Observaron el efecto de Aa, empacado, lactatos y concentración de BAL en el producto cárnico	Devlieghere <i>et al.</i> , 2001

Tabla 2. Modelos predictivos desarrollados para la industria cárnica (Continuación)

Microorganismo	Matriz	Modelo			Observaciones	Referencia
		Primario	Secundario	Dinámico		
<i>Listeria monocytogenes</i>	Jamón de res	Modelo de Baranyi	Superficie de Respuesta		Modelaron el efecto del lactato y diacetato de sodio sobre la duración de la λ y T_g .	Hwang y Tamplin, 2007
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Carne de res molida estéril	Modelo de Baranyi	Modelo de Ratkowsky			Tamplin <i>et al.</i> , 2005
	Carne mecánicamente ablandada	Modelo de Gompertz, Baranyi y Huang	Modelo de Ratkowsky		Evaluaron el ajuste de los modelos primarios y no encontraron diferencias significativas entre el ajuste de ellos.	Huang 2010
<i>Salmonella typhimurium</i>	Pechugas y muslos de pollo cocidos estériles	Modelo lineal de dos fases	Modelación de fase lag: modelo de la hipérbola (\wedge m) y μ_{max} modelo de Ratkowsky		Se desarrollo un modelo terciario a partir de estos ajustes.	Oscar, 2002
	Pechuga de pollo molida cruda	Modelo de Gompertz	Se modelo λ , μ , utilizando un modelo polinomial y N_{max} con modelo asintótico		Observaron el efecto de la carga inicial y presencia de la flora nativa.	Oscar, 2007
<i>Salmonella</i> spp.	Carne de pollo molida estéril	Modelo de Baranyi	Modelo de Ratkowsky		El modelo de Baranyi fue el que mejor se ajusta al desarrollo de <i>Salmonella</i> en esta matriz alimenticia.	Juneja <i>et al.</i> , 2007
	Carne de res cruda molida estéril	Modelo de Gompertz, Logístico, Baranyi y Huang	Modelo de Ratkowsky		Evaluaron el ajuste de los modelos primarios y no encontraron diferencias significativas entre el ajuste de ellos.	Juneja <i>et al.</i> , 2009
	Carne de cerdo molida estéril	Modelo de Baranyi	Modelo de Ratkowsky	Solución numérica de 4to orden de Runge-Kutta	No puede ser utilizado para modelar temperaturas por debajo de la temperatura mínima de crecimiento de <i>Salmonella</i> (7°C)	Velugoti <i>et al.</i> , 2010

Tabla 2. Modelos predictivos desarrollados para la industria cárnica (Continuación)

Microorganismo	Matriz	Modelo			Observaciones	Referencia
		Primario	Secundario	Dinámico		
<i>Salmonella</i> spp., <i>E.coli</i> , <i>S. aureus</i>	Carne de res, cerdo y pavo	Modelo de Baranyi			Desarrollaron la herramienta THERM a partir del ajuste del crecimiento a diferentes temperaturas.	Ingham <i>et al.</i> , 2007
<i>Yersinia enterocolítica</i>	Pollo cocido estéril empacado en atmósferas modificadas	Modelo de Gompertz	Modelación de fase lag: modelo Smith y μ_{max} modelo de Zwietering		Se realizaron las cuvas en condiciones aerobias, vacío y atmósfera modificada (100% CO ₂), para dar lugar a un solo modelo.	Wei <i>et al.</i> , 2001
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Carne de res cruda estéril	Modelo de Baranyi	Regresión no lineal			Bhaduri y Phillips, 2011

Esta última bacteria, *S. aureus*, es de interés en la industria cárnica debido a que se ha visto implicada en varios brotes de ETAs utilizando como vector los productos cárnicos. Hasta la fecha se han desarrollado modelos predictivos del crecimiento de *S. aureus*, en medio de cultivo principalmente. Sin embargo aún faltan modelos de este patógeno en productos cárnicos previo al proceso de cocción.

2.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria Gram positiva, no móvil, no esporulada, y anaerobia facultativa. Morfológicamente son células esféricas de 0.5-1.5 μm de diámetro, encontradas individualmente, en pares o aglomeradas irregularmente (Soriano *et al.*, 2002).

S. aureus es la especie más notoria de este género por causar una diversidad de enfermedades que varían en severidad, desde una infección cutánea leve hasta enfermedades graves como neumonía y septicemia (Normanno *et al.*, 2007). Específicamente en alimentos es importante, ya que da lugar a la intoxicación estafilocócica por alimentos (IEA) debido a la enterotoxina que produce (SE, por sus siglas en inglés, staphylococcal enterotoxin).

2.2.1. ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA

Las SE son un grupo de toxinas pirogénicas superantigénicas (SAGs) secretadas por algunas cepas de *S. aureus*. Aproximadamente el 50% de las cepas que se aíslan de carne y productos cárnicos producen enterotoxinas (Normanno *et al.*, 2007). El término superantigenicidad se refiere a la habilidad de dichas exotoxinas para estimular la proliferación de linfocitos T, sin tener en

cuenta su especificidad antigénica. Las células T activadas secretan grandes cantidades de citocinas, lo que trae como consecuencia varios efectos en el organismo, conocidos como síndrome de choque tóxico (Bania *et al.*, 2006; Pocsfalvi *et al.*, 2008).

Las toxinas pirogénicas SAGs son proteínas monocatenarias, no glicosiladas, con peso molecular de 20-35 kDa y son homólogas en un 20-80% entre ellas. Son moderadamente estables a la inactivación química, proteólisis y desnaturalización por calentamiento (Pocsfalvi *et al.*, 2008). Esta estabilidad a desnaturalización por calentamiento es lo que preocupa altamente a la industria alimenticia en general, ya que las células vegetativas de *S. aureus* tienen valores de reducción decimal (D) 0.30 a 0.40 min a 70°C, mientras que las enterotoxinas son altamente termoestables con D de 8 a 28 min a 121°C. Esta estabilidad térmica fue corroborada por Pepe *et al.* (2006). Ellos observaron que en pollo empanizado contaminado con *S. aureus*, las SE resistieron una cocción industrial común de 55 segundos a 180°C.

Estas toxinas son codificadas en genes asociados a elementos genéticos móviles (y por lo mismo variables) tales como profagos, islas patogénicas y plásmidos, los cuales se transfieren horizontalmente entre cepas de *Staphylococcus* (Fueyo *et al.*, 2005; Pocsfalvi *et al.*, 2008). Se han descubierto 20 enterotoxinas diferentes: 5 SE, SEA-SEE, y 15 “tipo SE” (SEI, por sus siglas en inglés staphylococcal enterotoxin-like), SEIG-SEIR y SEIU-SEIV (Nema *et al.*, 2007).

Las cinco enterotoxinas más frecuentemente asociadas en brotes de IEA son SEA, SEB, SEC, SED y SEE, siendo la primera la principal involucrada (Nema *et al.*, 2007). Esto fue corroborado por el estudio realizado por Kérouanton *et al.* (2007), donde observó que de 33 cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas aisladas de brotes en Francia (1982-2002), 23 portaba el gen

sea. Aunque se ha demostrado que además de estas 5 enterotoxinas eméticas, SEIG, SEIH y SEII también causan vómito (Kérouanton *et al.*, 2007).

Estructuralmente todas las SE poseen dominios topológicos conservados, y se han propuesto que las SE eméticas poseen una curva de cisteínas que se ha involucrado en la respuesta emética. Las SE sin o pobre respuesta emética no contienen esta estructura (Gustafson y Wilkinson, 2005).

2.2.2. RESERVORIOS

S. aureus es un microorganismo propio de personas y animales, siendo los reservorios primarios la piel y membranas mucosas, especialmente la región de la nasofaringe. Por lo mismo, la contaminación de productos alimenticios en plantas procesadoras se asocia frecuentemente a los manipuladores de alimentos y portadores asintomáticos (Atanassova *et al.*, 2001; Shale *et al.*, 2005; Normanno *et al.*, 2007). *S. aureus* también se encuentra presente en animales de producción, tales como los rumiantes, asociado frecuentemente a mastitis, lo que da lugar a la contaminación de la leche y sus productos (Normanno *et al.*, 2007).

S. aureus es un microorganismo de interés en la industria cárnica ya que éste llega a sobrevivir, colonizar y persistir en las canales y plantas procesadoras debido a sus propiedades de adhesión y resistencia a clorado y desecación (Shale *et al.*, 2005; Pepe *et al.*, 2006). Por lo mismo crea fácilmente biopelículas, principalmente en equipo que es difícil de limpiar y secar, persistiendo por largos periodos y causando contaminación cruzada (ICMSF, 1996; Shale *et al.*, 2005). Shale *et al.* (2005), encontraron en rastros de Sudáfrica cuentas de hasta 10^6 UFC/g de carne, atribuido a una contaminación cruzada con biopelículas desarrolladas por una falta de limpieza y además a malas condiciones de almacenamiento.

2.2.3. INTOXICACIÓN ESTAFILOCÓCICA

2.2.3.1. ETIOLOGÍA

La intoxicación estafilocócica por alimentos (IEA) es una enfermedad dependiente de la susceptibilidad individual hacia la SE, peso y estado de salud general de la persona (Soriano *et al.*, 2002). Por lo general, la ingesta de alimentos contaminados con 20 ng a <1 µg de SE es suficiente para que las personas presenten los síntomas. El tiempo en que aparece la enfermedad depende de la susceptibilidad y la dosis ingerida, aunque generalmente aparece después de pocas horas (1-6 h) de la ingestión. Los síntomas incluyen náuseas, calambres abdominales, diarrea y vómito en proyectil característico y generalmente desaparecen entre las 24-48 horas. Víctimas fatales ocurren raramente, siendo las más afectadas las personas muy jóvenes o mayores (Normanno *et al.*, 2007).

2.2.3.2. INCIDENCIA

La intoxicación estafilocócica es considerada una de las principales ETAs, sin embargo rara vez se reporta (Nema *et al.*, 2007; Normanno *et al.*, 2007). En muchos países la IEA se posiciona en el segundo o tercer lugar de agentes causales de ETAs, sobrepasado solamente por *Salmonella* spp. y en competencia con *Clostridium perfringens* (Atanassova *et al.*, 2001). En México se atribuye que el 48% de las intoxicaciones por alimentos son causadas por *S. aureus* (Parrilla-Cerrillo *et al.*, 1993). Sin embargo, en general la incidencia real de IEA está subestimada (Normanno *et al.*, 2007).

En Reino Unido el 53% de los casos de IEA (1969-1990) se dieron a causa de alimentos basados en carne (Pepe *et al.*, 2006). En E.U.A. de 1998 al 2008 sucedieron 534 brotes por *S. aureus*, de los cuales 247 implicaron carne y productos cárnicos de cerdo, res y aves (CDC, 2011). Según Mead (1999), en

este país se reportan anualmente 185,000 casos de IEA y 1,750 de ellos terminan en hospitalización y 2 en fallecimiento. A pesar de que es una enfermedad leve, ésta resulta en un considerable costo económico y social de aproximadamente 163 millones de dólares al año (Scharff, 2010).

2.2.4. DESARROLLO DE *S. aureus* EN PRODUCTOS CÁRNICOS.

El desarrollo de *S. aureus* y la producción de SE está influenciada por varios factores tal como el pH, la temperatura y la composición del alimento. Los parámetros de desarrollo de esta bacteria y producción de enterotoxina se muestran en la Tabla 3. La sobrevivencia y desarrollo de *S. aureus*, al igual que las demás bacterias, es dependiente de la combinación e interacción de factores intrínsecos y extrínsecos de los alimentos. En el caso de la carne cruda, los factores intrínsecos que favorecen el desarrollo es su alta actividad de agua (A_w , >0.98), moderado pH (5.5-6.5), fuentes de carbono y otros nutrientes disponibles. Respecto a los factores extrínsecos, el que más influye es la temperatura, siendo ventajosamente un factor controlable (McDonald y Sun, 1999; Pérez-Chabela *et al.*, 2008).

Tabla 3. Límites de varios factores ecológicos para el desarrollo de *S. aureus*.

Factor	Crecimiento		Producción de enterotoxina	
	Óptimo	Rango	Óptimo	Rango
Temperatura (°C)	37	7 – 48	40 – 45	10 – 48
pH	6 – 7	4 – 10	7 – 8	4.5 - 9.6**
Aw	0.98	0.83 - $>0.99^*$	0.98	0.87 - $>0.99^{***}$
Atmósfera	Aeróbica	Aeróbica – Anaeróbica	Aeróbica	Aeróbica - Anaeróbica

*en condiciones aeróbicas, en anaeróbicas A_w 0.90- >0.99

**en condiciones aeróbicas, en anaeróbicas el pH mínimo es 5.0

***en condiciones aeróbicas, en anaeróbicas A_w 0.92- >0.99

ICMSF, 1996

En los productos cárnicos listos para comer, la presencia de algunos ingredientes de los productos cárnicos, tales como la sal (Hajmeer *et al.*, 2006), nitritos (Castellani y Niven, 1954), fosfatos (Jei y Shelef, 1986; Lee *et al.*, 1994), y algunos antimicrobianos inhiben el desarrollo de microorganismos. En la mezcla cruda de los productos listos para comer, además de la carne cruda y los ingredientes, la presencia de la microflora nativa interfiere con el desarrollo de *S. aureus* (McCoy y Faber, 1966; Gill y Newton, 1980).

Específicamente en relación con los antimicrobianos, existen nuevas tendencias de eliminar los antimicrobianos convencionales y sustituirlos por naturales (Weiss *et al.*, 2010). La incorporación directa de los antimicrobianos naturales en la mezcla cárnica ha sido efectiva para inhibir el crecimiento microbiano en productos cárnicos listos para consumir, algunos ejemplos son: sales orgánicas como acetato de sodio, citrato de sodio, lactato de sodio y potasio y diacetato de sodio (Peirson *et al.*, 2003; Stekelenburg, 2003; Thippareddi *et al.*, 2003; Juneja y Thippareddi, 2004; Sánchez-Plata *et al.*, 2005; Lianou *et al.*, 2007), glucono-delta-lactona (Barmpalia *et al.*, 2005), quitosano (Beverly *et al.*, 2008), menta (Kanatt *et al.*, 2008) extractos de rosemary (Georgantelis *et al.*, 2007) y cítricos (Fernández-López *et al.*, 2005), ajo (Sallam *et al.*, 2004), jugo y semillas de toronja (Miguel-García *et al.*, 2009) vinagre y jugo de limón (Valenzuela-Martínez *et al.*, 2010). Casi todos estos estudios enfocados en el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y *C. perfringens*.

Respecto al factor temperatura, *S. aureus* es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas, que van desde 6.7 a 45.6 °C con un óptimo de 37°C, aunque esto depende de las condiciones ambientales (Sutherland *et al.*, 1994). Se ha observado que el riesgo de formación de toxina aumenta cuando el alimento crudo o procesado se mantiene por más de 12 horas entre 10-21.1°C y más de 3 horas a >21.1°C (Pepe *et al.*, 2006).

Para que los estafilococos produzcan suficiente toxina y provoquen la IEA, es necesario que se encuentren por lo menos 10^5 UFC/g. El problema es, que la enterotoxina estafilocócica no es detectada en laboratorio hasta que alcanza aproximadamente $\geq 10^6$ UFC/g (Soriano *et al.*, 2002). Aun así, se ha observado que la SE es sintetizada en todas las fases del crecimiento, pero principalmente en la mitad y final de la fase exponencial. Esta síntesis de SE obedece una cinética de orden cero (Soriano *et al.*, 2002; Fujikawa y Morozumi, 2006).

En los productos cárnicos crudos, es importante conocer la concentración final de *S. aureus* antes de ser cocido el producto, debido a que la enterotoxina, a diferencia de las células vegetativas, es resistente a las temperaturas de cocción de los productos cárnicos. Por ello, es importante asegurar que en el producto crudo no se encuentra esta carga microbiana, por lo cual, es necesaria una ecuación matemática que nos ayude a estimar la carga de estafilococos presente en ellos.

2.3. MODELOS PREDICTIVOS DE *S. aureus*

Se han desarrollado y ajustado varios modelos predictivos del crecimiento de *S. aureus* pero la mayoría de ellos en medio de cultivo, los cuales implican el pH, A_w , T, % NaCl y concentración de NaNO_2 (Buchanan *et al.*, 1993; Sutherland *et al.*, 1994; Dengremont y Membre, 1995; Eifert *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 2002; McCann *et al.*, 2003; Zurera-Cosano *et al.*, 2004). De hecho el modelo desarrollado por Buchanan *et al.*, (1993) se encuentra incluido en el PMP. Hasta la fecha, se han desarrollado dos modelos de *S. aureus* en alimentos, que es leche (Fujikawa y Morozumi, 2006) y carne cruda (Ingham *et al.*, 2007).

La herramienta THERM desarrollada por Ingham *et al.* (2007), predice el crecimiento de *S. aureus* en carne cruda de cerdo y res. THERM fue

desarrollado en condiciones isotérmicas, ajustado al modelo de Baranyi y no fue ajustado a ningún modelo secundario, ni se desarrolló un modelo dinámico donde se integren ambos modelos. Aún así, esta herramienta predice el crecimiento de *S. aureus* y otros patógenos en condiciones fluctuantes de temperatura.

Como se ha observado en estudios de validación del crecimiento de *S. aureus* en alimentos estériles (Walls *et al.*, 1996) y productos cárnicos cocidos (Castillejo-Rodríguez *et al.*, 2002), existen diferencias entre los datos reales y los predichos y de hecho, en algunos casos, las predicciones caen en la zona falso-peligrosa. Esto es debido a que los modelos son generalmente desarrollados en condiciones ideales de medio de cultivo, donde no todos los factores son implicados.

En la industria cárnica, es necesario el desarrollo de modelos de *S. aureus* en productos cárnicos previo a proceso de cocción, ya que estos han sido implicados en más de la mitad del total de los brotes de intoxicación estafilocócica (CDC, 2011). Específicamente en el caso del jamón, este ha sido el producto cárnico más frecuentemente asociado a esta enfermedad el cual del 1998 al 2008 fue el vehículo de los 32 brotes (CDC, 2011).

Por esto, es necesario el desarrollo y validación de modelos predictivos dinámicos del crecimiento de *S. aureus* en roast beef y jamón de cerdo previo al proceso de cocción, donde se implique el efecto de los ingredientes como sal, fosfatos, nitritos, antimicrobianos y microflora nativa sobre su crecimiento tal como sucede en la realidad.

3. HIPÓTESIS

El crecimiento de *Staphylococcus aureus* en roast beef y jamón de cerdo previo al proceso de cocción en condiciones de temperatura fluctuantes se predice mediante un modelo dinámico que integra el modelo de Baranyi y el modelo de Ratkowsky.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar modelos predictivos dinámicos del crecimiento de *Staphylococcus aureus* en roast beef y jamón de cerdo previo al proceso de cocción.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar curvas de crecimiento de *S. aureus* en roast beef y jamón de cerdo previos al proceso de cocción en condiciones constantes y fluctuantes de temperatura.
2. Ajustar el crecimiento isotérmico de *S. aureus* en roast beef y jamón al modelo primario de Baranyi y al modelo secundario de Ratkowsky.
3. Desarrollar los modelos dinámicos de crecimiento de *S. aureus* en roast beef y jamón de cerdo previos a la cocción.
4. Validar el modelo dinámico desarrollado para cada producto cárnico.
5. Evaluar el efecto de la adición de los antimicrobianos comerciales PURASAL OptiForm S 4 y MOstatin LV en el crecimiento de *S. aureus* en roast beef y jamón de cerdo crudos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. PREPARACIÓN DEL ROAST BEEF (RB)

Se formularon y prepararon 3 tratamientos diferentes: 1) RB-modelo, el cual fue elaborado a partir de una formulación con los ingredientes básicos de un RB. Los otros dos productos, además de la formulación básica, incluyeron un antimicrobiano natural: 2) RB-MO, con 2% de MOstatin LV (WTI Inc., Jefferson, GA) y 3) RB-Opt, con 3.3% de PURASAL S Optiform 4 (PURAC América, Inc., Lincolnshire, IL). Para el desarrollo del modelo dinámico se utilizó el RB-modelo y para la validación del modelo dinámico, además del RB-modelo, se utilizaron el RB-MO y RB-Opt.

Para su elaboración, se utilizó pulpa negra de res (*Semimembranosus*) sin grasa, la cual fue molida a través de un plato de 1/8" (modelo 4732, Hobart, Troy, OH). La carne molida fue mezclada con la salmuera en una mezcladora (modelo 100 DA, Leland, Detroit, MI) por 5 minutos. A la carne se le incorporó un 16.6% de salmuera. La salmuera se formuló en base a que cada 100 g de carne contuviera: 2.0 g de sal, 0.3 g de fosfatos (Brifisol 85, Instant, BK Giulini Corp., Simi Valley, CA) y antimicrobiano (% dependiendo del tipo de antimicrobiano) en agua estéril. Porciones de 10 g de RB crudo se pesaron en pequeñas bolsas (Primo Source, Kansas City, MO), y se sellaron en una empacadora al vacío (A300/H, Multivac, Wolfertschewenden, Germany). Las muestras se congelaron a -20°C hasta su uso. Todo el proceso de elaboración, hasta antes del congelado, se realizó en un refrigerador a 10°C.

5.2. PREPARACIÓN DEL JAMÓN DE CERDO.

De igual manera, se formularon y prepararon 3 tratamientos diferentes de jamón: 1) jamón-modelo, el cual fue elaborado a partir de una formulación básica. Los otros dos productos, además de la formulación básica, se les

incorporó un antimicrobiano natural, 2) jamón-MO, con 2% de MOstatin LV (WTI Inc., Jefferson, GA) y jamón-Opt, con 3.3% PURASAL S Optiform 4 (PURAC América, Inc., Lincolnshire, IL). Para el desarrollo del modelo dinámico se utilizó el jamón-modelo y para la validación del modelo dinámico, además del jamón-modelo, se utilizaron el jamón-MO y jamón-Opt.

Para la preparación del jamón, primero se molió carne fresca de pierna de cerdo previamente desgrasada a través de un plato de 1/8" (modelo 4732, Hobart, Troy, OH). La carne molida se mezcló con la salmuera en una mezcladora (modelo 100 DA, Leland, Detroit, MI) por 5 minutos. A la carne molida se le incorporó un 10.7% de salmuera. La salmuera se formuló en base a que cada 100 g de carne contuviera: 2.0 g de sal, 0.25 g de fosfatos (Brifisol 512, Instant, BK Giulini Corp., Simi Valley, CA), 0.25 g de eritorbato de sodio, 156 ppm de NaNO_3 y antimicrobiano (% dependiendo del antimicrobiano) en agua estéril. Porciones de 10 g de muestra se pesaron en pequeñas bolsas (Prime Source, Kansas City, MO), y sellaron en una empacadora al vacío (A300/H, Multivac, Wolfertschewenden, Germany). Las muestras se congelaron a -20°C hasta su uso. Todo el proceso de elaboración, hasta antes del congelado se realizó en un refrigerador a 10°C .

5.3. POTENCIAL DE HIDRÓGENO (pH) Y ACTIVIDAD DE AGUA (A_w)

10 g de muestra fue homogenizada con 40 mL de agua desionizada. El pH del homogenizado fue medido con un potenciómetro (Accumet-Basic/AB15, Fischer Scientific). La A_w fue medida al producto crudo en un AquaLab 3TE water activity meter (Decagon Devices Inc., Pullman, WA). Se midió este parámetro a por lo menos 2 unidades, y los valores de resultantes se reportaron como el promedio \pm error estándar.

5.4. CUANTIFICACIÓN DE LA MICROFLORA INICIAL

En ambos productos cárnicos ya formulados (roast beef y jamón) se realizó el conteo microbiano inicial. Para esto, se transfirieron 10 g de muestra, de manera aséptica, a bolsas con filtro (BagFilter, Spiral Biotech, Norwood, MA) y se les agregó agua peptonada al 0.1% y se homogenizaron (Stomacher 400, Seward Medical, Londres, Inglaterra). Posteriormente se realizaron diluciones decimales en agua peptonada al 0.1% y estas se sembraron por la técnica de extensión en superficie mediante el spiral plater (Spiral Systems Inc., OH). Para la cuantificación de las Bacterias Mesófilas Aerobias iniciales, BMAs, se sembraron las diluciones en agar Soya Trypticasa (BD, U.S.A.). En el caso de *S. aureus*, se llevó a cabo en agar Baird-Parker (BD, U.S.A.) suplementado con Telurito de Potasio 75 ppm (Sigma-Aldrich). La incubación fue a 35°C por 48 h.

5.5. ACTIVACIÓN INICIAL E INOCULACIÓN de CEPAS DE *S. aureus*

Se utilizó un coctel de 5 cepas de *S. aureus*. Las cepas fueron: FRI100 (pastel implicado en brote), FRI1007 (salami Genoa implicado en brote), FRI472 (ensalada de pavo implicada en brote), ATCC 25923 (muestra clínica) y SANGER476 (muestra clínica). Las cepas fueron preservadas en viales con caldo soya tripticasa (CST) suplementado con glicerol a -70 °C. Para la activación, 100 µL de cada cultivo se transfirió a 9 mL de CST y fue incubado a 35°C por 24 horas. Esto se realizó por duplicado. Estos cultivos se mantuvieron en CST con glicerol a -20°C, y fueron usados como cultivos de trabajo.

De cada cepa congelada se tomó una asada y se transfirió a 9 mL de CST y se incubó a 35°C por 24h. Esto se realizó por duplicado para obtener células en fase estacionaria con un crecimiento aproximado de 9 Log UFC/mL. Las células fueron centrifugadas y lavadas con agua peptonada (0.1%, BD, U.S.A.). Aproximadamente los mismos volúmenes de cada cultivo se combinaron en un tubo estéril para obtener una mezcla de cepas de *S. aureus*.

Antes de iniciar un experimento las muestras de jamón fueron descongeladas durante la noche en un refrigerador a 4°C. Cada unidad experimental fue inoculada con 25 µL de la mezcla de cepas de *S. aureus*, para obtener una concentración inicial de 2.5 Log UFC/g. Las muestras fueron selladas con calor sin aplicar vacío, manualmente homogenizadas y comprimidas por presión contra una superficie lisa para formar una capa uniforme y delgada (aproximadamente 1-2 mm de grueso). Posteriormente se almacenaron, no más de 1 hora, en refrigeración hasta su uso.

5.6. CRECIMIENTO DE *S. aureus* EN CONDICIONES ISOTÉRMICAS

Muestras de RB-modelo y jamón-modelo inoculadas fueron incubadas en baños de agua (RTE 740, Thermo Neslab, Portsmouth, NH) estabilizados a 12.5, 15, 20, 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 37.5, 40, 42.5, 45 y 47.5°C. Los tiempos de muestreo dependieron de la temperatura de incubación, estos fueron de 2 horas hasta 7 días. Se tomaron 13 muestras con el objetivo de poder determinar las fases de latencia, logarítmica y estacionaria características de la curva de crecimiento. La cuantificación de *S. aureus* se realizó tal como se menciona en el punto 5.4.

5.7. CRECIMIENTO DE *S. aureus* EN CONDICIONES DINÁMICAS

Muestras inoculadas provenientes de los 3 tratamientos preparados de cada uno de los productos (RB-modelo, RB-MO, RB-Opt, jamón-modelo, jamón-MO y jamón-Opt), fueron sometidas a dos perfiles de fluctuación de temperatura diferentes. Un sinusoidal donde la temperatura varió de 10 a 40°C con ciclos de 8 h/ciclo por 192 h y el otro perfil fue con un calentamiento exponencial de 5-60°C en 24 h. Se utilizaron baños programables con capacidad de circulación de agua (RTE 740, Thermo Neslab, Portsmouth, NH). Un paquete software comercial (NesCOM Software, Portsmouth, N.H., U.S.A.) fue utilizado para programar los perfiles de fluctuación de temperatura en los baños de agua. Se

tomaron 13 muestras a lo largo del perfil sinusoidal para la cuantificación de *S. aureus*. Para el perfil de calentamiento exponencial solamente 9. Igualmente, la cuantificación de *S. aureus* se realizó tal como se menciona en el punto 5.4.

5.8. MODELACIÓN MATEMÁTICA

Para el desarrollo de todos los modelos cada producto cárnico fue tratado de manera independiente.

5.8.1. MODELO PRIMARIO

Cada una de las curvas derivadas del crecimiento en condiciones isotérmicas de *S. aureus* tanto en RB como en jamón fueron ajustadas al modelo de Baranyi (Baranyi y Roberts, 1994). La ecuación para condiciones ambientales constantes fue la siguiente:

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

donde:

$$F(t) = t + \frac{1}{\nu} \ln(e^{-\nu t} + e^{-h_0} e^{(-\nu t - h_0)}) \quad (2)$$

$y(t)$ es la concentración celular al tiempo t en $\ln(\text{UFC/g})$; y_0 es la concentración celular inicial en $\ln(\text{UFC/g})$; y_{\max} la concentración máxima de células en $\ln(\text{UFC/g})$; μ_{\max} es la velocidad de crecimiento máxima específica en $(\ln(\text{UFC/g}))/h$; ν es la velocidad de aumento del reactivo limitante, se asume es igual a μ_{\max} ; h_0 es igual a $\mu_{\max} \lambda$; λ es la duración de la fase de adaptación en horas (Baranyi y Roberts, 1994).

Después de que los datos observados fueron ajustados al modelo de Baranyi, se estimaron los parámetros y_0 , y_{max} , μ_{max} y h_0 para cada temperatura. Generalmente, en una situación idéntica de preinoculación de las células, el valor de h_0 es aproximadamente constante (Baranyi y Roberts, 1994). Por lo mismo se obtuvo un valor promedio de este parámetro para todas las curvas determinadas. La h_0 promedio fue fijada como la h_0 a todas las temperaturas; los datos de crecimiento fueron reajustados con el modelo de Baranyi y se obtuvieron nuevos valores de y_0 , y_{max} y μ_{max} para cada curva de crecimiento.

Los datos del crecimiento de *S. aureus* de cada una de las repeticiones obtenidas bajo condiciones isotérmicas fueron ajustados de manera independiente mediante la herramienta Solver del Excel (Microsoft, 2007). Esta herramienta ajusta el modelo por la modificación de los parámetros y_0 , y_{max} , μ_{max} y h_0 para obtener el valor mínimo posible de la suma del cuadrado del error (SSE).

$$SSE = \sum (O - P)^2 \quad (3)$$

donde O es el valor observado y P es el valor predicho para el modelo. Un valor de SSE cercano a cero es deseado, esto indica que los datos predichos por el modelo es cercano a lo observado.

El ajuste de los modelos fue evaluado mediante los criterios estadísticos de la raíz del cuadrado medio del error (RMSE) y la pseudo- R^2 .

$$RMSE = \sqrt{\frac{(O - P)^2}{N}} \quad (4)$$

$$Pseudo - R^2 = 1 - \frac{SSE}{TSS} \quad (5)$$

N es el número de observaciones y TSS es la sumatoria de cuadrados de la diferencia entre los valores observados y la media de los valores observados.

El RMSE muestra que tan alejados en promedio están los valores observados de los predichos, por lo que un valor cercano a cero es lo deseado. En modelos de regresión lineal, la calidad del ajuste del modelo puede ser expresada como el coeficiente de determinación, R^2 . En una regresión no lineal tal medición no está realmente definida, por ello se definió una pseudo- R^2 . Para este criterio estadístico lo deseado es un valor cercano a 1.

5.8.2. MODELO SECUNDARIO

La velocidad máxima de crecimiento, μ_{max} , estimada a cada temperatura fue ajustada al modelo de Ratkowsky modificado (Zwietering *et al.*, 1991):

$$\mu_{max} = a(T - T_{min})^2(1 - \exp(b(T - T_{max}))) \quad (6)$$

donde T es la temperatura; T_{min} es la temperatura mínima hipotética de crecimiento; a es la pendiente de la línea de regresión de las temperaturas por debajo de la temperatura óptima, determinada por $\mu_{max}=(a(T-T_{min}))^2$; T_{max} es la temperatura máxima hipotética de crecimiento y b es un parámetro adicional que permite al modelo ajustarse a los datos a temperaturas por encima de la temperatura óptima.

El efecto de temperatura sobre la y_{max} alcanzada puede ser descrita al modificar la ecuación de Zwietering *et al.*, (1991) añadiendo la carga inicial, y_0 . Esta ecuación propuesta, más que describir la y_{max} alcanzada, describe cual es el crecimiento máximo real que tuvo el microorganismo bajo ciertas condiciones ambientales. La ecuación de Ratkowsky modificada propuesta fue la siguiente:

$$y_{max} = a(T - T_{min})^2(1 - \exp(b(T - T_{max}))) + y_0 \quad (7)$$

La herramienta Solver del Excel fue utilizada para ajustar el modelo de la μ_{max} , y de la y_{max} a los datos observados. Esta herramienta ajustó los modelos al modificar los parámetros a , b , T_{min} y T_{max} para obtener el valor mínimo posible de SSE. Igualmente el ajuste del modelo fue evaluado por los criterios estadísticos RMSE y pseudo- R^2 .

5.8.3. MODELO DINÁMICO

Para predecir el crecimiento bacteriano bajo condiciones no isotérmicas se utilizó un algoritmo, desarrollado y proporcionado por el Dr. J. Subbiah, 2007, Universidad de Nebraska-Lincoln, E.U.A., en el paquete estadístico MatLab 7.0. Este algoritmo implica a las dos ecuaciones diferenciales de Baranyi y Roberts (1994) para predecir el crecimiento en condiciones fluctuantes de temperatura:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \mu_{max}(T(t))(1 - e^{(y(t)-y_{max})}) \quad (8)$$

$$\frac{dQ}{dt} = \mu_{max}(T(t)) \quad (9)$$

éstas dos ecuaciones establecen como condiciones iniciales: $y(0)=y_0$ y $Q(h)=ln(q_0)$, respectivamente. Donde q es el estado fisiológico inicial de las células. Al asumir que los microorganismos responden de manera instantánea a los cambios de temperatura cuando las células se encuentran en fase exponencial, se puede sustituir el modelo secundario de μ_{max} (Ecuación 6) en el sistema de ecuaciones 8 y 9 (Baranyi y Roberts, 1994). Posteriormente, este sistema de ecuaciones se resuelve numéricamente por el método de 4to orden de Runge-Kutta.

Este algoritmo (Subbiah, 2007), estima el crecimiento microbiano bajo condiciones fluctuantes de temperatura, al capturar los tiempos y temperaturas a las que ha sido expuesto el producto cárnico. Para que este algoritmo

prediga, también se debe proporcionar los parámetros de crecimiento específicos para cada microorganismo en cada matriz alimentaria (y_0 , y_{max} , h_0 , a , b , T_{min} y T_{max}). Estos parámetros se derivan del ajuste de los modelos primarios y secundarios. A partir de ello, el algoritmo da como respuesta un gráfico de crecimiento bacteriano en las condiciones a las cual se mantuvo el alimento.

5.9. VALIDACIÓN

Para evaluar la exactitud del modelo dinámico desarrollado, se compararon los valores de crecimiento predichos por el modelo y los valores de crecimiento obtenidos experimentalmente bajo condiciones fluctuantes de temperatura. Los datos experimentales fueron los resultantes del crecimiento de *S. aureus* en condiciones dinámicas. Los criterios estadísticos RMSE, pseudo- R^2 , porcentaje de error relativo medio (MRPE), error relativo absoluto medio (MARE), factor de tendencia (B_f) y factor de exactitud (A_f) fueron los utilizados para evaluar el comportamiento (Ross, 1996; Jeyamkondan *et al.*, 2001).

$$MRPE = \frac{1}{N} \sum \frac{(O-P)}{O} \times 100 \quad (10)$$

$$MARE = \frac{1}{N} \sum \left| \frac{(O-P)}{O} \right| \times 100 \quad (11)$$

$$B_f = 10^{\sum \log(P/O)/N} \quad (12)$$

$$A_f = 10^{\sum |\log(P/O)|/N} \quad (13)$$

Un valor de MRPE cercano a cero es deseado, esto indica que no existe alguna tendencia en la predicción. Un valor positivo de MRPE sugiere que existe una subestimación por parte del modelo (falso-peligroso) y un valor

negativo indica sobreestimación (falso-seguro). El criterio estadístico MARE es similar al MRPE excepto que el MARE toma en cuenta el valor absoluto de los valores; por lo mismo un valor positivo es deseado. Ambos son expresados en porcentaje. Un valor de B_f superior a uno indica que el modelo sobreestima y viceversa. El A_f mide el error general del modelo (Gumuvadelli *et al.*, 2007).

5.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para cada experimento se realizaron dos repeticiones independientes. Los conteos microbianos fueron el promedio de dos réplicas. Todos los valores están reportados como el promedio \pm error estándar. El efecto de los antimicrobianos naturales sobre el pH y A_w fueron analizados mediante un ANOVA de una vía. El efecto de los antimicrobianos sobre el crecimiento de *S. aureus* (Log UFC/g) a través del tiempo bajo condiciones fluctuantes de temperatura, fue analizado mediante un GLM ANOVA bloqueando el tiempo. La separación de medias fue realizada por la prueba de Tukey. El nivel de confianza fue de $\alpha=0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el paquete estadístico NCSS 2007.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. CARACTERÍSTICAS INICIALES RB y JAMÓN

La sobrevivencia y desarrollo de cualquier microorganismo, tal como el de *S. aureus*, depende de las propiedades fisicoquímicas del sustrato en el que se encuentre. En este apartado se presentan las características fisicoquímicas, pH y Aw, y las cuentas microbiológicas, BMAs y *S. aureus*, iniciales del RB-modelo y del jamón-modelo, los cuales fueron utilizados para el desarrollo de sus respectivos modelos.

El pH del RB y del jamón previo a la cocción fue 5.53 ± 0.06 y 5.84 ± 0.00 , respectivamente. En ambos casos, el pH se encuentra cercano al rango óptimo para el crecimiento de *S. aureus*, que es de 6-7 (ICMSF, 1996). Gill y Newton (1980) mencionan que el pH encontrado generalmente en la carne fresca (5.50), mantiene a *S. aureus* en desventaja cuando se encuentra frente a otros microorganismos. Este pH es cercano al observado para el RB, el cual es igual al pH reportado para músculo *semimembranosus* fresco, que es de 5.50 ± 0.13 (Torrescano *et al.*, 2003), aún cuando se le agregó la salmuera. Por lo que el crecimiento de *S. aureus* será más limitado a diferencia del jamón de cerdo crudo, el cual al comparar su pH con el dato reportado en la literatura para carne de cerdo cruda, 5.6-5.7, este sufrió un aumento debido a la incorporación de la salmuera (Samelis *et al.*, 1998). Esta diferencia entre los dos productos cárnicos probablemente se deba a que la carne de res tiene una mayor capacidad para amortiguar cambios de pH y por lo mismo no se afecta su pH por la adición de otros ingredientes.

La actividad de agua (Aw) del RB-modelo fue de 0.976 ± 0.002 y la del jamón-modelo fue de 0.981 ± 0.001 . En el caso del jamón fue el único que estuvo dentro del valor de Aw óptimo de crecimiento de *S. aureus*, el cual es 0.98 (ICMSF, 1996). Aun así, los valores reportados de Aw para ambos

productos cárnicos son inferiores a los de la carne cruda (res o cerdo) que es de 0.99 (ICMSF, 2000). Esta disminución de la A_w se puede atribuir al efecto de la sal y los fosfatos que se incorporaron en la salmuera (Borch *et al.*, 1996). El crecimiento de *S. aureus* no se afecta tanto si no está dentro del rango óptimo de A_w , contrario al de pH. De hecho, las altas concentraciones de sal encontradas en los productos cárnicos favorecen selectivamente el desarrollo de *S. aureus*, el cual tiene la habilidad de crecer a valores de A_w tan bajos de 0.86 (Atanassova *et al.*, 2001).

En cuanto a la carga microbiana inicial de BMAs del RB-modelo y del jamón-modelo fueron de 6.63 ± 0.34 y de 5.92 ± 0.35 , respectivamente. Estos valores, a pesar de que se pueden considerar altos, se encuentran dentro de los niveles permitidos por la Secretaría de Salud en la NOM-034-SSA1-1993. Esta marca un límite de 6.7 Log UFC de BMA/g para carne molida sin importar la especie de la que provenga. En E.U.A. no existe ninguna Norma que establezca los límites microbiológicos permitidos en carne fresca. Aun así, los valores obtenidos en este estudio, se encuentran por encima de los reportados por Scanga *et al.* (2000) para carne de res molida. Ellos encontraron en E.U.A. y Canadá una cuenta de BMAs de 3.7-4.6 Log UFC/g, sin importar el origen de la carne y el tipo de recorte (%grasa) del que provenga. Sin embargo, la inyección de la salmuera puede traer consigo un aumento de los recuentos microbiológicos, tal como lo observado por Samelis *et al.* (1998) en el caso del jamón de cerdo. Ellos observaron un aumento en la carga microbiana de BMAs al inyectar la salmuera a la pierna de cerdo (pieza completa), la cual de 4.86 Log UFC/g aumentó a 5.15 Log UFC/g. No obstante, existe una gran diferencia entre las cargas microbianas de los productos elaborados en este trabajo y los valores reportados para carne cruda de res y cerdo por Scanga *et al.* (2000) y Samelis *et al.* (1998), respectivamente. Estas diferencias probablemente se deben a las condiciones sanitarias en las que se obtuvo la carne.

En cuanto a los valores de los recuentos de *S. aureus* en RB y jamón previo a la cocción, estos fueron de 1.89 ± 0.43 y de 1.91 ± 0.19 , respectivamente. Estos valores no se encuentran tan alejados a los reportados para carne de res (1.0 Log UFC/g) y jamón previo a cocción (<2.0 Log UFC/g) (Scanga *et al.*, 2000; Samelis *et al.*, 1998).

6.2. CRECIMIENTO DE *S. aureus* EN CONDICIONES ISOTÉRMICAS

El comportamiento de *S. aureus* bajo condiciones isotérmicas fue similar en el RB (Figura 1) y jamón (Figura 2), por lo que se discutirán en conjunto. La temperatura mínima a la cual se registró crecimiento en ambos productos fue a los 20°C (Figuras 1a y 2a). A partir de esta temperatura se observó que conforme aumentaba la temperatura, el crecimiento de *S. aureus* era favorecido. Este efecto llegó a un punto máximo a los 42.5°C, donde se observó que su crecimiento era más rápido y además alcanzó una mayor carga máxima (Figuras 1g y 2g). Posteriormente se observó una disminución en la habilidad de crecimiento (Figuras 1h y 2h). Es importante notar que no se observó crecimiento a 12.5, 15 y 47.5°C (Gráficos no presentados).

La temperatura mínima evaluada en la cual se observó crecimiento de *S. aureus* en ambos productos cárnicos fue 20°C (Figura 1a y 2a). Esta temperatura, se podría considerar que es alta para la industria cárnica, ya que generalmente en el procesamiento de la carne se emplean temperaturas de refrigeración entre 4-10°C. De hecho, en caso de una desviación de temperatura cercana a los 20°C durante el procesamiento del RB y del jamón por un tiempo <12 h no representaría mayor problema debido a que *S. aureus* inicia su fase exponencial hasta las 12 h. A partir de esto se podría inferir que si las fluctuaciones de temperatura dentro del área de proceso se mantienen por debajo de los 15°C, o si llegará a existir exposiciones cortas a temperaturas cercanas a 20°C, el riesgo de crecimiento de *S. aureus* sería mínimo.

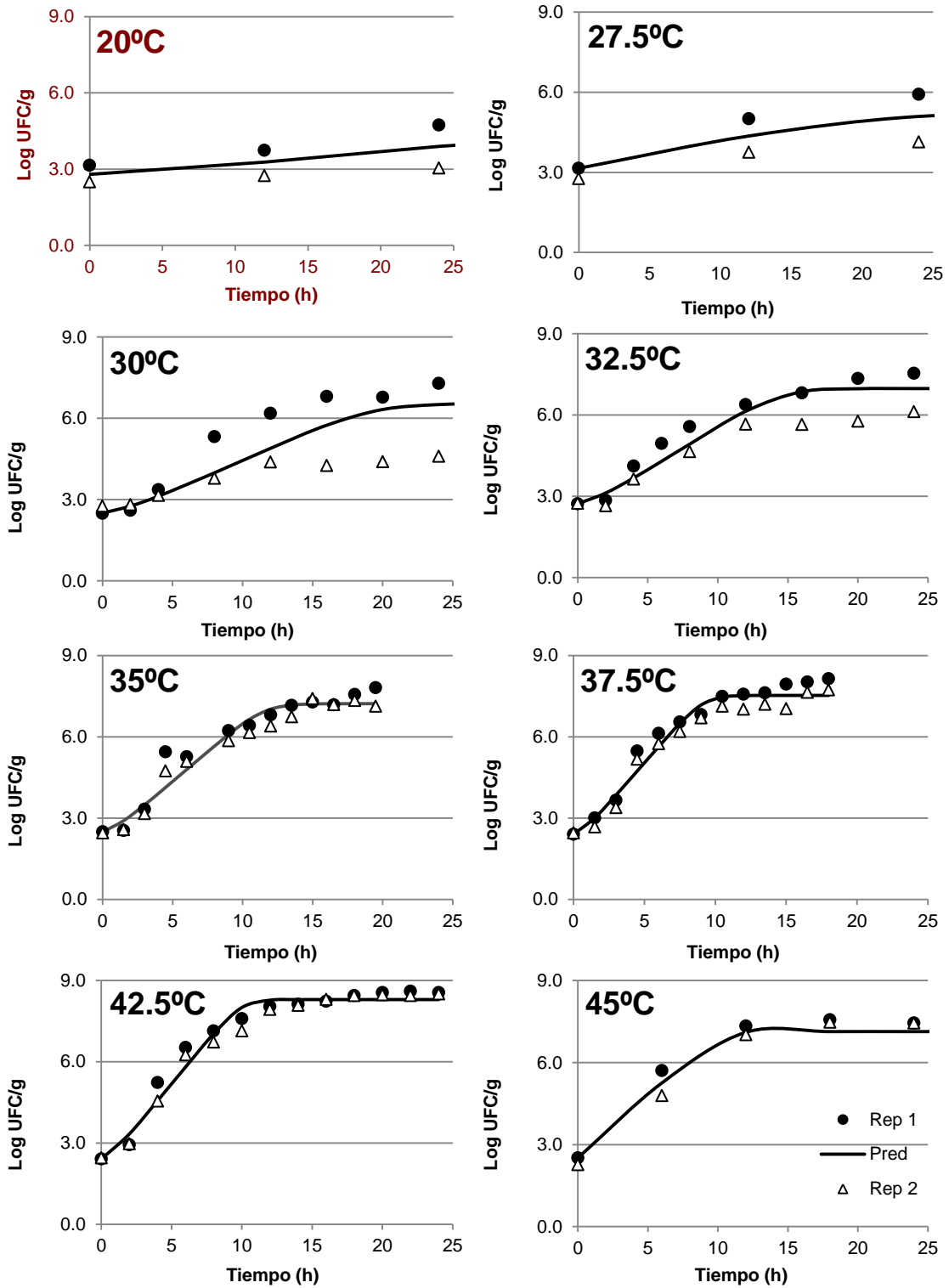


Figura 1. Crecimiento de *S. aureus* de 20°C a 45°C en roast beef previo a la cocción ajustado al modelo de Baranyi.

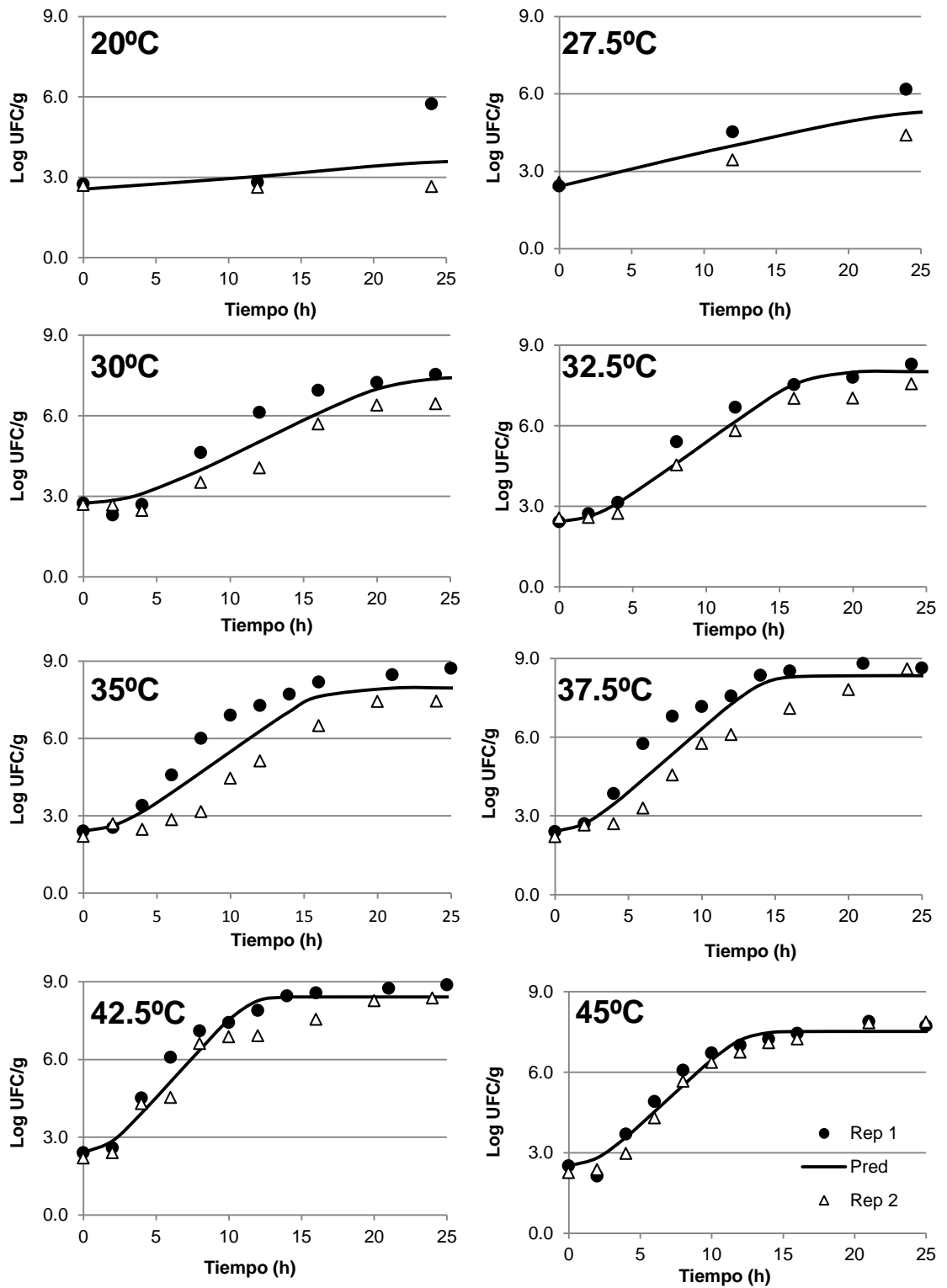


Figura 2. Crecimiento de *S. aureus* de 20°C a 45°C en jamón previo a la cocción ajustado al modelo de Baranyi.

Es importante hacer notar que se encontraron diferencias entre las repeticiones, principalmente entre menor fue la temperatura de incubación. En el RB estas diferencias fueron muy evidentes de 20-30°C (Figuras 1a-c) y en el jamón a 20-27.5°C (Figura 2a-b). Esta falta de repetitividad se puede atribuir a las diferencias significativas ($P < 0.05$) que se encontró entre replicas, en ambos productos cárnicos, en las cuentas iniciales de BMAs. En RB, en las repeticiones 1 y 2, fueron de 6.27 ± 0.09 y 6.87 ± 0.11 , y en el jamón fueron de 5.65 ± 0.27 y 6.17 ± 0.06 Log UFC/g, respectivamente. En ambos productos cárnicos la repetición 2 tuvo una carga microbiana más alta, y esto pudo haber limitado en un mayor grado el crecimiento *S. aureus* debido al efecto Jameson. Este efecto se refiere a la supresión del crecimiento por todos los microorganismos en el alimento cuando la población microbiana total ha alcanzado una densidad poblacional máxima (Cornu *et al.*, 2010). En el caso de microorganismos como *S. aureus*, que es débil competidor, es inhibido cuando microorganismos de crecimiento rápido alcanzan una población máxima antes de que este lo logre. Este efecto también fue observado en leche en presencia de bacterias ácido lácticas iniciadoras (BAL) (Le Marc *et al.*, 2009). Le Marc *et al.*, (2009) observaron que a mayor inóculo inicial de BAL, la inhibición de *S. aureus* era mayor, afectando sus parámetros de crecimiento tal como la carga máxima alcanzada, efecto igualmente observado en este trabajo.

Además, una posible explicación por la cual exista una mayor diferencia entre la repetición 1 y 2 conforme la temperatura de incubación es más baja, es por la distancia respecto a la temperatura óptima de crecimiento. Un estudio relacionado a este efecto fue realizado por McCoy y Faber (1966). Ellos evaluaron la influencia de varios microorganismos saprófitos de la carne, la mayoría de ellos psicrótrofos, sobre el crecimiento de *S. aureus*. McCoy y Faber (1966) observaron que ciertas especies nativas afectan la carga máxima alcanzada de este patógeno a 25°C y no a 35°C. A partir de esto se puede

inferir que conforme *S. aureus* se aleje de su temperatura óptima, la microflora nativa limita de una mayor manera su crecimiento.

Al comparar los resultados experimentales obtenidos con los reportados en literatura, la temperatura mínima en el caso del RB fue similar con lo reportado por Ingham *et al.* (2007). Ellos observaron crecimiento de *S. aureus* en carne cruda de res a los 18°C y no a los 15°C. En el caso del jamón, Ingham *et al.* (2007) reportaron crecimiento a partir de los 15°C en carne de cerdo. Esta diferencia en el jamón probablemente se debe a la presencia de los nitritos. Se ha reportado que los nitritos a las concentraciones y al pH en el que se encontraba, no afectan el desarrollo de *S. aureus* (Castellani y Niven, 1954). Sin embargo, es posible que su incorporación en conjunto con los otros ingredientes presentes en la formulación del producto del presente estudio haya limitado el crecimiento de *S. aureus* por algún efecto sinérgico entre ellos.

El crecimiento óptimo de *S. aureus* en RB y jamón previo a la cocción fue observado a una temperatura de 42.5°C (Figuras 1g y 2g). Schmitt *et al.* (1990) reportaron una temperatura óptima de 37-41°C para cepas enterotoxigénicas en medio de cultivo, mientras que Ingham *et al.* (2007) reportaron temperaturas óptimas de crecimiento para *S. aureus* en carne fresca de res y cerdo de 38°C y 40.5°C, respectivamente. Al comparar los datos de este trabajo con los de Ingham *et al.* (2007), se observa que existe una diferencia entre 5-2°C. Esta diferencia puede ser atribuida al efecto del sustrato sobre el crecimiento del microorganismo (Tamplin *et al.*, 2005).

La temperatura máxima de crecimiento fue de 45°C tanto en RB como en jamón de cerdo (Figura 1h y 2h). Schmitt *et al.* (1990) reportaron una temperatura máxima de crecimiento, en medio de cultivo, de 39.5-48.5°C para *S. aureus* desarrollado en medio de cultivo, valor similar a lo encontrado en el presente estudio.

6.3. MODELOS PRIMARIOS

Cada repetición de cada curva de crecimiento isotérmica fue ajustada al modelo de Baranyi, y a partir de ello se obtuvieron los valores de y_0 , y_{max} , h_0 y μ_{max} para cada temperatura. Posteriormente, se obtuvo el valor promedio de h_0 , el cual fue de 0.81 y 2.14 para *S. aureus* en RB y jamón, respectivamente. Este parámetro para *C. perfringens* en jamón sin hueso cocido es de 6.7 (Amézquita *et al.*, 2005), y para *Salmonella* spp. en carne de cerdo, pollo y res estéril cruda es de 2.14, 1.75 y 2.20, respectivamente (Velugoti *et al.*, 2010; Juneja *et al.*, 2007, 2009). Tal como mencionan los demás autores, esta diferencia se debe al tipo de microorganismo utilizado y al sustrato alimenticio. Entre menor sea este valor, el microorganismo se adapta más rápidamente al sustrato. Por esto mismo, es de esperar que *S. aureus* se adapte más rápido al RB que al jamón. En consecuencia, en RB se observarán fases de latencia de menor duración y un inicio de fase exponencial más pronto.

En las Figuras 1 y 2 se muestra el ajuste de los datos experimentales del crecimiento de *S. aureus* en RB y jamón de cerdo previo a proceso de cocción al modelo de Baranyi. Los valores de los parámetros de ajuste, y_0 , y_{max} y μ_{max} , después de fijar el valor de h_0 promedio, así como los criterios estadísticos de evaluación del ajuste se presentan en las Tablas 4 y 5.

En el caso del valor de la y_0 promedio, este fue de 2.59 y 2.44 Log UFC/g, para RB y jamón, respectivamente. Ambos valores promedio se encuentran cercanos al inóculo inicial propuesto de 2.5 Log UFC/g. En las Tablas 4 y 5 se puede observar la dependencia de los parámetros y_{max} y la μ_{max} hacia la temperatura la cual fue modelada con la ecuación de Ratkowsky (estas serán discutidas más adelante).

Tabla 4. Parámetros de ajuste del modelo de Baranyi y criterios estadísticos de evaluación de ajuste de las curvas isotérmicas de crecimiento de *S. aureus* en RB previo a la cocción.

Temp (°C)	Rep	y₀ (Log UFC/g)	y_{max} (Log UFC/g)	μ_{max} (Ln UFC/g/h)	RMSE (Log UFC/g)	Pseudo-R²
20	1	3.08	5.66	0.19	0.130	0.982
	2	2.50	3.49	0.11	0.347	0.550
25	1	2.72	5.12	0.13	0.272	0.944
	2	2.46	4.08	0.06	0.253	0.856
27.5	1	3.15	6.32	0.40	0.272	0.938
	2	2.76	3.97	0.33	0.238	0.727
30	1	2.50	7.61	0.75	0.451	0.964
	2	2.76	5.87	0.24	0.467	0.880
32.5	1	2.72	7.68	0.82	0.420	0.965
	2	2.74	6.41	0.59	0.387	0.950
35	1	2.49	7.30	1.10	0.517	0.944
	2	2.45	7.15	0.96	0.393	0.965
37.5	1	2.41	7.77	1.43	0.377	0.973
	2	2.45	7.29	1.30	0.361	0.972
40	1	2.49	8.16	1.41	0.430	0.969
	2	2.39	8.08	1.25	0.339	0.982
42.5	1	2.41	8.29	1.56	0.397	0.974
	2	2.45	8.31	1.31	0.363	0.979
45	1	2.51	7.14	1.37	0.303	0.962
	2	2.27	7.13	1.10	0.285	0.972

Tabla 5. Parámetros de ajuste del modelo de Baranyi y criterios estadísticos de evaluación de ajuste de las curvas isotérmicas de crecimiento de *S. aureus* en jamón de cerdo previo a la cocción.

Temp (°C)	Rep	Y₀ (Log UFC/g)	Y_{max} (Log UFC/g)	μ_{max} ((Log UFC/g)/h)	RMSE (Log UFC/g)	Pseudo-R²
20	1	2.44	4.64	0.15	0.531	0.952
	2	2.69	3.43	0.00	0.194	0.994
25	1	2.42	5.09	0.18	0.572	0.945
	2	2.57	10.68	0.03	0.578	0.944
27.5	1	2.42	6.25	0.25	0.421	0.970
	2	2.57	4.29	0.15	0.644	0.930
30	1	2.74	7.85	0.33	0.391	0.974
	2	2.69	7.01	0.22	0.306	0.984
32.5	1	2.42	8.29	0.43	0.311	0.984
	2	2.57	7.74	0.34	0.290	0.986
35	1	2.41	8.42	0.51	0.304	0.984
	2	2.20	7.56	0.31	0.308	0.984
37.5	1	2.41	8.56	0.61	0.418	0.970
	2	2.20	8.17	0.39	0.333	0.981
40	1	2.49	8.62	0.65	0.521	0.954
	2	2.20	8.29	0.50	0.489	0.960
42.5	1	2.41	8.59	0.68	0.437	0.968
	2	2.20	8.25	0.57	0.578	0.954
45	1	2.51	7.53	0.53	0.338	0.980
	2	2.27	7.50	0.49	0.312	0.984

De acuerdo a los parámetros estadísticos RMSE y pseudo-R², el modelo de Baranyi tiene un buen ajuste hacia cada una de las repeticiones del crecimiento isotérmico de *S. aureus* en ambos productos cárnicos. Los valores de RMSE describen que tanto se alejaron en promedio los valores observados con los predichos. En el RB y el jamón estos oscilaron entre 0.130-0.517 y 0.194-0.644 Log UFC/g, respectivamente. La mayoría de los valores obtenidos se encontraron dentro de los que se estipula es el error dado por las técnicas de cultivo de extensión en superficie, que es de 0.5 Log UFC/g (Gumuvadelli *et al.*, 2007). En cuanto a los valores de pseudo-R² la mayoría se encontró por encima de 0.90, lo que implica un buen ajuste por parte del modelo.

6.4. MODELOS SECUNDARIOS

El efecto de la temperatura sobre la μ_{max} y su ajuste del modelo de Ratkowsky en RB y jamón, se presenta en las Figuras 3 y 4, respectivamente. En estos gráficos se observa el comportamiento de la μ_{max} de *S. aureus* en cada uno de los productos cárnicos, donde a la T_{min} su valor equivale cercanamente a cero hasta llegar a un pico máximo, que es la temperatura óptima de crecimiento (T_{opt}), y posteriormente disminuye hasta llegar a la temperatura más alta a la puede desarrollar este patógeno (T_{max}). Este comportamiento en RB (Figura 3), al ser ajustado a la ecuación de Ratkowsky da como resultado la siguiente ecuación:

$$\mu_{max} = 0.0032(T - 16.85)^2(1 - \exp(0.2041(T - 48.18))) \quad (14)$$

Este modelo para RB previo a la cocción mostró un buen ajuste, con unos valores de RMSE de 0.1406 (Ln UFC/g)/h (0.061 (Log UFC/g)/h) y una pseudo-R² de 0.9466. Las temperaturas teóricas de crecimiento de este patógeno en roast beef derivadas del modelo fueron: $T_{min}=16.85^{\circ}\text{C}$, $T_{opt}=42.2^{\circ}\text{C}$ y $T_{max}=48.18^{\circ}\text{C}$.

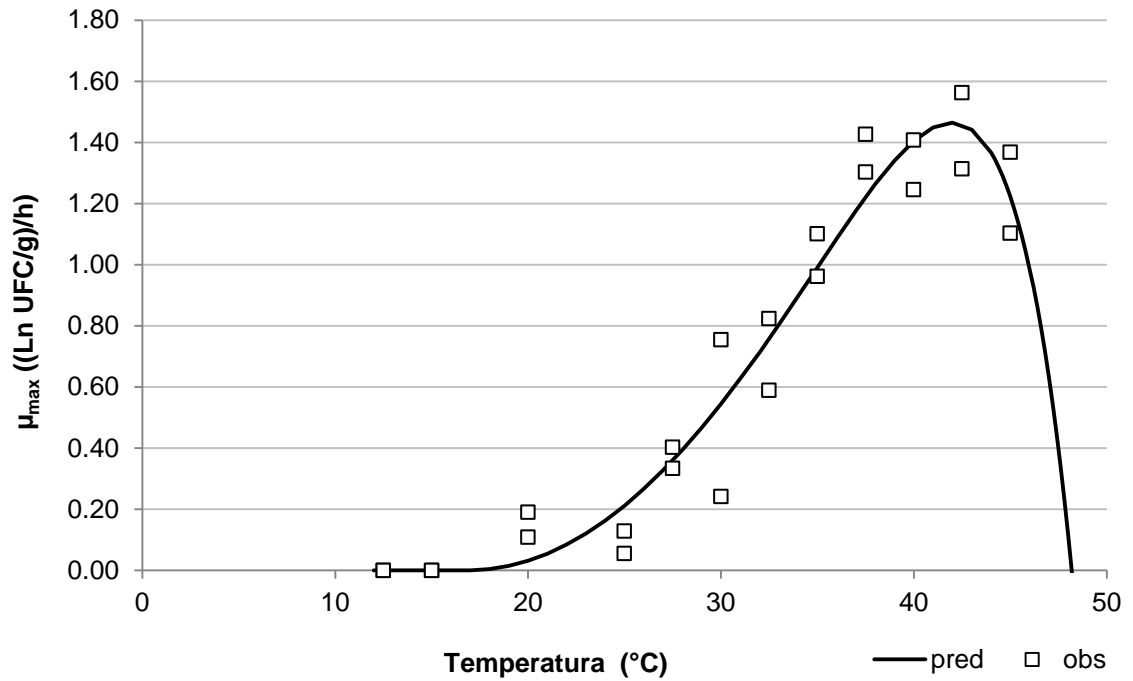


Figura 3. Velocidad máxima de crecimiento en función de la temperatura de *S. aureus* en roast beef crudo ajustada al modelo de Ratkowsky.

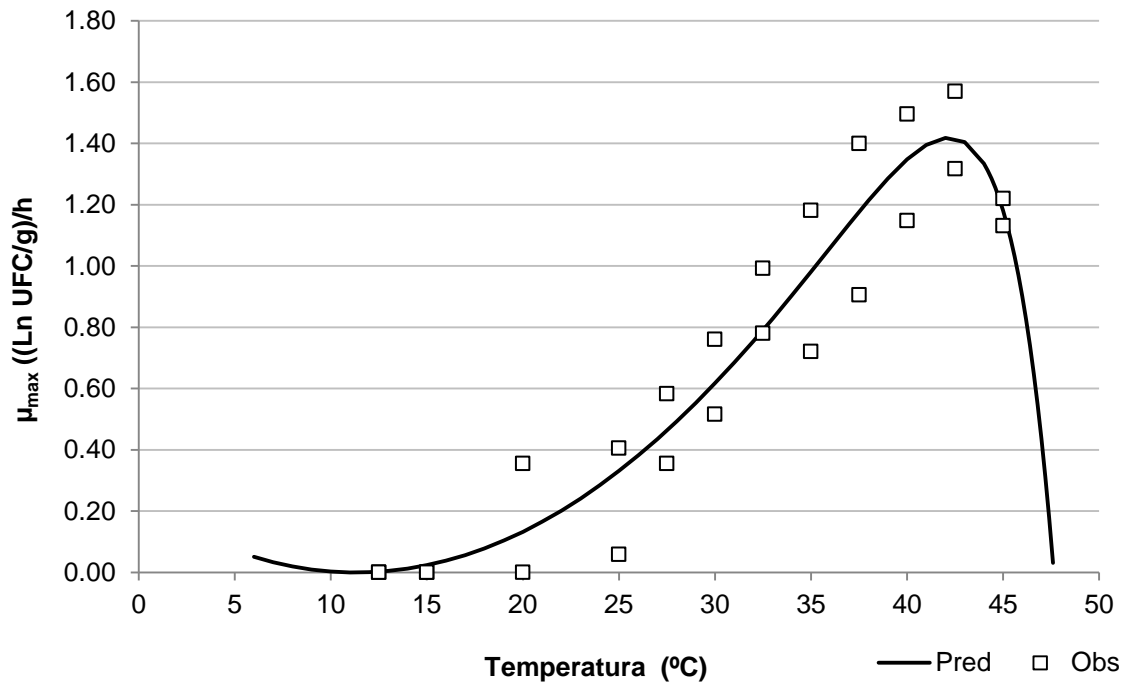


Figura 4. Velocidad máxima de crecimiento en función de la temperatura de *S. aureus* en jamón previo a la cocción ajustada al modelo de Ratkowsky.

Para jamón de cerdo previo a la cocción (Figura 4), el modelo para estimar la μ_{max} de *S. aureus* fue:

$$\mu_{max} = 0.0017(T - 11.35)^2(1 - \exp(0.3333(T - 47.64))) \quad (15)$$

Al evaluar estadísticamente la precisión de esta ecuación para describir el comportamiento de *S. aureus* en función de la temperatura, demostró un buen ajuste, lo cual se observa en los valores de RMSE (0.169 (Ln UFC/g)/h, 0.073 (Log UFC/g)/h) y de pseudo- R^2 (0.911). Por otro lado, las T_{min} , T_{opt} y T_{max} derivadas del ajuste del modelo son de 11.35, 42.00 y 47.64°C, respectivamente.

En cuanto a los valores de RMSE, estos no se encuentran tan alejados a los reportados para el ajuste de otros modelos, como los de *Salmonella* Enteritidis en yema de huevo y *Salmonella* spp en carne de cerdo cruda estéril, donde en ambos casos se obtuvo una RMSE de 0.05 (Log UFC/g)/h (Gumuvadelli *et al.*, 2007; Velugoti *et al.*, 2010). El motivo por el cual el valor de la RMSE en este trabajo fue un poco más alta, fue probablemente debido a la falta de repetitividad entre las réplicas de las curvas de crecimiento isotérmicas.

Respecto a las T_{opt} y T_{max} derivadas de cada modelo se encontraron cercanas a lo observado de 42.5 y 45°C, respectivamente. Sin embargo, la T_{min} , calculada por el modelo mostró una gran diferencia respecto a lo observado experimentalmente. Esta diferencia fue más grande en el caso del jamón crudo, donde la T_{min} teórica fue de 11.35°C, y la observada de 20°C. Similarmente, esta falta de exactitud en la T_{min} también fue notado al ajustar el modelo de Ratkowsky al comportamiento de *Salmonella* spp. en carne de res estéril y en *E. coli* O157:H7 en carne de res mecánicamente ablandada. La temperatura mínima a la cual se observó crecimiento por parte de *Salmonella* spp. fue de 10°C, y el modelo arrojó una T_{min} de 0.09°C (Juneja *et al.*, 2009). En el caso de *E. coli* O157:H7, la temperatura más baja a la cual presentó la habilidad de

desarrollar fue de 10°C y el modelo calculó una T_{min} de 1.49°C (Huang, 2010). Según Ross y Dalgaard (2004) esta diferencia de 5-10°C por debajo de lo observado de manera experimental es normal. Esto implica que el modelo de Ratkowsky presenta un problema al ajustar las T_{min} . La falta de exactitud en el valor de la T_{min} puede dar lugar a sobrestimaciones cuando las temperaturas a las cuales se quiera predecir el crecimiento impliquen valores por debajo de los 20°C, sobretodo en el caso del jamón de cerdo. Por lo que estimaciones por debajo de esta temperatura deben tomarse con cuidado.

La y_{max} en ambos productos cárnicos mostró un comportamiento similar a la μ_{max} (Figuras 5 y 6). Es decir que, conforme aumenta la temperatura aumenta la y_{max} , hasta llegar a un punto máximo a la T_{opt} y posteriormente disminuye. Este efecto de la temperatura sobre la y_{max} no sucede en muchos de los patógenos, como en el caso de *Salmonella* en carne de cerdo cruda estéril (Velugoti *et al.*, 2010) y en yema de huevo (Gumuvadelli *et al.*, 2007). No obstante, Tamplin *et al.* (2005) si encontraron un efecto de la temperatura sobre la y_{max} de *E. coli* O157:H7 en carne de res cruda estéril, pero la variabilidad no fue tan alta como la mostrada por *S. aureus*. De hecho, en el caso de *E. coli* O157:H7 conforme aumentaba la temperatura, la y_{max} disminuía. Tamplin *et al.* (2005) utilizó un modelo cúbico, a diferencia del presente trabajo, para modelar este efecto. La ecuación propuesta para modelar el efecto de la temperatura se basa en la ecuación de Ratkowsky. El modelo secundario de la y_{max} de *S. aureus* en el RB previo a la cocción (Figura 5) es la siguiente:

$$y_{max} = 0.3166(T - 13.017)^2(1 - \exp(0.0017(T - 54.421))) + 2.59 \quad (16)$$

Esta ecuación ajustada, más que medir la y_{max} , mide el crecimiento máximo real del microorganismo, ya que la carga inicial se resta. Esta ecuación tuvo una RMSE de 0.72 Log UFC/g y una pseudo- R^2 de 0.89. Las temperaturas teóricas de crecimiento de este patógeno en este sustrato derivadas del ajuste de este modelo fueron: $T_{min}=13.02^\circ\text{C}$ y $T_{max}=54.42^\circ\text{C}$.

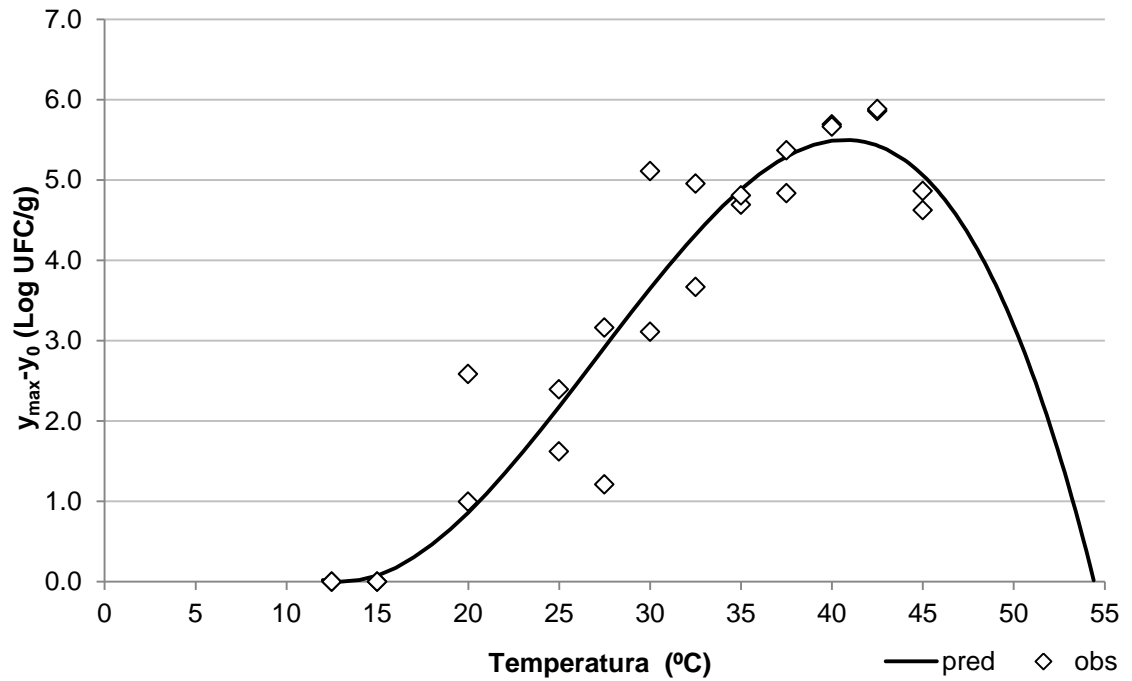


Figura 5. Crecimiento real de *S. aureus* en función de la temperatura en roast beef previo a la cocción ajustada al modelo de Ratkowsky.

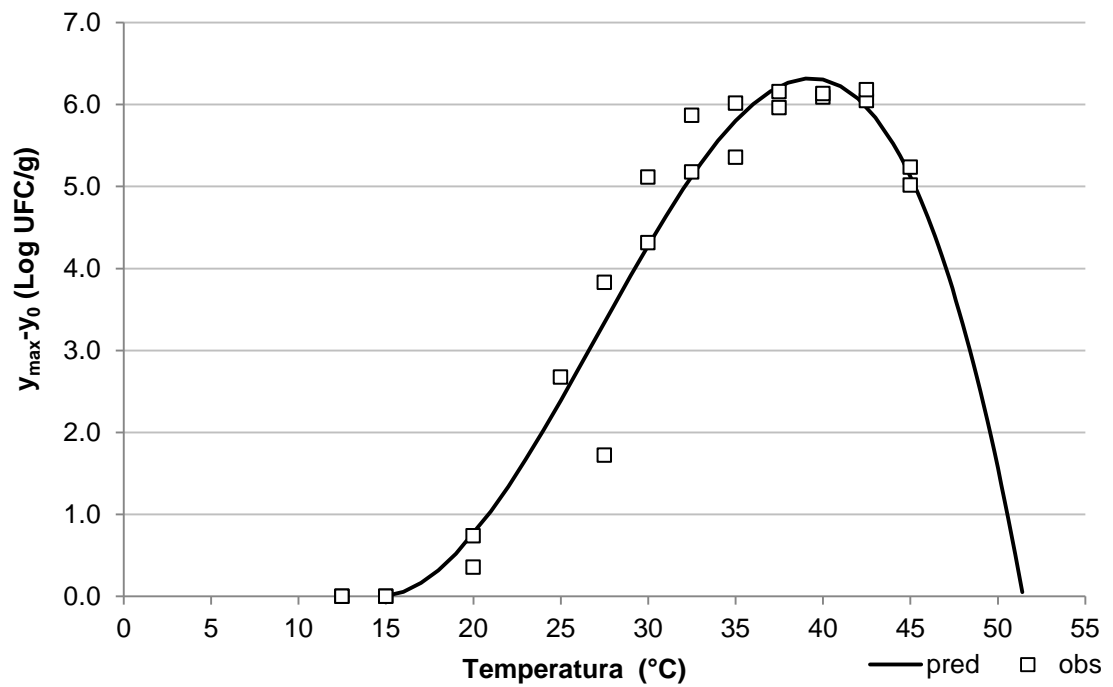


Figura 6. Crecimiento real de *S. aureus* en función de la temperatura en jamón previo a la cocción ajustada al modelo de Ratkowsky.

En el caso de la y_{max} de *S. aureus* en jamón de cerdo (Figura 6), la ecuación (7) ajustada fue la siguiente:

$$y_{max} = 0.3066(T - 14.604)^2(1 - \exp(0.0028(T - 51.444))) + 2.44 \quad (17)$$

Los criterios estadísticos de evaluación del ajuste de RMSE fue de 0.46 Log UFC/g y de pseudo-R² fue de 0.96. Por otro lado, las T_{min} y T_{max} derivadas del ajuste del modelo fueron de 14.60 y 51.44°C, respectivamente.

Los valores obtenidos de RMSE y pseudo-R² en ambos casos demostraron un buen ajuste por parte de la ecuación modificada de Ratkowsky. Esto implica que en el caso de *S. aureus*, la dependencia de la y_{max} hacia la temperatura, puede ser modelada con esta ecuación. Sin embargo en este caso, a diferencia del modelo secundario ajustado de la μ_{max} , la T_{min} es mucho más cercana a la observada experimentalmente. En contraste a la T_{max} que muestra una separación entre 5 y 10°C respecto a lo observado, lo cual habla de un mal ajuste por parte del modelo a temperaturas superiores a la T_{max} .

6.5. MODELOS DINÁMICOS

Para la predicción del crecimiento de *S. aureus* bajo condiciones fluctuantes de temperatura en RB y jamón previo a proceso de cocción, los parámetros derivados del ajuste de los modelos secundarios y los primarios que se integraron al algoritmo (Subbiah, 2007) se muestran en la Tabla 6.

Por último, se determinó la capacidad de los modelos dinámicos RB y jamón para estimar el crecimiento de *S. aureus* bajo condiciones fluctuantes de temperatura. Para ello, datos de crecimiento experimentales de *S. aureus* bajo dos perfiles de temperatura (sinusoidal y exponencial) se compararon con predicciones dadas por los modelos en las mismas condiciones.

Tabla 6. Parámetros de entrada del modelo dinámico.

	Roast beef	Jamón de cerdo
y_0	2.59	2.44
y_{max}	8.31	8.59
h_0	0.81	2.14
a	0.0032	0.0017
T_{min}	16.85	11.35
b	0.2041	0.3333
T_{max}	48.18	47.64

6.6. VALIDACIÓN DEL MODELO DINÁMICO DEL CRECIMIENTO DE *S. aureus* EN ROAST BEEF

Los perfiles de validación se aplicaron a tres productos diferentes, al RB utilizado para el desarrollo del modelo, RB-modelo, y a dos productos con antimicrobianos, RB-MO y RB-Opt. Los resultados se presentan por separado.

6.6.1. VALIDACIÓN CON ROAST BEEF-MODELO

El modelo dinámico, al utilizar el RB-modelo, en ambos estudios de validación (sinusoidal y exponencial) mostró una evidente tendencia a sobreestimar el crecimiento microbiano (Figuras 7 y 8). Los valores obtenidos de mayores de 1 del B_f y los valores negativos del MRPE, para ambos perfiles de fluctuación de temperatura, demuestran la tendencia a sobreestimar por parte del modelo (Tabla 7). Además, la separación entre los valores predichos y los observados es considerable, principalmente en el caso del perfil exponencial. Esto se refleja en el valor del MARE, el cual señaló una sobreestimación del 14.53% en el caso del estudio de validación sinusoidal y del 20.78% en el perfil de calentamiento exponencial. Este porcentaje equivale 1.16 y 0.91 Log UFC/g para las validaciones sinusoidal y exponencial, respectivamente, valores dados por el RMSE (Tabla 7). En general, el hecho de que el modelo dinámico de *S. aureus* en RB sobreestime, es preferible a que el modelo subestime, ya que cae dentro de la zona de predicciones falso-seguras.

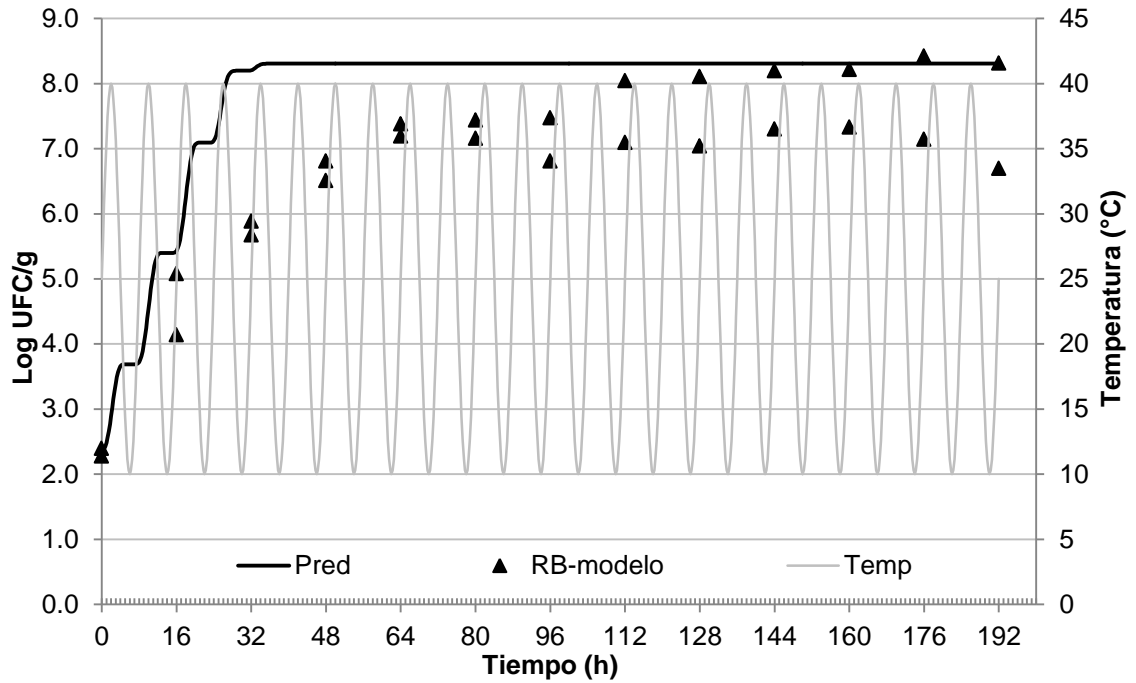


Figura 7. Validación del modelo dinámico de *S. aureus* en RB-modelo previo a la cocción bajo un perfil de temperatura sinusoidal (10-40°C, 8h/ciclo) por 196 h.

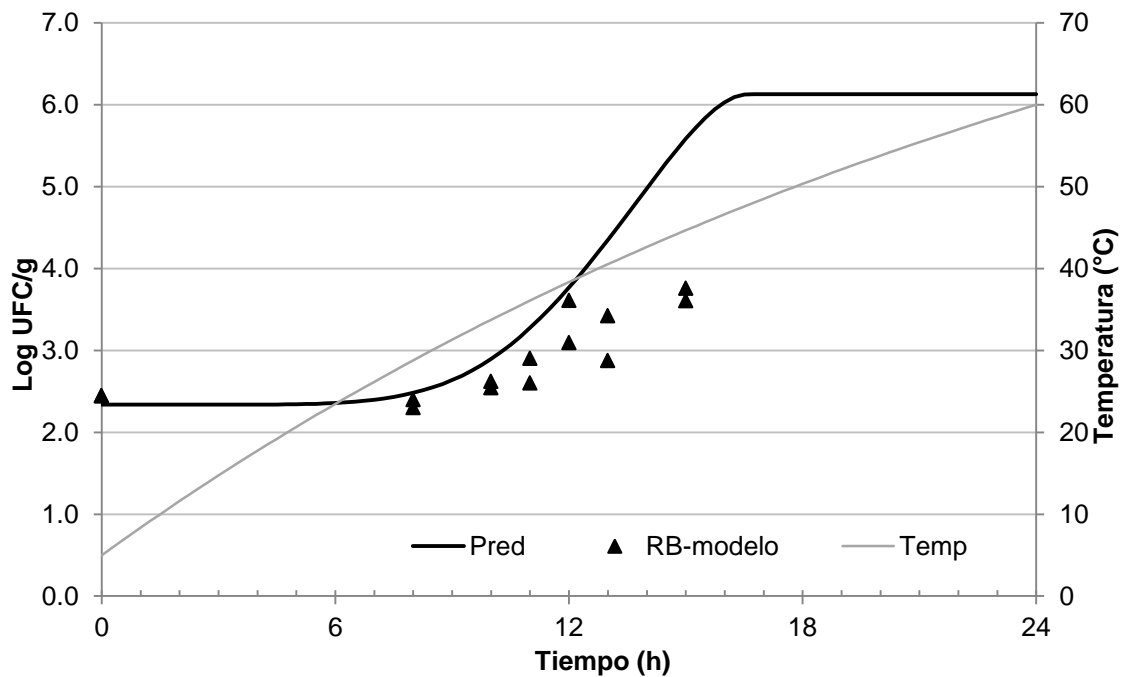


Figura 8. Validación del modelo dinámico de *S. aureus* en RB-modelo previo a la cocción bajo un perfil de calentamiento exponencial (5-60°C) por 24 h.

Tabla 7. Comparación de varios criterios estadísticos para la validación del modelo predictivo de *S. aureus* en roast beef previo a proceso de cocción.

Perfil	Producto	MRPE (%)	MARE (%)	Bf	Af	RMSE (Log UFC/g)	pseudo-R ²
Sinusoidal 10-40°C 8h/ciclo 196h	RB-modelo	-14.23	14.53	1.06	1.05	1.165	0.467
	RB-Opt	-20.17	20.63	1.08	1.07	1.436	0.227
	RB-MO	-41.37	41.41	1.14	1.14	2.326	-1.023
Caletamiento exponencial 5-60°C 24h	RB-modelo	-19.53	20.78	1.07	1.08	0.911	-2.443
	RB-Opt	-36.07	36.15	1.13	1.13	1.249	-12.360
	RB-MO	-45.31	45.36	1.16	1.16	1.449	-25.015

En ambos estudios de validación, el crecimiento probablemente fue sobreestimado por tres razones: 1) la falta de precisión al momento de determinar los parámetros de crecimiento, 2) la exposición a temperaturas por debajo de su T_{min} y 3) al efecto de la microflora acompañante.

La falta de precisión al momento de determinar los parámetros específicos de crecimiento de *S. aureus* pudo deberse principalmente a la falta de repetitividad entre sus replicas lo que trae en consecuencia una variación en estos (y_0 , y_{max} , h_0 , a , b , T_{min} y T_{max}). Por otro lado, la falta de puntos experimentales para estimar la fase de latencia de cada curva de crecimiento, afecta el valor de la h_0 promedio calculada. En el caso específico de este trabajo, el modelo de Baranyi no detectó la fase de latencia en algunas curvas de crecimiento isotérmicas dio valores de h_0 de 0. Esto fue observado principalmente en temperaturas por debajo de los 32.5°C (datos no presentados). A partir de esto se derivó un valor bajo de la h_0 promedio, en consecuencia se predijeron cortas fases de latencia y por ende, la fase de crecimiento exponencial más inició más pronto.

Por otro lado, cuando los microorganismos son expuestos a temperaturas fuera de sus temperaturas óptimas de crecimiento son estresadas, lo cual causa cambios en la composición de la membrana de fosfolípidos y reorganizaciones metabólicas de carbohidratos y aminoácidos (Sánchez *et al.*, 2010). Este tipo de efecto es observado principalmente en situaciones como la del perfil sinusoidal, en el cual *S. aureus* fue sometido continuamente a temperaturas por debajo de la T_{min} . La exposición a dichas temperaturas ocasionan un aumento en la duración de la fase de latencia después de cada evento y entre más tiempo se exponga el microorganismo a estas temperaturas, el efecto es mayor (Velugoti *et al.*, 2010). Este comportamiento fue observado igualmente durante la validación sinusoidal del modelo desarrollado para *Salmonella* spp. en carne de cerdo crudo estéril (Velugoti *et al.*, 2010).

Por último, la presencia de microorganismos psicrótrofos puede inhibir el desarrollo de *S. aureus*. En el caso del RB crudo, al igual que en cualquier producto cárnico crudo, la microflora nativa está compuesta principalmente de bacterias psicrótrofas, las cuales crecen más rápido a temperaturas cercanas a las de refrigeración que *S. aureus*. Por lo que estas exposiciones a temperaturas bajas, permiten el desarrollo de estas bacterias psicrótrofas y por ende alcanzan una población máxima antes de que *S. aureus* lo logre, dando lugar a inhibición de su crecimiento (Efecto Jameson).

6.6.2. VALIDACIÓN CON ROAST BEEF CON ANTIMICROBIANOS

El modelo dinámico desarrollado para *S. aureus* en RB previo a proceso de cocción durante su validación con los productos que incluyeron antimicrobianos en su formulación (RB-Opt y RB-MO) mostró una mayor sobreestimación del crecimiento que en el RB-modelo (Figura 9 y 10, Tabla 7).

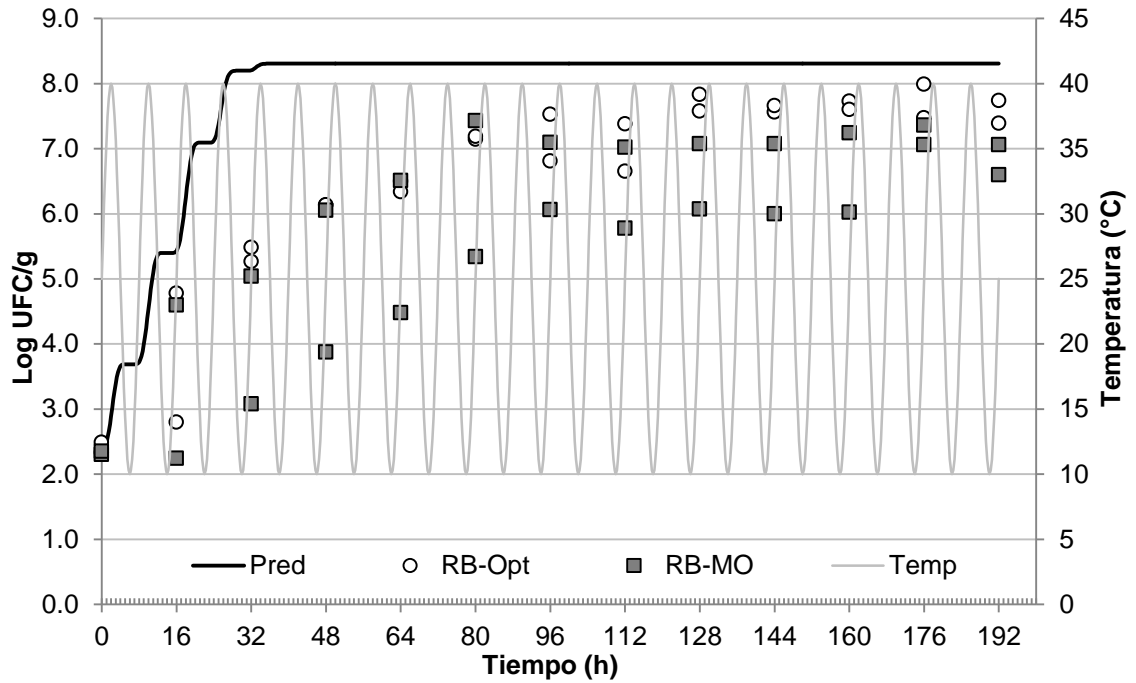


Figura 9. Validación del modelo dinámico de *S. aureus* en roast beef con antimicrobianos previo a la cocción bajo un perfil de temperatura sinusoidal (10-40°C, 8h/ciclo) por 196 h.

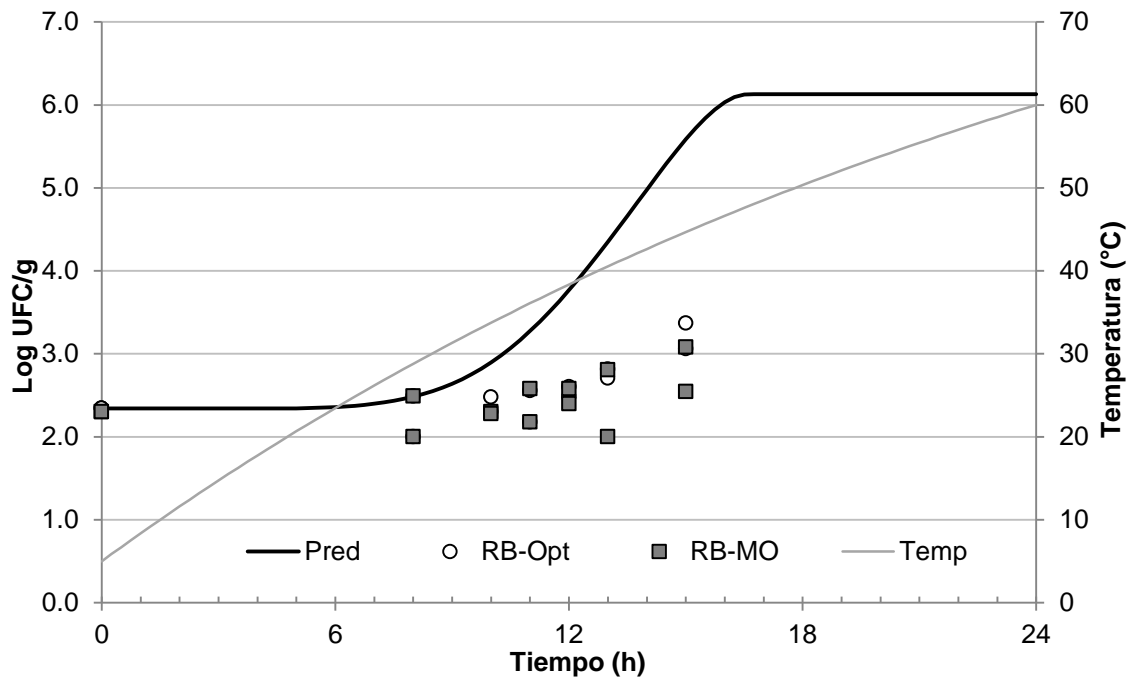


Figura 10. Validación del modelo dinámico de *S. aureus* en roast beef con antimicrobianos previo a la cocción bajo un perfil de calentamiento exponencial (5-60°C) por 24 h.

En el caso del perfil sinusoidal, tiene una sobreestimación en promedio de 1.43 y 2.32 Log UFC/g para los tratamientos RB-Opt y RB-MO, respectivamente. En el perfil de calentamiento exponencial la sobreestimación no es tan grande como en el perfil sinusoidal, aun así la sobreestimación promedio es de 1.24 y 1.44 Log UFC/g, para los productos RB-Opt y RB-MO, respectivamente. El incremento en la sobreestimación se puede atribuir al efecto bacteriostático de los antimicrobianos (Efecto discutido más adelante).

6.7. VALIDACIÓN DEL MODELO DINÁMICO DEL CRECIMIENTO DE *S. aureus* EN JAMÓN DE CERDO

6.7.1. VALIDACIÓN CON JAMÓN-MODELO

Cuando se validó con el jamón-modelo, tanto en el perfil sinusoidal como el exponencial, se observó una subestimación del crecimiento microbiano por parte del modelo dinámico obtenido (Figura 11 y 12). En el caso del perfil sinusoidal (Figura 11) se obtuvieron valores de MRPE y B_f de -4.599% y 1.017, respectivamente (Tabla 8), los cuales indican una sobreestimación por parte del modelo. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 11, al inicio de la incubación del producto, existe una subestimación del crecimiento, ya que a las 16 horas la cuenta experimental de estafilococos estaba en 6.5-6.8 Log UFC/g, cuando la estimación del modelo fue $\cong 5$ Log UFC/g. A partir de ello se puede inferir que la predicción del modelo cayó en la zona falso-peligrosa.

Similarmente, en la validación de calentamiento exponencial existió una subestimación (Figura 12). Aunque esta vez la subestimación si se refleja en los valores de MRPE y B_f (Tabla 8). El valor positivo del MRPE y el valor menor de 1 del B_f indican la subestimación. Sin embargo, el valor del RMSE obtenido de 0.465 Log UFC/g, es un indicador de que los valores predichos caen dentro del error dado por las técnicas de cultivo.

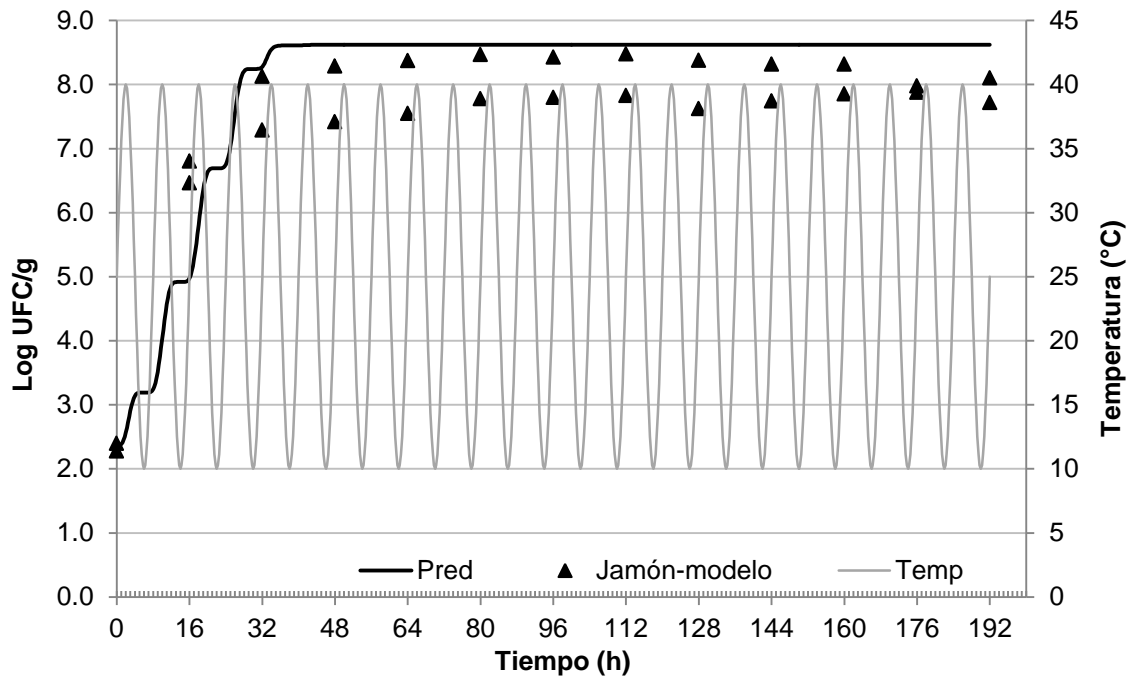


Figura 11. Validación del modelo dinámico de *S. aureus* en jamón-modelo previo a tratamiento térmico bajo un perfil de temperatura sinusoidal (10-40°C, 8h/ciclo) por 196 h.

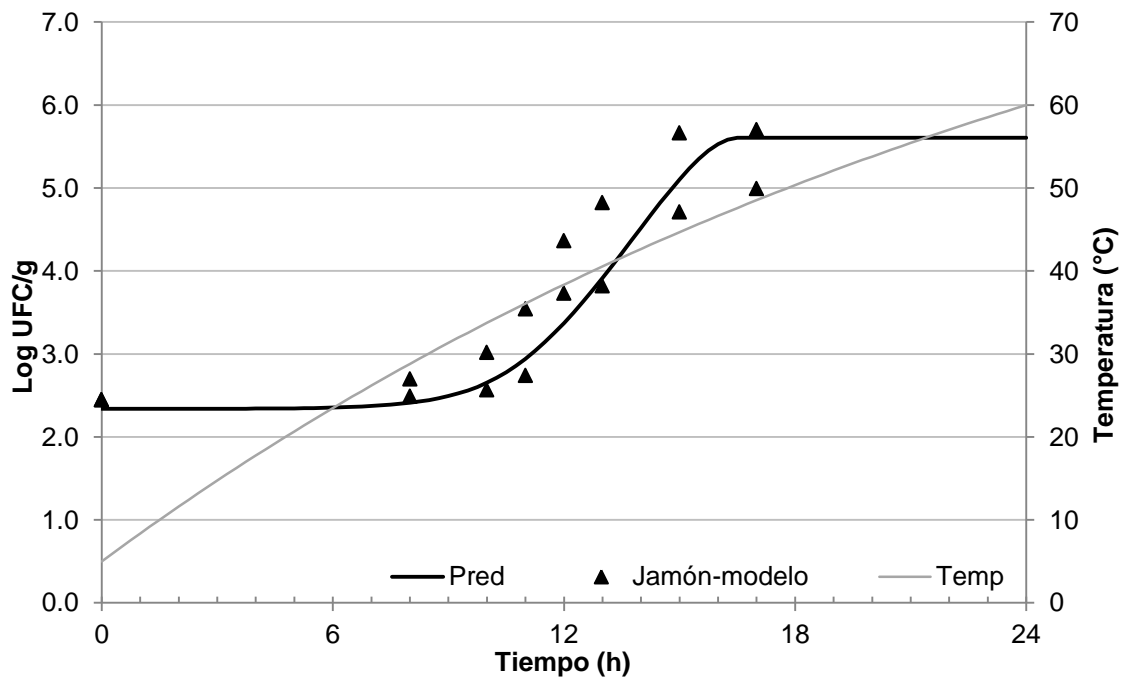


Figura 12. Validación del modelo dinámico de *S. aureus* en jamón-modelo previo a tratamiento térmico bajo un perfil de calentamiento exponencial (5-60°C) por 24 h.

Tabla 8. Comparación de varios criterios estadísticos para la validación del modelo predictivo de *S. aureus* en jamón previo a proceso de cocción..

Perfil	Producto	MRPE (%)	MARE (%)	Bf	Af	RMSE (Log UFC/g)	pseudo-R ²
Sinusoidal 10-40°C 8h/ciclo 196 h	Jamón-modelo	-4.599	8.622	1.017	1.038	0.784	0.745
	Jamón-Opt	-17.044	17.511	1.067	1.070	1.247	0.490
	Jamón-MO	-66.898	66.938	1.235	1.235	3.273	-6.081
Calentamiento exponencial 5-60°C 24h	Jamón-modelo	5.054	9.264	0.975	1.043	0.465	0.832
	Jamón-Opt	-36.520	38.499	1.126	1.136	1.410	-30.432
	Jamón-MO	-53.163	55.187	1.156	1.166	1.723	-27.277

Así mismo, se obtuvo un valor aceptable de la pseudo-R² y un valor del 9% de desviación entre lo observado y lo predicho, indicado por el MARE. Aun así, a pesar de la cercanía de las predicciones, el modelo subestima el crecimiento microbiano y por ende cae en un plano falso-peligroso, lo cual elimina la posibilidad de utilizar este modelo en la industria cárnica. Esta falta de precisión por parte del modelo, al igual que en el modelo de *S. aureus* en el RB, puede deberse a la poca repetitividad durante el desarrollo de las curvas de crecimiento isotérmicas y al efecto de la microflora acompañante.

El objetivo principal de modelar el crecimiento de *S. aureus* es predecir cuándo se alcanza una carga microbiana de 5 Log UFC/g, concentración a la cual se produce la enterotoxina termorresistente (Soriano *et al.*, 2002). Esta toxina tiene un tiempo de reducción decimal a 121°C (D_{121°C}) de 8-28 min, en contraste con las células vegetativas, el cual es mucho menor (D_{70°C} 0.3-0.04 min) (Pepe *et al.*, 2006). Esto significa que, a diferencia de las células vegetativas, esta toxina representa un peligro para la industria cárnica, ya que se requieren temperaturas altas para su inactivación, y por lo tanto, resiste fácilmente las temperaturas de cocción de los productos cárnicos. Por esto, el

modelo dinámico debe predecir con exactitud el crecimiento de *S. aureus* durante las etapas previas a alcanzar los 5 Log UFC/g. El hecho de que el modelo dinámico obtenido en este trabajo subestime, puede tener consecuencias negativas al ser aplicado a productos que han sufrido alguna desviación de temperatura durante su procesamiento.

6.7.2. VALIDACIÓN CON JAMÓN CON ANTIMICROBIANOS

Similarmente al caso del modelo dinámico de *S. aureus* en RB, el resultado de la validación con antimicrobianos en jamón, arrojó que el modelo dinámico sobreestimó el crecimiento de *S. aureus* (Figura 13 y 14, Tabla 8).

En el caso del perfil sinusoidal, tuvo una sobreestimación en promedio de 1.24 y 3.27 Log UFC/g para el jamón-Opt y jamón-MO, respectivamente. En el perfil de calentamiento exponencial la sobreestimación en jamón-Opt fue de 1.41 Log UFC/g y para el jamón-MO fue de 1.72 Log UFC/g. Además los valores del B_f fueron positivos, lo cual expresa la evidente sobrestimación por parte del modelo. Esta sobreestimación y separación tan grande de los datos observados se refleja en los porcentajes tan altos de MARE. Este porcentaje de desviación, es más grande en el caso del jamón-MO, donde el efecto bacteriostático es más notorio y por ende tiene porcentajes altos del 66.9 y 38.5% para las validaciones sinusoidal y calentamiento exponencial, respectivamente. Esta falta de ajuste por parte del modelo a productos cárnicos que contienen antimicrobianos en su formulación era de esperarse, ya que el objetivo de estos ingredientes es el de limitar el crecimiento bacteriano.

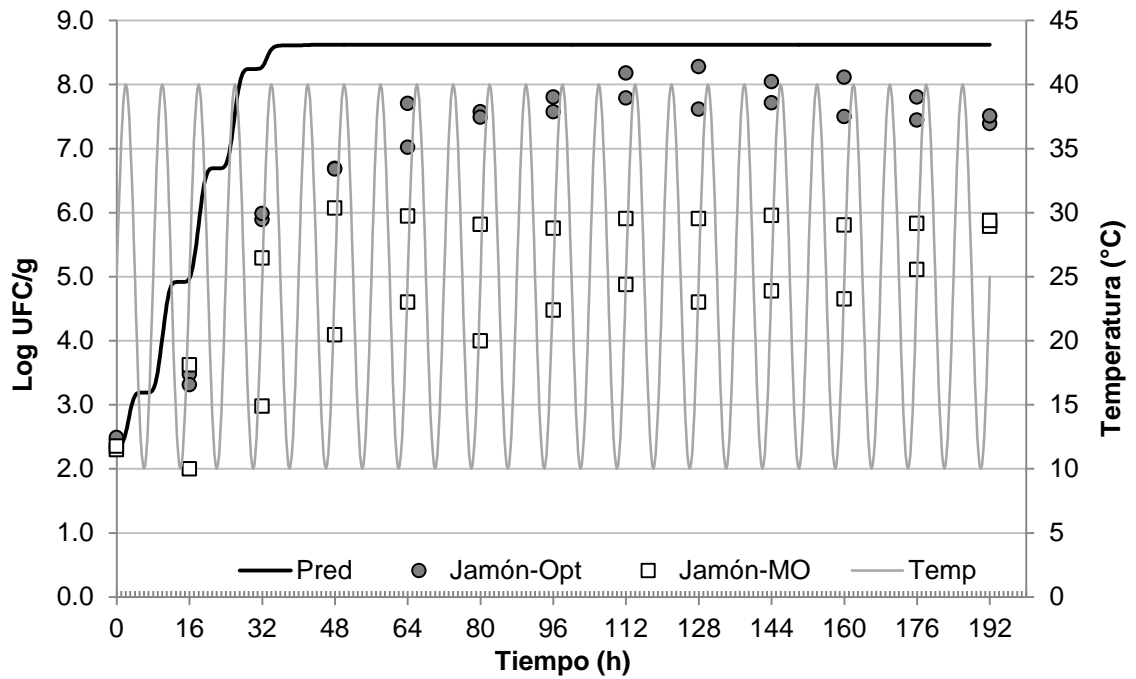


Figura 13. Validación del modelo dinámico de *S. aureus* en jamón con antimicrobianos previo a cocción bajo un perfil de temperatura sinusoidal (10-40°C, 8h/ciclo) por 196 h.

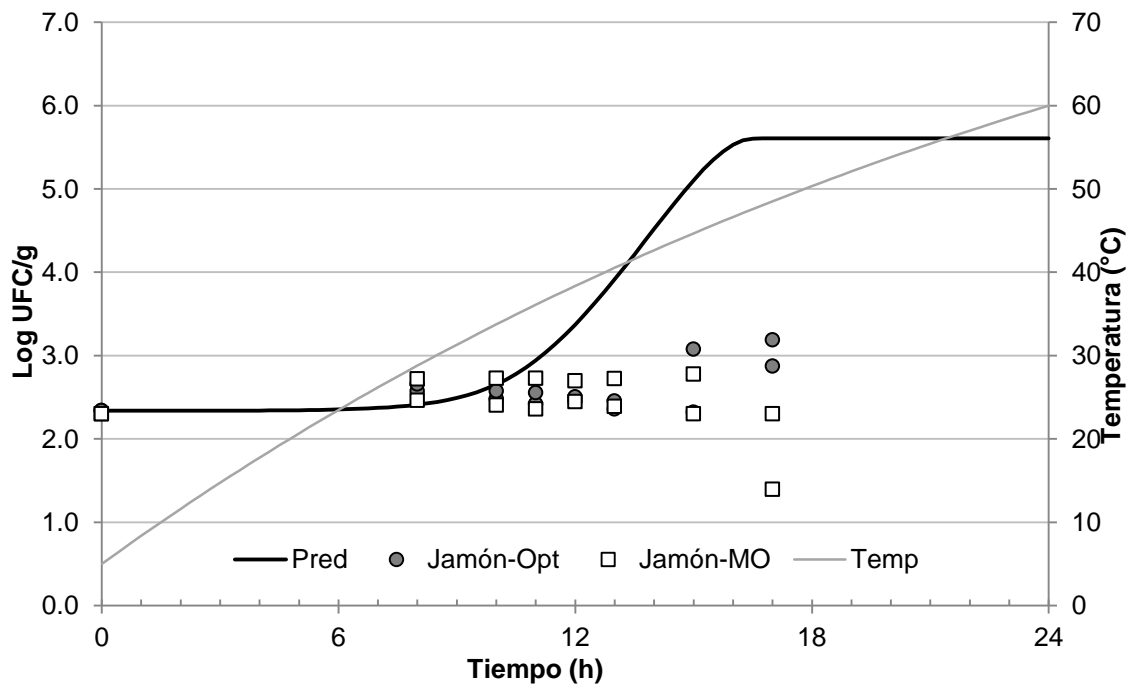


Figura 14. Validación del modelo dinámico de *S. aureus* en jamón previo a tratamiento térmico bajo un perfil de calentamiento exponencial (5-60°C) por 24 h.

6.1. EFECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS NATURALES

6.1.1. EFECTO SOBRE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS

Los antimicrobianos, además de limitar el crecimiento, pueden afectar las propiedades fisicoquímicas de los alimentos a los cuales son incorporados. Las características fisicoquímicas iniciales de importancia microbiológica de los tres tratamientos de RB y jamón previo a tratamiento se resumen en la Tabla 9.

En el caso del RB, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P>0.05$), en contraste a lo obtenido en jamón, en donde la incorporación de los antimicrobianos modificó significativamente ($P<0.05$) los parámetros fisicoquímicos iniciales. En este caso, se observó una reducción ($P<0.05$) del pH en el tratamiento jamón-MO, a diferencia del jamón control y al jamón-Opt y también se obtuvo una reducción significativa ($P<0.05$) de la A_w en el tratamiento jamón-Opt respecto al jamón-modelo.

La disminución del pH por efecto del MOstatin LV, se puede explicar debido a que este está conformado por jugo de limón y vinagre, cuyos principios activos son los ácidos cítrico y acético. Sin embargo, el hecho de que en su composición contenga ácidos, no implica que deba suceder una disminución del pH, tal como lo observado en pechuga de pavo mínimamente procesada (Valenzuela-Martínez *et al.* 2010) y en el RB elaborado en este trabajo. Esta diferencia probablemente se deba a que la carne de pavo y de res tienen una mayor capacidad de amortiguar el pH a diferencia de la carne de cerdo.

El efecto sobre la A_w del jamón por parte del PURASAL Optiform S 4, probablemente se deba a que este está conformado por las sales orgánicas lactato y diacetato de sodio y por ende, la A_w se reduce al incorporarlo. Esto igualmente fue observado por Stekelenburg (2003) en salchichas Frankfurt.

Tabla 9. Efecto de los antimicrobianos sobre los parámetros fisicoquímicos iniciales de ambos productos cárnicos previo a la cocción.*

Tratamiento	Roast Beef		Jamón	
	pH	Aw	pH	Aw
Modelo	5.53 ± 0.06 a	0.976 ± 0.002 a	5.84 ± 0.00 b	0.981 ± 0.001 b
PURASAL Optiform S 4	5.69 ± 0.03 a	0.966 ± 0.003 a	5.85 ± 0.01 b	0.973 ± 0.005 a
MOstatin LV	5.54 ± 0.06 a	0.970 ± 0.004 a	5.77 ± 0.00 a	0.978 ± 0.001 ab

* Diferente literal por columna significa diferencias a un $\alpha=0.05$

* promedio \pm error estándar

6.1.2. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *S. aureus*

En cuanto al efecto inhibitorio de los antimicrobianos, en el RB incubado bajo un perfil sinusoidal de fluctuación de temperatura (Figura 15) se observó un efecto bacteriostático en el tratamiento RB-MO ($P<0.05$), pero no en el RB-Opt ($P>0.05$). Sin embargo, en el producto incubado con un perfil de calentamiento exponencial si se observó un efecto bacteriostático ($P<0.05$) por parte de los dos antimicrobianos (Figura 16). En el caso del jamón de cerdo, se observó un efecto bacteriostático ($P<0.05$) sobre *S. aureus* por ambos antimicrobianos, tanto en el perfil sinusoidal (Figura 17), como en el perfil de calentamiento exponencial (Figura 18).

En la incubación de los productos cárnicos bajo un perfil sinusoidal de fluctuación de temperatura. El PURASAL Optiform S 4 en jamón de cerdo, a diferencia del RB (Figura 15), mostró un efecto bacteriostático significativo (Figura 17). Esta diferencia se puede deber a que en el jamón, la incorporación del antimicrobiano disminuyó significativamente la Aw (Tabla 9), la cual está por debajo de los valores óptimos de crecimiento de *S. aureus* y por consiguiente, esto ocasiona una disminución en la velocidad de crecimiento (Figura 17).

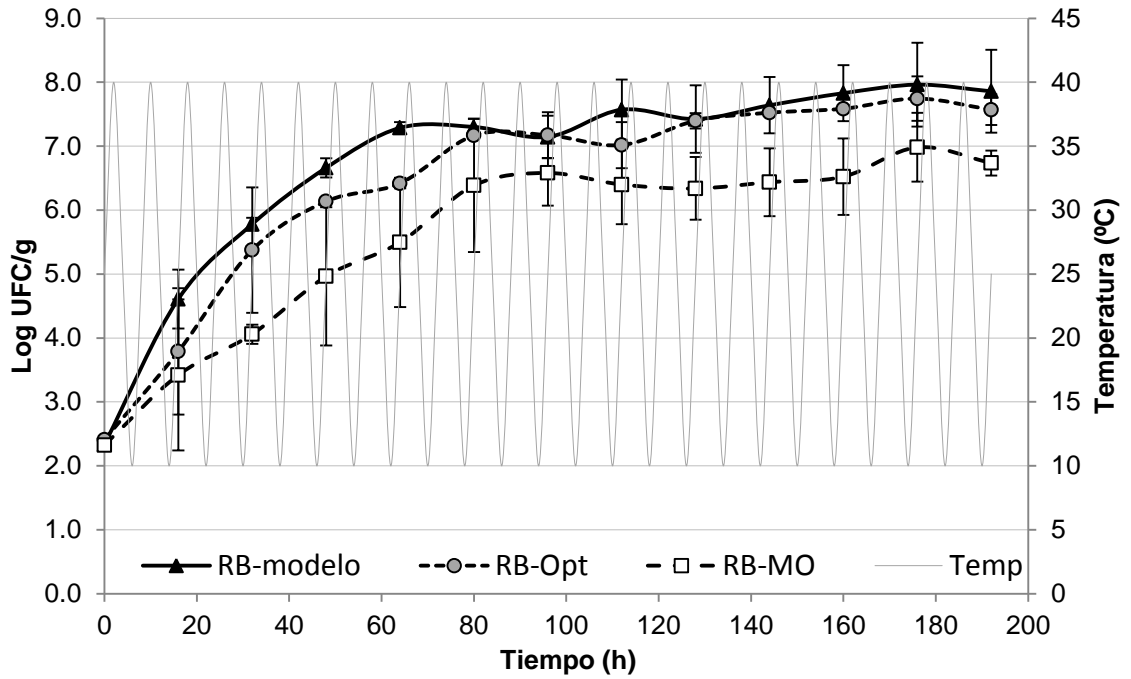


Figura 15. Efecto los antimicrobianos sobre el crecimiento de *S. aureus* en roast beef previo a la cocción bajo un perfil de temperatura sinusoidal (10-40°C, 8h/ciclo) por 196 h.

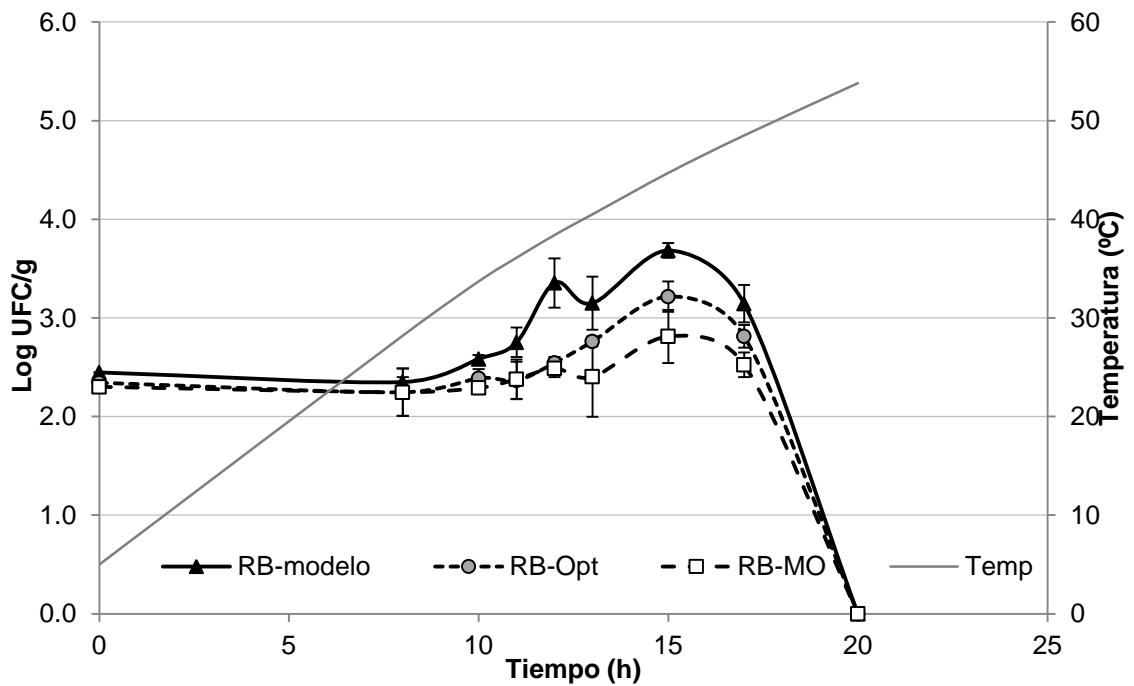


Figura 16. Efecto los antimicrobianos sobre el crecimiento de *S. aureus* en roast beef previo a la cocción bajo un perfil de calentamiento exponencial (5-60°C) por 24 h.

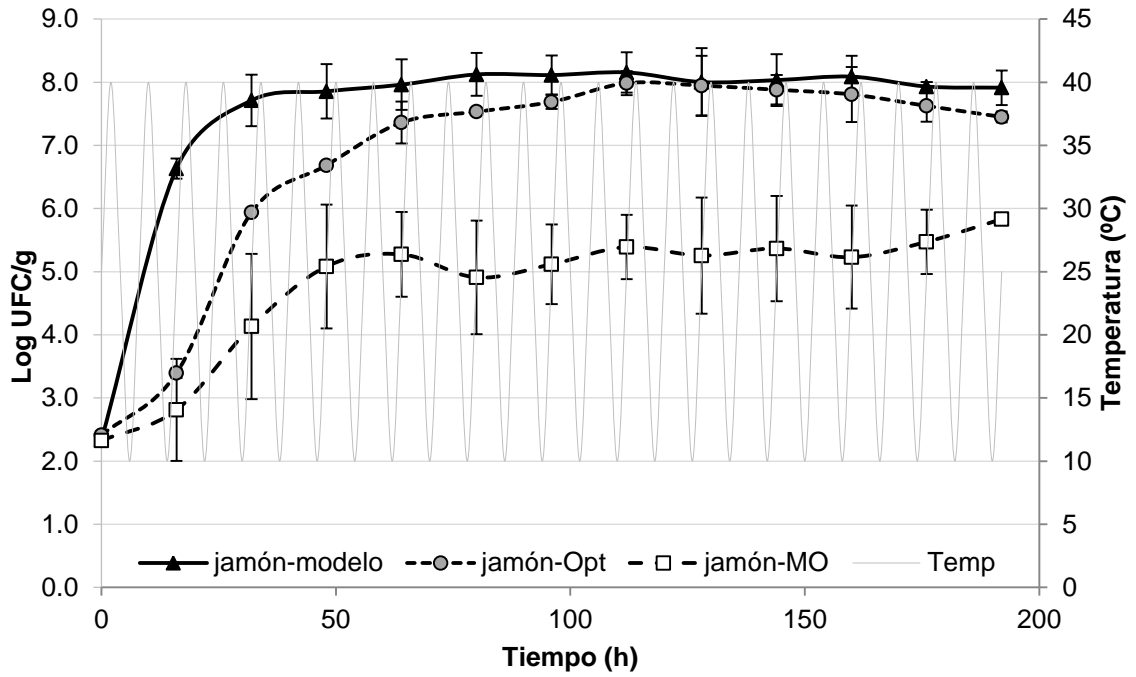


Figura 17. Efecto los antimicrobianos sobre el crecimiento de *S. aureus* en jamón previo a la cocción bajo un perfil de temperatura sinusoidal (10-40°C, 8h/ciclo) por 196 h.

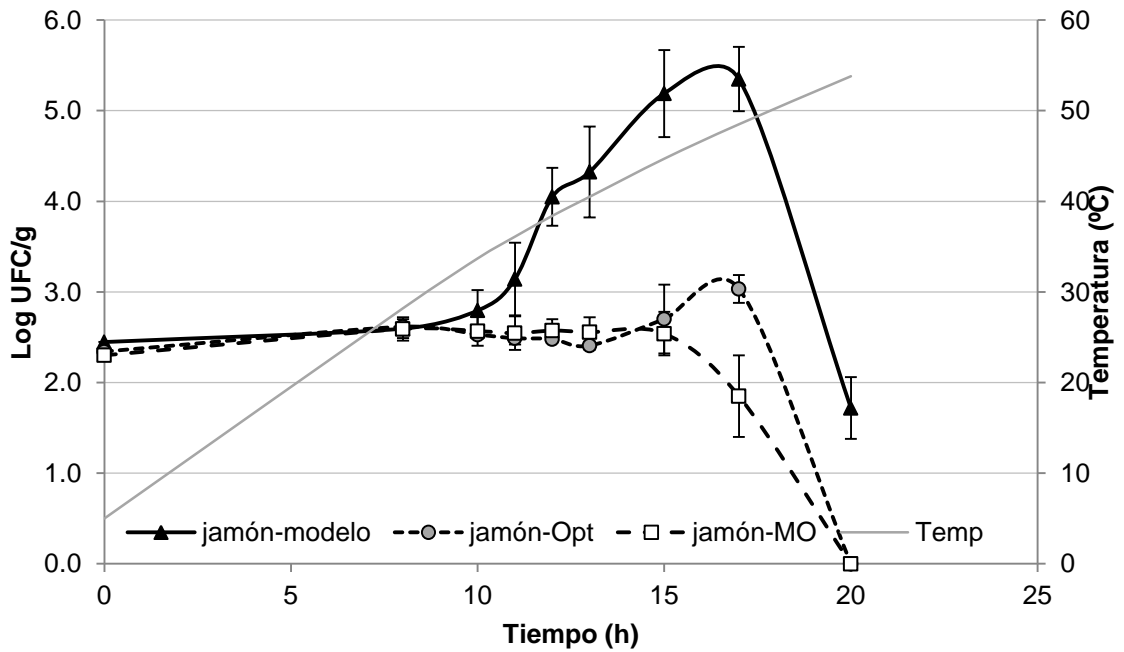


Figura 18. Efecto los antimicrobianos sobre el crecimiento de *S. aureus* en jamón previo a la cocción bajo un perfil de calentamiento exponencial (5-60°C) por 24 h.

Existen trabajos donde se demuestra que *S. aureus* no es sensible a los componentes activos del PURASAL Optiform S 4 (lactato de sodio y diacetato de sodio) (Miller y Acuff, 1994; Shelef y Addala, 1994). Esto podría explicar porque la inhibición de *S. aureus* incubado bajo un perfil sinusoidal no fue tan evidente, en comparación con el MOstatin LV. Sin embargo, un efecto sinérgico entre las sales fue reportado por Stekelenburg (2003) sobre *Lactobacillus sake* y *L. monocytogenes* en salchichas. Este mismo efecto fue observado por Mbandi y Shelef (2002) en bologna de res. Por lo que, el efecto antimicrobiano mostrado por el PURASAL Optiform S 4 sobre *S. aureus* probablemente se deba a un efecto sinérgico entre las sales, y no de manera individual, tal como lo que se ha demostrado para otros microorganismos en productos cárnicos.

Además, es importante mencionar que existe un reporte que mostró que el lactato de sodio, en su forma de ácido orgánico y a diferencia del ácido cítrico y el acético, inhibe la producción de enterotoxina (Domenech *et al.*, 1992). Especialmente la SEA, la cual es la enterotoxina mayormente implicada en los brotes de IEA. En base a esto, no se descarta totalmente la posibilidad de utilizar este antimicrobiano ya que el fin último de su aplicación es el de evitar la producción de enterotoxina. Aunque es necesario más investigación al respecto.

En el caso del MOstatin LV, su efecto antimicrobiano se debe, tanto a su habilidad por disminuir el pH de los productos, como a las moléculas no disociadas y sin carga de los ácidos orgánicos que lo componen. Estas últimas, tienen la habilidad de atravesar la membrana celular, y ya dentro (pH es cercano a la neutralidad) disociarse y liberar los aniones y protones (Brul y Coote, 1999). La célula reacciona y utiliza la energía para remover los protones y así mantener un pH constante, y en consecuencia se reduce la velocidad de crecimiento (Shelef, 1994). Sin embargo, es muy posible que el efecto antimicrobiano MOstatin LV, se atribuya más al ácido acético, ya que se ha

reportado que el ácido cítrico ejerce un efecto mínimo sobre el crecimiento de *S. aureus* (Domenech *et al.*, 1992). Este antimicrobiano también ha mostrado tener actividad bacteriostática, sobre *C. perfringens*, al inhibir la germinación de esporas y desarrollo en pechuga de pavo mínimamente procesada (Valenzuela-Martínez *et al.*, 2010).

El efecto bacteriostático del MOstatin LV sobre el crecimiento de *S. aureus* incubado bajo el perfil sinusoidal, fue más evidente en relación con lo mostrado por PURASAL Optiform S 4. En este perfil, el MOstatin LV inhibió tanto la carga máxima alcanzada, así como la velocidad de crecimiento. En el caso del jamón, este efecto es más notorio, ya que en el tratamiento jamón-MO, la carga máxima se mantuvo entre 4.5-6 Log UFC/g, a diferencia del tratamiento jamón-Opt que si alcanzó los 8 Log UFC/g, igual que el control. En RB-MO, la carga máxima estuvo entre 6-7 Log UFC/g y en el RB-Opt y RB-modelo osciló entre 7-8 Log. En cuanto a la velocidad de crecimiento, en el caso del roast beef, en el tratamiento RB-MO, se llegó a los 5 Log UFC/g después de 6 ciclos de exposición (\approx 48 h) a diferencia del RB-Opt y el RB-modelo que llegaron a los 5 Log a los 4 (\approx 28 h) y 3 (\approx 20h) ciclos de exposición, respectivamente. En el caso del jamón de cerdo, en el jamón-MO, *S. aureus* llegó a la concentración a la cual se inicia la producción de enterotoxina después de 6 ciclos (\approx 46 h) a diferencia del jamón-Opt y el jamón-modelo que llegaron a los 3 (\approx 26 h) y 1 (\approx 8h) ciclos de exposición, respectivamente. Por lo que, definitivamente el MOstatin LV retarda en mayor grado el crecimiento de *S. aureus*.

7. CONCLUSIÓN

S. aureus tiene la habilidad de crecer tanto en roast beef, como en jamón de cerdo previo al proceso de cocción en el rango biocinético de 20-45°C. En base a la temperatura de crecimiento mínima observada, 20°C, el riesgo de crecimiento de *S. aureus* en los productos cárnicos es mínimo cuando existen fluctuaciones de temperatura dentro del área de proceso de estos productos cárnicos por debajo de estas temperaturas, o exposiciones cortas a temperaturas cercanas a 20°C.

Además de la temperatura, la microflora nativa inicial presente en la carne y la presencia de antimicrobianos naturales en el producto, limita el crecimiento de *S. aureus* en ambos productos. Estos últimos, y por lo desarrollado en este trabajo, además de inhibir el desarrollo de patógenos posterior al proceso de cocción, estos mostraron la habilidad de retrasar el crecimiento de microorganismos patógenos antes de él. Este efecto inhibitorio más evidente en el caso del MOstatin LV.

El crecimiento de *S. aureus* en condiciones isotérmicas en roast beef y en jamón de cerdo, previo al proceso de cocción, se ajusta de forma correcta al modelo primario de Baranyi. Similarmente, la velocidad máxima de crecimiento, μ_{max} , y la carga máxima alcanzada, y_{max} , tuvieron un buen ajuste al modelo secundario de Ratkowsky. Por otro lado, el modelo dinámico desarrollado a partir de la forma diferencial del modelo de Baranyi y el modelo de la μ_{max} de Ratkowsky, durante los estudios de validación (perfil sinusoidal y exponencial) mostró falta de exactitud para predecir el crecimiento de *S. aureus* bajo condiciones fluctuantes de temperatura. Este sobreestima el crecimiento de *S. aureus* en roast beef, lo que da lugar a un modelo falso-seguro y lo subestima en el jamón de cerdo, del que resultan predicciones falso-peligrosas. Esta falta de exactitud por ambos modelos sugieren que, para el modelaje de *S. aureus*,

es necesario implicar, además del supuesto de que los microorganismos reaccionan de manera inmediata a cambios de temperatura, también el efecto de la microflora nativa, el cual ha demostrado tener un efecto importante sobre su crecimiento.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Amézquita, A., Weller, C.L., Wang, L., Thippareddi, H., Burson, D.E. 2005. Development of an Integrated Model for Heat Transfer and Dynamic Growth of *Clostridium perfringens* During the Cooling of Cooked Boneless Ham. *International Journal of Food Microbiology*. 101:123-144.
- Atanassova, V., Meindl, A. y Ring, C. 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins in Raw Pork and Uncooked Smoked Ham: A Comparison of Classical Culturing Detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 68:105-113.
- Bania, J., Dabrowska, A., Bystron, J., Korzekwa, K., Chrzanowska, J. y Molenda, J. 2006. Distribution of Newly Described Enterotoxin-like Genes in *Staphylococcus aureus* from Food. *International Journal of Food Microbiology*. 108:36-41.
- Baranyi, J. y Roberts, T. A. 1994. A Dynamic Approach to Predicting Bacterial Growth in Food. *International Journal of Food Microbiology*. 23:277-294.
- Baranyi, J., Robinson, T.P., Kaloti, A., Mackey, B.M., 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 27, 61–75.
- Barmpalia, I.M., Koutsoumanis, K.P., Geornaras, I., Belk, K.E., Kendall, P.A., Smith, G.C., Sofos, J.N. 2005. Effect of Antimicrobials as Ingredients of Pork bologna for *Listeria monocytogenes* Control During Storage at 4 or 10°C. *Food Microbiology*, 22:205-211.
- Beverly, R.L., Janes, M.E., Prinyawiwatkula, W., No, H.K. 2008. Edible Chitosan Films on Reddy-to-Eat Roast Beef for Control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. 25:534-537.
- Bernaerts, K., Dens, E., Vereecken, K., Geeraerd, A., Devlieghere, F., Debevere, J., Van Impe, J. F. 2004. Modeling Microbial Dynamics under Time-Varying Conditions. En McKellar, R., Lu, X. (Eds.) *Modelling Microbial Responses in Foods*. CRC Press, Boca Raton, E.U.A.
- Bhaduri, S. y Phillips, J.G. 2011. Growth Model of a Plasmid-Bearing Virulent strain of *Yersinia pseudotuberculosis* in Raw Ground Beef. *Zoonoses and Public Health*. 58:77-84.
- Blockerhurst, T. 2004. Challenge of food and the environmental. En McKellar, R., Lu, X. (Eds.) *Modelling Microbial Responses in Foods*. CRC Press, Boca Raton, E.U.A.

- Borch, E., Kant-Muermans, M.-L., Blixt, Y. 1996. Bacterial Spoilage of Meat and Cured Meat Products. *International Journal of Food Microbiology*. 33:103-120.
- Brul, S., Coote P. 1999. Preservative agents in foods- mode action and antimicrobial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. 50: 1-17.
- Buchanan, R. L., Smith, J. L., McColgan, C., Marmer, B. S., Golden, M. y Dell, B. 1993. Response Surface Models for the Effects of Temperature, pH, Sodium Chloride, and Sodium Nitrite of the Aerobic and Anaerobic Growth of *Staphylococcus aureus* 196E. *Journal of Food Safety*. 13:159-175.
- Castellani, A.G., Niven, C.F. 1954. Factors Affecting the Bacteriostatic Action of Sodium Nitrite. *American Meat Institute Foundation*. 105, 154-159.
- Castillejo-Rodríguez, AM., García-Gimeno, R.,M., Zurera-Cosano, G., Barco-Alcalá, E., Rodríguez-Pérez, M.R. 2002, Assessment of Mathematical Models for Predicting *Staphylococcus aureus* Growth in Cooked Meat Products. *Journal of Protection*. 65:659-665.
- Cayré, M. E., Vignolo, G., Garro, O. 2003. Modeling Lactic Acid Bacteria Growth in Vacuum-Packaged Cooked Meat Emulsions Stored at Three Temperatures. *Food microbiology*. 20:561-566.
- CDC. 2011. OutbreakNet, Foodborne Outbreak Online Database. (March 29th 2011). <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>
- Coll-Cárdenas, F., Giannuzzi, L. y Zaritzky, N. E. 2008. Mathematical Modeling of Microbial Growth in Ground Beef from Argentina: Effect of Lactic Acid Addition, Temperature and Packaging Film. *Meat Science*. 79:509-520.
- Cornu, M., Billoir, E., Bergis, H., Beaufort, A., Zulliani, V. 2010. Modelling Microbial Competition in Food: Application to the Behavior of *Listeria monocytogenes* and Lactic Acid Flora in Pork Meat Products. *Food Microbiology*. Article In Press.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A. H., Versyck, K. J., Vandewaetere, B., Van Impe, J. y Debevere, J. 2001. Growth of *Listeria monocytogenes* in Modified Atmosphere Packed Cooked Meat Products: a Predictive Model. *Food Microbiology*. 18:53-56.
- Dengremont, E., Membre, J.M. 1995. Statistical Approach for Comparison of Growth Rates of Five Strains of *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:4389-4395.

- Domenech, A., Hernández, F.J., Orden, J.A., Goyache, J., López, B., Suarez, G., Gómez-Lucia, E. 1992. Effect of Six Organic Acids on Staphylococcal Growth and Enterotoxin Production. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*. 194:124-128.
- Domínguez, S.A. y Schaffner, D.A. 2007. Development and Validation of a Mathematical Model to Describe the Growth of *Pseudomonas* spp. in Raw Poultry Stored Under Aerobic Conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 120:287-295.
- Eifert, J. D., Gennings, C., Carter, W.H., Duncan, S.E., Hackney, C. R. 1996. Predictive Model with Improved Statistical Analysis of Interactive Factors Affecting the Growth of *Staphylococcus aureus* 196E. *Journal of Food Protection*. 59, 608-614.
- Fernández-López, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Pérez-Álvarez, J.A., Kuri, V. 2005. Antioxidant and Antibacterial Activities of Natural Extracts: Application in Beef Meatballs. *Meat Science*. 69, 371-380.
- Fernández-Escartín, E. 2008. *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. 2da edición. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Ferrer, J., Prats, C., López, D. y Vives-Rego, J. 2009. Mathematical Modeling Methodologies in Predictive Food Microbiology: a SWOT Analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 134:2-8.
- Fueyo, J. M., Mendoza, M. C. y Martín, M. C. 2005. Enterotoxins and Toxic Shock Syndrome Toxin in *Staphylococcus aureus* Recovered from Human Nasal Carriers and Manually Handled Foods: Epidemiological and Genetic Findings. *Microbes and Infection*. 7:187-194.
- Fujikawa, H. y Morozumi, S. 2006. Modeling *Staphylococcus aureus* Growth and Enterotoxin Production in Milk. *Food Microbiology*. 23:260-267.
- Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S.A. 2007. Effect of the Rosemary Extract, Chitosan and α -tocopherol on Microbial Parameters and Lipid Oxidation of Fresh Pork Sausages Stored at 4°C. *Meat Science*. 76, 172-181.
- Gibson, A. M., Bratchell, N. y Roberts, T. A. 1987. The Effect of Sodium Chloride and Temperature on the Rate of Growth of *Clostridium botulinum* Type A in Pasteurized Pork Slurry. *Journal of Applied Bacteriology*. 62:479-490.
- Gill, C.O., Newton, K.G. 1980. Growth of Bacteria on Meat at Room Temperature. *Journal of Applied Bacteriology*. 49,315-323.

- Grau, F. H., Vanderline, P.B. 1993. Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on Beef Lean and Fatty Tissue: Equations of Describing the Effect of Temperature and pH. *Journal of Food Protection*. 56:96-101.
- Gumuvadelli, V., Subbiah, J., Thippareddi, H., Velugoti, P. R. y Froning, G. 2007. Dynamic Predictive Model for Growth of *Salmonella* Enteritidis in Egg Yolk. *Journal of Food Science*. 72:M254-M263.
- Gustafson, J. y Wilkinson, B. 2005. *Staphylococcus aureus* as a Food Pathogen: the Staphylococcal Enterotoxins and Stress Response Systems. En Griffiths, M. (Ed.) *Understanding Pathogens Behavior, Virulence, Stress Response and Resistance*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition No. 111
- Hajmeer, M., Ceylan, E., Mardsen, J.L., Fung, D.Y.C. 2006. Impact of Sodium chloride on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* Analysed Using Transmission Electron Microscopy. *Food Microbiology*. 23, 446-452.
- Huang, L. 2003. Dynamic Computer Simulation of *Clostridium perfringens* Growth in Cooked Ground Beef. *International Journal of Food Microbiology*. 87:217-227.
- Huang, L. 2008. Growth Kinetic of *Listeria monocytogenes* in Broth and Beef Frankfurters-Determination of Lag Phase Duration and Exponential Growth Rate under Isothermal Conditions. *Journal of Food Science*. 73:E235-E242.
- Huang, L. 2010. Growth Kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 in Mechanically-Tenderized Beef. *International Journal of Food Microbiology*. 140:40-48.
- Hwang, C.-A. y Tamplin, M.L. 2007. Modeling the Lag Phase and Growth Rate of *Listeria monocytogenes* in Ground Ham Containing Sodium Lactate and Sodium Diacetate at Various Storage Temperatures. *Journal of Food Science*. 72:M246-M253.
- ICMSF, 1996. *Microorganisms in Food 5: Characteristics of Microbial Pathogens*. Blackie Academic & Professional, London.
- ICMSF, 2000. *Microorganisms in Food 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, E.U.A.
- Ingham, S.C., Fanslau, M.A. Burnham, G. M., Ingham, B. H., Norback, J. P., Schaffner, D. W. 2007. Predicting Pathogen Growth during Short-Term Temperature Abuse of Raw Pork, Beef, and Poultry Products: Use of an

- Isothermal-Based Predictive Tool. *Journal of Food Protection*. 70:1445-1456.
- Jei, C.M.C., L.A. Shelef. 1986. Factors Affecting Sensitivity of *Staphylococcus aureus* 196E to Polyphosphates. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 842-846.
- Jeyamkondan, S., Jayas, D.S., y Holley, R.A. 2001. Microbial Growth Modeling with Artificial Neural Networks. *International Journal of Food Microbiology*. 64:343-354.
- Juneja, V. K., Marks, H. M. 2002. Predictive Model for Growth of *Clostridium perfringens* During Cooling of Cooked Cured Chicken. *Food Microbiology*. 19:313-327.
- Juneja, V.K. y Thippareddi, H. 2004. Inhibitory Effects of Organic Acid Salts on Growth of *Clostridium perfringens* from Spore Inocula During Chilling of Marinated Ground Turkey Breast. *International Journal of Food Microbiology*. 93: 155-163.
- Juneja, V. K., Huang, L. y Thippareddi, H. 2006. Predictive Model for Growth of *Clostridium perfringens* in Cooked Cured Pork. *International Journal of Food Microbiology*. 110:85-92.
- Juneja, V., Valenzuela-Melendres, M., Huang, L., Gumudavelli, V., Subbiah, J. y Thippareddi H. 2007. Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. *Food Microbiology*. 24:328-335.
- Juneja, V.K., Marks, H., Thippareddi, H. 2008. Predictive Model of Growth of *Clostridium perfringens* During Cooling of Cooked Uncured Beef. *Food Microbiology*. 25:42-55.
- Juneja, V. K., Valenzuela-Melendres, M., Huang, L., Subbiah, J. y Thippareddi, H. 2009. Mathematical modeling of growth of *Salmonella* in raw ground beef under isothermal conditions from 10 to 45°C. *International Journal of Food Microbiology*. 131:106-111.
- Juneja, V.K., Marks, H., Thippareddi, H. 2010. Predictive Model for Growth of *Clostridium perfringens* During Cooling of Cooked Ground Pork. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11:146-154.
- Kanatt, S.R., Chander, R., Sharma, A. 2008. Chitosan and Mint Mixture: A New Preservative for Meat and Meat Products. *Food Chemistry*. 107, 845-852.

- Kérouanton, A., Hennekinne, J. A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A. y De Buyser, M. L. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Food Poisoning Outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*. 115:369-375.
- Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P., Nychas, G.-J. E. 2006. Development of a Microbial Model for Combined Effect of Temperature and pH on Spoilage of Ground Meat, and Validation of the Model Under Dynamic Temperature Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:124-134.
- Lebert, I., Robles-Olvera, V. y Lebert, A. 2000. Application of Polynomial Models to Predict Growth of Mixed Cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in Meat. *International Journal of Food Microbiology*. 61:27-39.
- Lee, R.M., Hartman, P.A., Olson, D.G., Williams, F.D. 1994. Bactericidal and Bacteriolytic Effects of Selected Food-Grade Phosphates, Using *Staphylococcus aureus* as a Model System. *Journal of Food Protection*. 57,276-283.
- Le Marc, Y., Val k, L., Medved'ov, A. 2009. Modelling the Effect of the Starter Culture on the Growth of *Staphylococcus aureus* in Milk. *International Journal of Food Microbiology*. 129:306-311.
- Lianou, A., Geornaras, I., Kendall, P.A., Scanga, J.A., Sofos, J.N. 2007. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7°C in Commercial Turkey Breast, with or without Antimicrobials, After Simulated Contamination for Manufacturing, Retail and Consumer Settings. *Food Microbiology*. 24,433-433.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Vaidanis, A., Metaxopoulos, I. 2006. Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. *Journal of Food Science* 71:M157-M167.
- Mbandi. E., Shelef, L.A. 2002. Enhanced Antimicrobial Effects of Combination of Lactate and Diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Beef Bologna. *International Journal of Food Microbiology*. 76: 191-198.
- McCann, T.L., Eifert, J.D., Gennings, C., Schilling, M.W., Carter Jr., W.H. 2003. A Predictive Model with Repeated Measures Analysis of *Staphylococcus aureus* Growth Data. *Food Microbiology*. 20,139-147.
- McCoy, D.W., Faber, J.E. 1966. Influence of Food Microorganisms on Staphylococcal Growth and Enterotoxin Production in Meat. *Applied Microbiology*. 14,372-377.

- McDonald, K. y Sun D.-W. 1999. Predictive Food Microbiology for the Meat Industry: A Review. *International Journal of Food Microbiology*. 52: 1-27
- McMeekin, T. A., Olley, J. N., Ross, T. and Ratkowsky, D. A. 1993. *Predictive Microbiology: Theory and Application*. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- McMeekin, T. A., Olley, J., Ratkowsky, D. A. y Ross, T. 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*. 73:395-407.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S. y Shapiro, C. 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*. 5:607-625.
- Miguel-García, D.Y., Juneja, V.K., Valenzuela-Melendres, M., Díaz-Cinco, M.E. , Thipareddi, H., Peña-Ramos, E.A. 2009. *Clostridium perfringens* Growth from Spore Inocula in Sous-Vide Processed Pork-Based Mexican Entrée. *Journal of Food Science*. 74:M172-M176.
- Miller, R.K., G.R. Acuff (1994). Sodium Lactate Affects Pathogens in Cooked Beef. *Journal of Food Science* 59:15-19.
- Nema, V., Agrawal, R., Kamboj, D. V., Goel, A.K. y Singh, L. 2007. Isolation and Characterization of Heat Resistant Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* From a Food Poisoning Outbreak in Indian Subcontinent. *International Journal of Food Microbiology*. 117:29-35
- Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisetti, E. y Celano., G.V. 2007. Occurrence, Characterization and Antimicrobial Resistance of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* Isolated from Meat and Dairy Products. *International Journal of Food Microbiology*. 115:290-296.
- Oscar, T.P. 2002. Development and Validation of a Tertiary Simulation Model for Predicting the Potential Growth of *Salmonella typhimurium* on Cooked Chicken. *International Journal of Food Microbiology*. 76: 177-190
- Oscar, T.P. 2006. Validation of a Tertiary Model for Predicting Variation of *Salmonella typhimurium* DT104 (ATCC 700408) Growth from a Low Initial Density on Ground Chicken Breast Meat with a Competitive Microflora. *Journal of Food Protection*. 69:2048-2057
- Oscar, T.P. 2007. Predictive Models for Growth of *Salmonella typhimurium* DT104 from Low and High Initial Density on Ground Chicken with a Natural Microflora. *Food Microbiology*. 24:640-651.

- Oscar, T.P. 2008. Development and Validation of a Stochastic Model for Predicting the Growth of *Salmonella typhimurium* DT104 from a Low Initial Density on Chicken Frankfurters with Native Microflora. 71:1135-1144.
- Oscar, T.P. 2009. Predictive Model for Survival and Growth of *Salmonella typhimurium* DT104 on Chicken Skin During Temperature Abuse. Journal of Food Protection. 72: 304-314.
- Parrilla-Cerrillo, M. A., Vázquez-Castellanos, J. L. Saldate-Castañeda, E. O. y Nava-Fernández, L. M. 1993. Brotes de Toxicoinfecciones Alimentarias de Origen Microbiano y Parasitario. Salud Pública de México. 35: 456- 463.
- Pepe, O., Blaiotta, G., Bucci, F., Anastasio, M., Aponte, M., Villani, F. 2006. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxin A in Breaded Chicken Products: Detection and Behavior during the Cooking Process 72: 7057-7062.
- Pérez-Chabela, M. L., Guerrero-Legarreta, I. y Ponce-Alquicira, E. 2008. Detección de Microorganismos Patógenos e Indicadores en Carne de Bovino que se Expende en Supermercados de la Ciudad de México. Nacameh. 2:188-194.
- Peirson, M.D., Guan, T.Y., Holley, R.A. 2003. Thermal Resistances and Lactate and Diacetate Sensitivities of Bacteria Causing Bologna Discolouration. International Journal of Food Microbiology. 86,223-230.
- Pocsfalvi, G., Cacace. G., Cuccurullo, M., Serluca, G., Sorrentino, A., Schlosser, G., Blaiotta, G. y Marloni, A. 2008. Proteomic Analysis of Exoproteins Expressed by Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* Strains. Proteomics. 8:2462-2476.
- Ratkowsky, D. A., Lowry, R. K., McMeekin, T. A., Stokes, A. N. y Chandler , R. E. 1983. Model for Bacterial Culture Growth Rate Throughout the Entire Biokinetic Temperature Range. Journal of Bacteriology. 154:1222-1226.
- Ross, T. 1996. Indices for Performance Evaluation of Predictive Models in Food Microbiology. Journal of Applied Microbiology. 81:501-508.
- Ross. T y Dalgaard, P. 2004. Secondary Models. En McKellar, R., Lu, X. (Eds.) Modelling Microbial Responses in Foods. CRC Press, Boca Raton, E.U.A.
- Ross, T., Olley, J., McMeekin, T.A. y Ratkowsky, D.A. 2011. Some Comments on Huang, L. (2010). Growth Kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 in Mechanically-Tenderized Beef. International Journal of Food Microbiology, 140:40-48. International Journal of Food Microbiology, 147:78-80.

- Sallam, Kh.I., Ishioroshi, M., Samejima, K. 2004. Antioxidant and Antimicrobial Effects of Garlic in Chicken Sausage. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 37:849-855.
- Samelis, J. Kakouri, A., Georgiadou, K.G. Metaxopoulos, J. 1998. Evaluation of the Extent and Type of Bacterial Contamination at Different Stages of Processing of Cooked Ham. *Journal of Applied Microbiology.* 84:649-660.
- Sánchez, B., Cabo, M. L., Margolles, A., Herrera, J.J.H. 2010. A Proteomic Approach to Cold Acclimation of *Staphylococcus aureus* CECT 976 Grown at Room and Human Body Temperatures. *International Journal of Food Microbiology.* 144:160-168.
- Sánchez-Plata, M. X., Amézquita, A., Blankenship, E., Burson, D. E., Juneja, V., Thippareddi, H. 2005. Predictive Model for *Clostridium perfringens* Growth in Roast Beef During Cooling and Inhibition of Spore Germination and Outgrowth by Organic Acid Salts. *Journal of Food Protection.* 68:2594-2605.
- Scanga, J.A., Grona, A.D., Belk, K.E., Sofos, J.N., Bellinger, G.R., Smith, G.C. 2000. Microbiological Contamination of Raw Beef Trimmings and Ground Beef. *Meat Science.* 56:145-152.
- Schmitt, M., Schuler-Schmid, U., Schimidt-Lorenz, W. 1990. Temperature Limits of Growth, TNase and Enterotoxin Production of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Foods. *International Journal of Food Microbiology.* 11:1-20.
- Secretaria de Salud. 1993. NOM-034-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Productos de la Carne. Carne Molida y Carne Molida Moldeada. Envasadas. Especificaciones Sanitarias. México D.F.
- Shale, K., Lues, J.F.R., Venter, P., Buys, E.M. 2005. The Distribution of *Staphylococcus* spp. on Bovine Meat from Abattoir Deboning Rooms. *Food Microbiology.* 22:433-438.
- Shelef, L. A., Addala, L. 1994. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and Other Bacteria by Sodium Diacetate. *Journal of Food Safety.* 14: 103-115.
- Shelef, L.A. 1994. Antimicrobial Effects of Lactates: A review. *Journal of Food Protection.* 57:445-450.
- Shimonu, E. y Labuza, T. 2000. Modelling Pathogen Growth in Meat Products: Future Challenges. *Trends in Food Science and Technology.* 11:394-402.

- Scharff, R. L. 2010. Health-Related Cost from Foodborne Illness in the United States. The Produce Safety Project at Georgetown University. (25 de abril de 2010).
<http://www.producesafetyproject.org/admin/assets/files/Health-Related-Foodborne-Illness-Costs-Report.pdf-1.pdf>
- Smith-Simpson, S., Schaffner, D.W. 2005. Development of a Model to Predict Growth of *Clostridium perfringens* in Cooked Beef During Cooling. *Journal of Food Protection*. 68:336-341.
- Soriano, J. M., Font, G., Moltó, C. y Mañes, J. 2002. Enterotoxigenic Staphylococci and their Toxins in Restaurant Foods. *Trends in Food Science & Technology*. 13:60-67.
- Stekelenburg, F.K. 2003. Enhanced Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Frankfurter Sausage by Addition of Potassium Lactate and Sodium Diacetate Mixtures. *Food Microbiology* 20: 133-137.
- Stewart, C.M., Cole, M.B., Legan, J.M., Slade, L., Vandeven, M.H., Schaffner, D.W. 2002. *Staphylococcus aureus* Growth Boundaries: Moving Towards Mechanistic Predictive Models Based on Solute-Specific effects. *Applied and Environmental Microbiology*. 68,1864-1871.
- Sutherland, J.P. Bayliss, A.J. Roberts, T.A. 1994. Predictive Modelling of Growth of *Staphylococcus aureus*: the Effects of Temperature, pH and Sodium Chloride. *International Journal of Food Microbiology*. 21,217-236.
- Tamplin, M.L., Paoli, G., Marmer, B., y Phillips, J. 2005. Models of the Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in Raw Sterile Ground Beef Stored at 5 to 46°C. *International Journal of Food Microbiology*. 100:335-344.
- Thippareddi, H., Juneja, V.K., Phebus, R.K., Marsden, J.L., Kastner, C.L. 2003. Control of *Clostridium perfringens* Germination and Outgrowth by Buffered Sodium Citrate During Chilling of Roast Beef and Injected Pork. *Journal of Food Protection*. 66:376-381.
- Tirado, J., Paredes, D., Velázquez, G. y Torres, J.A. 2005. Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5:66-76.
- Torrescano, G., Sánchez-Escalante, A., Giménez, B., Roncalés, P., Beltran, J.A. 2003. Shear Values of Raw Samples of 14 Bovine Muscles and their Relation to Muscle Collagen Characteristics. *Meat Science*. 64:85-91.
- Valenzuela-Martínez, C., Peña-Ramos, A., Juneja, V.K., Korasapati, N.R., Burson, D.E., Thippareddi, H. 2010. Inhibition of *Clostridium perfringens*

Spore Germination and Outgrowth by Buffered Vinegar and Lemon Juice Concentrate During Chilling of Ground Turkey Roast Containing Minimal Ingredients. *Journal of Food Protection*. 73,470-476.

Velugoti, P.R., Bohra, L.K., Juneja, V.K., Huang, L., Wesseling, A. L., Subbiah, J., Thippareddi, H. 2010. Dynamic model for predicting growth of *Salmonella* spp. In ground sterile pork. *Food Microbiology*. Article In press.

Walls, I., Scott, V. y Bernard, D. T. 1996. Validation of Predictive Mathematical Models Describing Growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*. 59:11-15.

Wei, Q. K., Fang, T.J., Chen, W.C. 2001. Development and Validation of Growth Model of *Yersinia enterocolitica* in Cooked Chicken Meats Packaged Under Various Atmosphere Packaging and Stored at Different Temperatures. 64:987-993.

Weiss, J., Gibis, M.V., Schuh, V., Salminen, H. 2010. Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science* 86: 196-213.

Whiting, R. C. y Buchanan R. L. 1993. A Classification of Models for Predictive Microbiology. *Food Microbiology*. 10:175-177.

Zurera-Cosano, G., Castillejo- Rodríguez, AM., García-Gimeno, R.,M., Rincón-León, F. 2004. Performance of Response Surface and Davey Model for Prediction of *Staphylococcus aureus*: Growth Parameters under Different Experimental Conditions. *Journal of Food Protection*. 67,1138-1145.

Zwietering, M.H., De Koos, J.T., Hasenack, B.E., De Wit, J.C., Van't Riet, K., 1991. Modeling of Bacterial Growth as a Function of Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:1094–1101.