

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

**"EFECTO DE IRRADIACIÓN GAMMA Y CITRUCIDAL®
SOBRE Clostridium perfringens EN UN PRODUCTO
CARNICO SOUS VIDE"**

POR:

DENISE YAMINA MIGUEL GARCIA

**TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE
ORIGEN ANIMAL**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

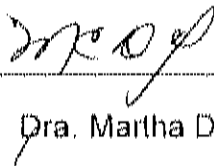
JULIO DE 2007

APROBACIÓN

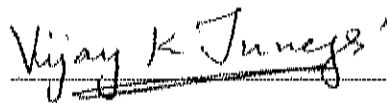
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Química Farmacobióloga Denise Yamina Miguel García, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



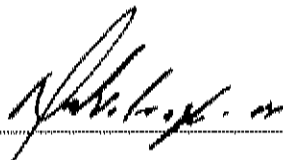
Dra. Etna Aida Peña Ramos



Dra. Martha Diaz Cinco



Dr. Vijay K. Juneja



M.C. Martin Valenzuela Melendres



M.C. Alfonso Garcia Galaz

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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



Dr. Alfonso A. Gardea Béjar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., por la formación científica y técnica a través de las clases recibidas.

A CONACYT, por la beca otorgada para la realización de mis estudios y obtención del grado de Maestro en Ciencias.

Al fondo SAGARPA-CONACYT proyecto 2003-197 "Empleo de un extracto cítrico para el control de patógenos en productos cárnicos típicos mexicanos procesados sous vide o en atmósferas modificadas", por el apoyo otorgado para la realización de esta investigación.

A mi Directora de Tesis, Dra. Etna Aida Peña Ramos, por su confianza y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Comité de tesis, Dra. Martha Díaz Cinco, M.C. Martín Valenzuela Melendres, M.C. Alfonso García Galaz y Dr. Vijay K. Juneja; por las observaciones hechas al presente trabajo.

Al Dr. Vijay K. Juneja, por hacer posible mi estancia en Filadelfia y permitirme la realización del trabajo experimental en su laboratorio.

A todo el personal del CIAD, A.C., que en directa o indirectamente colaboraron en la realización de este proyecto.

A mis compañeros de generación 2005-2007, por su compañía en los momentos de angustia y alegría, por sus consejos y apoyo.

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme y poner en mi camino a la gente adecuada, en el momento indicado.

A mis padres Maru y Gonzalo, gracias por darme la vida y ayudarme a cumplir mis sueños.

A mi hermana Ingrid, gracias por tu apoyo y comprensión.

A toda mi familia en Puebla, gracias por su apoyo y por creer en mí.

A José gracias por acompañarme en esta aventura, por tu apoyo y sobre todo por tu espera.

ÍNDICE

<i>LISTA DE TABLAS</i>	<i>viii</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>ix</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>x</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
<i>ANTECEDENTES</i>	<i>4</i>
Tecnologías de Procesamiento Mínimo.....	4
Sous vide	4
Definición.....	5
Características del proceso en productos cárnicos y flora microbiana asociada	5
<i>Clostridium perfringens</i>	10
Morfología y requerimientos de crecimiento.....	10
Síndrome asociado	11
Esporulación.....	12
Germinación.....	13
Agentes Antimicrobianos	15
Antimicrobianos de origen natural	17
Composición y Actividad Antimicrobiana de Citrucidal®	19
Efecto antimicrobiano en productos cárnicos sous vide.....	21
Irradiación	21
Definición y fuentes de radiación ionizante	22
Legislación	24
Aplicación en productos cárnicos.....	25
Efecto Combinado de Tratamientos Antimicrobianos	27
<i>JUSTIFICACIÓN</i>	<i>29</i>
<i>HIPÓTESIS</i>	<i>29</i>
<i>OBJETIVOS</i>	<i>29</i>
General	29
Particulares	30
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	<i>31</i>

Microorganismo y Preparación del Cultivo.....	31
Preparación del Producto	31
Cocción, Almacenamiento y Abuso de Temperaturas	32
Irradiación.....	33
Inactivación Térmica.....	33
Análisis Microbiológico.....	34
Análisis Físicoquímicos.....	35
Procesamiento de Datos.....	35
<i>DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADÍSTICO.....</i>	<i>36</i>
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i>	<i>37</i>
Almacenamiento en Condiciones de Abuso de Temperaturas	37
Efecto en las Constantes de Crecimiento.....	44
Abuso Estático de la Temperatura de Almacenamiento	48
Inactivación Térmica.....	51
Análisis Físicoquímicos.....	53
<i>CONCLUSIONES.....</i>	<i>55</i>
<i>REFERENCIAS.....</i>	<i>56</i>

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Agentes preservadores permitidos por la FDA.....	16
Tabla 2. Características del crecimiento de <i>C. perfringens</i> en diferentes sistemas cárnicos	18
Tabla 3. Cambio acumulativo del crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> en carne de cerdo con salsa verde almacenado a 4°C adicionada con 0, 200 y 800 ppm de Citrucidal® y 0 y 2 kGy de irradiación gamma.....	38
Tabla 4. Parámetros de crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> en carne de cerdo con salsa verde, suplementados con 0, 200 y 800 ppm de Citrucidal® además de 0 y 2 kGy de irradiación gamma; calculados con el modelo de Baranyi.....	47
Tabla 5. Cambio acumulativo del crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> en carne de cerdo con salsa verde, durante el abuso estático de temperaturas de almacenamiento por 15 y 13 horas a 25 °C. Suplementados con 0, 200 y 800 ppm de Citrucidal® además de 0 y 2 kGy de irradiación gamma.	49
Tabla 6. Cambio acumulativo de las mediciones de pH en carne de cerdo con salsa verde, durante el almacenamiento a 25, 15 y 4°C. Suplementados con 0, 200 y 800 ppm de Citrucidal® además de 0 y 2 kGy de irradiación gamma.	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representación gráfica del valor D..... 8
- Figura 2. Curvas de crecimiento de *Clostridium perfringens* en carne de cerdo con salsa verde, almacenado a 15°C. Con la aplicación de 2kGy de irradiación gamma (a) ó 0 kGy (b); suplementados con 0 (■), 200(▲) y 800(◆) ppm de Citrucidal[®]. La regresión no lineal con el modelo de Baranyi se muestra con las líneas continuas..... 40
- Figura 3. Curvas de crecimiento de *Clostridium perfringens* en carne de cerdo con salsa verde, almacenado a 25°C. Con la aplicación de 2kGy de irradiación gamma (a) ó 0 kGy (b); suplementados con 0 (■), 200(▲) y 800(◆) ppm de Citrucidal[®]. La regresión no lineal con el modelo de Baranyi se muestra con las líneas continuas..... 43
- Figura 4. Inactivación térmica de *Clostridium perfringens* en carne de cerdo con salsa verde a 60°C. Suplementada con 0 (■), 200(▲) y 800(◆) ppm de Citrucidal[®]. La regresión no lineal se muestra con las líneas continuas..... 52

RESUMEN

Con el objeto de asegurar la inocuidad de los productos sous vide, es recomendable el uso de multi-barreras antimicrobianas. En este trabajo se investigó el efecto combinado de Citrucidal® e Irradiación gamma en el crecimiento de *Clostridium perfringens* en un platillo mexicano sous vide. El Citrucidal® se agregó en concentraciones de 0, 200 y 800 ppm después de mezclar carne de cerdo y salsa verde. Posteriormente el alimento se inoculó con $3\log_{10}$ UFC/g de esporas y sellado al vacío. Las muestras fueron irradiadas a 0 y 2 kGy y procesadas a una temperatura interna de 71°C, enfriadas con hielo y almacenadas a 4, 15 y 25°C. También se evaluó el efecto del abuso estático de temperatura a 25°C por 13 y 15 horas. La población total de *C. perfringens* se determinó mediante la incubación anaeróbica a 37°C por 48 horas de muestras diluidas en agar triptosa-sulfito-cicloserina. No se observaron diferencias significativas en el crecimiento del patógeno debido a la interacción de irradiación gamma y Citrucidal®. Durante el almacenamiento a 15°C no se observó crecimiento después de 45 días en las muestras con 800 ppm de Citrucidal®. En contraste a 25°C, independientemente del tratamiento antimicrobiano aplicado, la población del patógeno se incrementó en $4\log_{10}$ UFC/g. Sin embargo, en las muestras sometidas a 13 horas de abuso a 25°C, se observó una reducción en el incremento de la población de *C. perfringens* como resultado de la combinación de 2kGy con 200 y 800 ppm de Citrucidal®. La resistencia térmica de células vegetativas de *C. perfringens* se evaluó a 60°C, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en los valores D, debido a la adición de Citrucidal®. Para el producto carne de cerdo y salsa verde tipo sous vide, la seguridad microbiológica se puede asegurar adicionando 800 ppm de Citrucidal® si la temperatura de almacenamiento no supera 15°C.

como resultado de la combinación de 2kGy con 200 y 800 ppm de Citrucidal[®]. La resistencia térmica de células vegetativas de *C. perfringens* se evaluó a 10°C, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en los valores D, debido a la adición de Citrucidal[®]. Por lo tanto, en el producto carne de cerdo y salsa verde tipo sous vide, la seguridad microbiológica se puede asegurar adicionando 800 ppm de Citrucidal[®] si la temperatura de almacenamiento no supera 15°C.

INTRODUCCIÓN

La demanda por productos con características de frescura, libres de conservadores y listos para consumir ha impulsado el consumo de los productos mínimamente procesados, que incluyen la tecnología sous vide. Este proceso es definido como la cocción en condiciones controladas de tiempo y temperatura (menores de 90°C) de alimentos frescos, que son envasados al vacío en un material de envase resistente al calor. Este tipo de productos deben almacenarse y distribuirse en condiciones de refrigeración (Schellekens, 1996). Dado que el proceso térmico no está diseñado para obtener un producto estéril, existe el riesgo de que los microorganismos, incluso los patógenos, sobrevivan. Razón por la cual es de gran importancia asegurar que la cadena de frío se mantenga durante su distribución y comercialización. Sin embargo, existe evidencia de que un abuso en la temperatura puede ocurrir en algún punto de su distribución (NFPA, 1988), con el consiguiente incremento del riesgo del crecimiento de los patógenos que hayan sobrevivido al tratamiento térmico.

Una de las enfermedades transmitidas por alimentos más comunes a nivel mundial, es causada por *Clostridium perfringens*. En Estados Unidos, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades estima que esta enfermedad afecta alrededor de 250,000 personas anualmente (Mead et al., 1999). Las esporas de este patógeno se encuentran distribuidas en el suelo, agua e intestinos de animales y humanos, por lo que la carne que consumimos puede contaminarse

durante el sacrificio de los animales de abasto (Steele, 2001). Las células vegetativas de *C. perfringens* son destruidas por el tratamiento térmico de los productos listos para consumir, sin embargo las esporas se mantienen intactas. Debido a que el almacenamiento en refrigeración no es suficiente para la seguridad microbiológica de los productos sous vide, es necesario incorporar barreras antimicrobianas en ellos.

La tecnología de barreras se basa en la aplicación combinada de agentes conservadores para lograr productos alimenticios estables y seguros microbiológicamente hablando. Un efecto sinergista puede lograrse si las barreras atacan al mismo tiempo en diferentes puntos afectando la homeostasis del microorganismo (Leistner, 2000). Gombas y Gomez (1978) reportan que la aplicación previa de irradiación gamma afecta la sensibilidad térmica de esporas de *C. perfringens*, sin embargo el tratamiento en orden inverso no presenta dicho efecto. De forma similar el efecto combinado de irradiación beta y el cocimiento sous vide, eliminó $6\log_{10}$ UFC/g de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo, con lo que se logró extender su vida de anaquel 8 semanas (Shamsuzzaman et al., 1995).

Se ha sugerido que los productos alimenticios relacionados con los cítricos tienen cierta actividad antimicrobiana (Subba et al., 1967). El Citrucidal[®] es un antimicrobiano hecho a base del extracto de la semilla y pulpa de toronja (Nutriteam, Ripton, Vt.). De acuerdo con Cvetnic y Vladimir (2004) los principales ingredientes de este producto son el ácido ascórbico, cítrico y

flavonoides. Utilizando 20,000 ppm de Citrucidal[®] se logró reducir la población de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. en semillas de alfalfa (Fett y Cokke, 2003). Recientemente, la adición de 200 ppm de Citrucidal[®] pudo controlar el crecimiento de *C. perfringens* en un producto sous vide de carne de pollo y mole poblano, durante su almacenamiento a 19 °C (Juneja et al., 2006).

ANTECEDENTES

Tecnologías de Procesamiento Mínimo

Las tecnologías de procesamiento mínimo surgieron en respuesta a la demanda de los consumidores por productos de preparación rápida y con características organolépticas de frescura. Se sabe que el tiempo disponible para la preparación de los alimentos ha disminuido alrededor de un 50% en los últimos años (Gaze, 2005). Además, se busca que la calidad se asemeje a un producto recién preparado o fresco. Esto provocó cambios en la producción de los productos alimentarios, dando como resultado los alimentos con procesamiento mínimo. En este tipo de productos se busca mantener sus atributos sensoriales así como su valor nutritivo, utilizando tratamientos sinergistas que afecten lo menos posible dichos atributos, pero que garanticen la seguridad microbiológica (Juneja, 2003).

Sous vide

Una de las tecnologías de procesamiento mínimo es la denominada "sous vide", un subgrupo de las llamadas atmósferas modificadas. Estas últimas incluyen el empaque al vacío con atmósferas controladas y con atmósferas modificadas (Philips, 1996). Gracias al gran avance desde sus inicios en 1930 hasta nuestros días, se han desarrollado una gran variedad de productos

empacados bajo estos principios. Son ejemplo las pastas, pescados y carne de pollo y/o res ya sea cruda o cocinada. A la vez, se han desarrollado nuevas tecnologías en la producción de materiales de envase con los llamados empaques inteligentes. Este tipo de tecnología se considera de avance en una nueva etapa de la conservación de alimentos (Mañas y Pagán, 2005).

Definición

La tecnología sous vide, del francés "bajo vacío", es un método que caracteriza un cierto tipo de atmósfera controlada. Mediante este proceso el alimento fresco o parcialmente cocido es empacado al vacío en contenedores plásticos o bolsas térmicamente estables e impermeables al aire. Posteriormente se pasteuriza a un tiempo y temperatura definido para cada producto específico, se enfría rápidamente y almacena en condiciones de refrigeración (Creed y Reeve, 1998).

Características del proceso en productos cárnicos y flora microbiana asociada

El proceso térmico en los productos sous vide está enfocado a destruir células vegetativas de microorganismos patógenos ya que se intenta afectar lo menos posible las características organolépticas del producto (Gaze, 2005). De forma general, se utilizan temperaturas bajas (menos 90°C) y tiempos largos de cocción en comparación con lo utilizado en la cocción tradicional. Las temperaturas más bajas se usan para cocinar pescado y carnes rojas, usualmente por debajo de 70°C; por el contrario para los vegetales se usa una

temperatura alrededor de 95°C (Schellenks, 1996). Sin embargo esta clase de tratamientos térmicos no tienen efecto sobre especies termoresistentes, razón por la cual la vida de anaquel de los productos sous vide es menor a la de un producto comercialmente estéril (Juneja, 2003).

El uso del calor para la conservación de alimentos se basa en los efectos destructivos que éste tiene en los microorganismos que pudieran estar presentes en ellos. Para la conservación de alimentos, comúnmente se utilizan dos patrones de temperaturas, pasteurización y esterilización. La primera implica la destrucción de todos los organismos patógenos en forma vegetativa en el alimento y la reducción de aquellos deteriorativos. Por otro lado, esterilizar significa la destrucción de todos los organismos viables, obteniendo productos alimenticios microbiológicamente seguros y estables, como los enlatados (Jay, 2000^o)

La dependencia que existe entre el tiempo y la temperatura durante la inactivación térmica de un microorganismo se describe como la muerte de un microorganismo en función de un tratamiento térmico de la siguiente forma:

$$U = D(\log N_0 - \log N_u)$$

Donde:

U es el tiempo de calentamiento

D es el tiempo necesario para una reducción en el 90% de los organismos sobrevivientes

N_0 es la carga microbiana inicial

N_t la población de sobrevivientes en el punto final del tratamiento térmico

De forma gráfica, en la figura 1 se muestra el comportamiento de este modelo (Pflug y Gould, 2000). El valor D es numéricamente igual a los minutos necesarios para que la curva de sobrevivientes atraviese un ciclo logarítmico. Matemáticamente es igual al recíproco de la pendiente de dicha curva y es una medida de la velocidad de muerte de un microorganismo dado; entendiendo como muerte la inhabilidad de el organismo de formar una colonia visible. De forma práctica el valor D representa los minutos necesarios para reducir en una unidad logarítmica la población de un microorganismo dado a una temperatura específica.

Con el objeto de evitar el crecimiento de bacterias sobrevivientes, una vez que el proceso de cocción ha finalizado se debe enfriar rápidamente. Según la Food Safety Inspection Service (FSIS) de los Estados Unidos, en los productos cárnicos este proceso no debe llevar más de 15 horas (FSIS, 1999). La velocidad de enfriamiento es un factor importante que se debe considerar para asegurar la seguridad microbiológica de los productos sous vide (Borch y Arinder, 2002). Cuando el producto se enfría, pasa por un rango de temperaturas que son ideales para la germinación de especies termoresistentes. Se han publicado diversos estudios en los que se muestra el comportamiento microbiano cuando existe variación en la velocidad de enfriamiento (Taormina y Dorsa, 2004).

Cabe recalcar que la ausencia de oxígeno, obtenida por el empaclado al vacío, inhibe el crecimiento de microorganismos aerobios, existiendo así un ambiente favorable para aquellos anaerobios y facultativos. Otro aspecto ha considerarse en el tratamiento sous vide, es que la cocción no destruye especies termoresistentes (esporas) las cuales pueden mantenerse latentes en el producto final. Por otro lado, se sabe que durante el transporte, venta y almacenamiento de los alimentos hay variaciones en las temperaturas de refrigeración (NAFPA, 1988). Un estudio realizado en el Reino Unido, demostró que el rango de temperaturas en los refrigeradores domésticos se ubica entre 4.5 y 30.5°C (James y Evans, 1992).

Puntualizando, en los productos sous vide las bacterias que tienen posibilidad de crecimiento serán aquellas anaerobias o facultativas que presenten una forma termorresistente y capaces de crecer a bajas temperaturas. Ejemplos de éstas son *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* las cuales pueden convertirse en un riesgo para la salud del consumidor final (Juneja, 2003). El microorganismo que se desarrolle en el producto, dependerá de si sus requerimientos de crecimiento son satisfechos por el mismo (Novak y Juneja, 2002).

Clostridium perfringens

Este microorganismo además de tener amplia distribución en la naturaleza es el agente causal de una de las enfermedades alimentarias más común a nivel mundial (García et al., 1992). Debido a que presenta una forma de latencia como la spora, permanece en el suelo, polvo, vegetales y varios animales, sin perder su capacidad de infección.

Morfología y requerimientos de crecimiento

C. perfringens es un bacilo gram positivo y además de tener la capacidad de crecer en condiciones de anaerobiosis presenta una forma resistente o spora. Las pruebas microbiológicas muestran que puede hidrolizar la gelatina, reducir los nitratos y fermentar lactosa (Rhodehamel y Harmon, 1998). El rango de

temperaturas en el que puede crecer oscila entre 6 y 52°C, además puede crecer a una gran velocidad, con un tiempo de generación que va de 7 a 30 minutos si se mantiene entre 30 y 47°C (Johnson, 1990).

El pH óptimo para el crecimiento de este organismo esta entre 6 y 7, sin embargo se ha observado que puede crecer hasta niveles bajos de pH que van de 5.5 a 5.8 y a niveles altos como 8 y 9. Mientras que el crecimiento de la mayoría de las bacterias se inhibe con porcentajes de 5 a 6.5 de NaCl, este organismo tiene la habilidad de desarrollarse hasta con un 8 % de dicho aditivo (Johnson, 1990).

Se encuentra como célula vegetativa principalmente en productos cárnicos, ya que requiere de 13 aminoácidos que no es capaz de sintetizar, por lo que necesita de un medio rico en proteínas como los productos a base de carne (Anderson et al., 1995).

Síndrome asociado

Basándose en la habilidad del microorganismo de producir endotoxinas, se reconocen 5 tipos (A al G). Las cepas causantes de enfermedad alimentaria pertenecen al tipo A, a las cuales se enfocaran los siguientes apartados.

En Estados Unidos se considera a la infección causada por *C. perfringens* como la tercera causa de enfermedad transmitida por los alimentos. El centro para el control y prevención de las enfermedades de ese país, ha estimado que ocurren 250 000 casos anualmente, sin embargo su índice de mortandad es bajo ya que solo se han reportado 7 muertes hasta 1999 (Mead et al., 1999). En

México, no existen datos acerca de la incidencia de este padecimiento, pues además que la enfermedad no es grave no se realiza su detección de forma rutinaria en los laboratorios de salud pública. Su incidencia real se desconoce debido a que no se reportan todos los casos por la poca severidad del síndrome (Anderson et al., 1995; Bos et al., 2005).

La enfermedad producida por este patógeno se debe a la actividad de una toxina la cual tiene un efecto citotóxico que provoca una ruptura en las membranas de las células del tejido epitelial del tracto digestivo, lo que lleva a la aparición de la enfermedad gastrointestinal (Anderson et al., 1995).

Esta enfermedad ocurre después de la ingestión de alimentos altamente contaminados, por lo general productos cárnicos con más de 10^6 UFC/g células vegetativas de *C. perfringens*. Las cuales llevarán a cabo la esporulación en el intestino delgado y consecuentemente generaran grandes cantidades de toxina. Finalmente, en un lapso de 6 a 24 horas se presenten síntomas como dolor abdominal, diarrea, náusea, fiebre y vómito (Rood y Cole, 1991). En personas sanas es de corta duración, a excepción de las personas inmunosuprimidas, en las cuales puede presentarse de forma severa (Jay, 2000).

Esporulación

Las esporas son células especiales de resistencia, cuya formación se cataliza por la falta de nutrientes o por cambios en la composición del medio en que se desarrolla el patógeno. Se sabe que las esporas son más resistentes al calor que las células vegetativas, y pueden soportar hasta 100°C por un lapso

de 1 hora, sin sufrir daño (Collee et al., 1961). Esta resistencia se atribuye a la baja actividad de agua que presentan en el compartimiento intracelular central (Moir et al., 2002).

La esporulación es un proceso complejo de diferenciación celular, que permite su adaptación a condiciones ambientales adversas. Este proceso incluye varios pasos, tales como segregación cromosomal, división celular asimétrica o simétrica, expresión genética diferencial y mecanismos de transducción específicos. Todos estos aspectos de la esporulación se han estudiado en detalle, lo cual ha servido para conocer mejor otros procesos celulares (Barák et al, 2005). Tal como es la producción de enterotoxina, que se lleva a cabo en el citoplasma celular después de la activación del gen *cpe* por factores de transcripción que también regulan los genes de esporulación (Rood y Cole, 1991).

A pesar de su resistencia a las condiciones ambientales las esporas tienen la capacidad de recuperar su actividad metabólica. A este proceso se le conoce como germinación. Ésta se inicia cuando la espora se encuentra en presencia de sustancias germinantes, las cuales pueden ser metales, aminoácidos, azúcares o ribósidos (Moir, 2002).

Germinación

El mecanismo de activación de la germinación aún no se conoce, sin embargo el proceso está bien dilucidado. Esta se ha dividido en dos etapas, la primera involucra la liberación de cationes del núcleo de la espora, provocando

un aumento en el pH, necesario para los procesos metabólicos celulares. También incluye la hidratación parcial del núcleo de la espora, debido al reemplazo del ácido dipicolínico presente. La segunda etapa se lleva a cabo mediante la hidrólisis de la corteza, hidratación total del centro, con lo que la espora pierde la resistencia que la caracteriza y se lleva a cabo su consecuente activación metabólica (Setlow, 2003).

Además de las sustancias germinantes, existe la posibilidad de que las esporas sufran activación por efecto de sustancias que no son nutrientes. Ejemplo de estas son la lisozima, cationes surfactantes y ciertas sales, las cuales son capaces de circular a través de la corteza y fungir como nutrientes. Asimismo, la germinación puede ser activada por la aplicación de tratamientos como altas presiones y calor (Setlow, 2003). Este hecho aumenta la probabilidad de que en un platillo sous vide germinen las esporas de *C. perfringens* que pudieran estar presentes.

Como se mencionó con anterioridad, el almacenamiento de los productos sous vide debe realizarse bajo temperaturas de enfriamiento. Gracias a este control de la temperatura se puede controlar el crecimiento de los microorganismos que pudieran estar presentes, como *C. perfringens*. Sin embargo, debido a que se conoce la existencia de variaciones en la temperatura durante el transporte, venta y almacenamiento en el hogar se requiere de un mecanismo de control adicional (James y Evans, 1992).

Diferentes sustancias químicas han sido probadas para prevenir o retardar el crecimiento y germinación de los microorganismos en los alimentos. Debido al efecto que presentan en la calidad del producto, pueden ser considerados como agentes antimicrobianos.

Agentes Antimicrobianos

Algunos de los agentes preservadores utilizados en la industria alimentaria ejercen actividad antimicrobiana en el tratamiento de enfermedades del humano y otros animales. Este hecho no implica que todos los agentes utilizados en la terapéutica deban ser parte de una formulación alimenticia como preservadores. De forma similar, algunos preservadores serían ineficaces o incluso tóxicos si se utilizarán en la farmacéutica.

Existen muchos agentes con el potencial de inhibir el crecimiento de microorganismos, sin embargo, sólo un pequeño número de ellos es utilizado en la industria. Esto se debe principalmente a que existen legislaciones muy estrictas sobre el uso de los agentes preservadores. En la Tabla 1 se muestran algunos de los considerados como seguros por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos.

Para el caso de productos cárnicos solo se permite el uso de nitrito de sodio como agente antimicrobiano, aun con la controversia que existe sobre su utilización esta muy extendida en la fabricación de productos cárnicos procesados. Además de evitar el crecimiento de *C. botulinum*, agente causal del

botulismo, ejerce protección contra el crecimiento de *C. perfringens* (Jay, 2000^b; Taormina et al., 2003).

Tabla 1. Agentes preservadores permitidos por la FDA

Agente	Máximo Permitido	Aplicación
Ac. Propiónico/Propionatos	0.32 %	Pan, pasteles, quesos
Ac. Sórbico/Sorbatos	0.2 %	Quesos, jarabes, pasteles
Ac. Benzoico/Benzoatos	0.1 %	Margarina, catsup, aderezos
Parabenos	0.1 %	Pan, aderezos
SO ₂ /Sulfitos	200-300 ppm	Frutas secas, vinos
Nisina	1 %	Quesos pasteurizados
Diacetato de sodio	0.32 %	Pan
Nitrito de sodio	120 ppm	Came en salmuera

Modificado de Jay, 2000^b.

Antimicrobianos de origen natural

En respuesta a la preocupación por el uso de los nitritos como conservadores y las demandas del mercado por utilización de aditivos de origen natural, se esta en busca de nuevas sustancias para substituir a los primeros.

En los últimos años se ha reportado que con el uso de acetatos de sodio y sales de ácidos orgánicos como el citrato y lactato de sodio; se puede inhibir la germinación de *C. perfringens* en diferentes sistemas cárnicos. Siendo la combinación de citrato y diacetato de sodio por arriba de 0.5% en carne de cerdo y 1-2% en carne de res las que presentan la mayor actividad antimicrobiana (Sabah et al., 2003; Thippareddi et al., 2003). En estos experimentos el comportamiento del microorganismo varia dependiendo del sistema utilizado para su inoculación, tal como se observa en la Tabla 2.

En esta tabla se muestran las características del producto utilizado como vehículo de crecimiento del microorganismo, el tiempo de enfriamiento utilizado, así como el inoculo inicial y su incremento reportado para el control de cada experimento. De forma general se puede observar que a medida que el tiempo de enfriamiento aumenta, la población final del patógeno se incrementa. De la misma forma en igualdad de condiciones, este organismo crece más rápido en carne de res en salmuera que en la misma troceada.

Tabla 2. Características del crecimiento de *C. perfringens* en diferentes sistemas cárnicos

Producto	Tiempo de enfriamiento	Temperatura final	Población inicial (log UFC/g)	Población final (log UFC/g)	Referencia
Carne de res en salmuera reestructurada	18 h	4.4 °C	2.5	3.64	Sabah et al., 2003.
Carne de res en salmuera	18 h	7.2 °C	2.5	2.5	Thippareddi et al., 2003.
Carne de res troceada	21 h	7.2 °C	2.5	4.8	Sabah et al., 2003.
Carne de res en salmuera	21 h	7.2 °C	2.5	8.0	Thippareddi et al., 2003.

Por otro lado, al evaluar la actividad de citrato y lactato de sodio en combinación con diferentes especias para inhibir la germinación de *C. perfringens* en carne de res durante el enfriamiento a temperaturas que difieren de los lineamientos de la FSIS (menos de 15 horas). Se observó que las mezclas que lograron reducir hasta 1 log₁₀ UFC del patógeno fueron las de citrato con ajo, curry, orégano y clavo. Al utilizar las especias sin el citrato, sólo el orégano y clavo lograron disminuir la población del patógeno, aunque no se logró lo requerido por la FSIS. Sin embargo, se abre la opción de la utilización de agentes antimicrobianos de origen natural, en la prevención del crecimiento de *C. perfringens* (Sabah et al., 2004).

En la actualidad existe la tendencia en la población de consumir productos cuyos aditivos sean de origen natural. Dicha tendencia está ganando terreno ya que se sabe que no hay riesgo sobre la seguridad toxicológica en los aditivos naturales. Esto se debe a que forman parte de los constituyentes de los alimentos, razón por la cual se están buscando nuevas fuentes de explotación de los mismos (Kaur y Kapoor, 2001).

Composición y Actividad Antimicrobiana de Citrucidal®

En los últimos años un compuesto comercial llamado Citrucidal®, ha recibido atención debido a que ha mostrado actividad antimicrobiana en ensayos *in Vitro*. Este compuesto es una mezcla de sustancias extraídas de la pulpa y semilla de la toronja, cuya producción se basa en la extracción del aceite para

convertirlo en un líquido con características ácidas. Dicho extracto contiene diferentes compuestos como polifenoles, flavonoides, ácido ascórbico, ácido cítrico, tocoferol, limonenos y minerales (Cvetnic y Vladimir, 2004).

La mayor parte de la información sobre este producto ha sido divulgada por el fabricante, por lo que existen pocos estudios científicos que constaten su efecto antimicrobiano. Es un hecho que la mayor parte de su utilización se realiza en la medicina naturista, sin embargo existe la posibilidad de su uso de forma industrial.

Existe cierta controversia sobre la actividad antimicrobiana de este producto pues esta se ha atribuido al cloruro de benzetonio, el cual es agregado como conservador (Woedtke et al., 1998). Sin embargo Cvetnic et al. (2004), evaluaron la actividad antimicrobiana de un extracto de pulpa y semilla de toronja no comercial. Éste mostró efecto bactericida y bacteriostático en bacterias gram negativas y levaduras; además se demostró la presencia de polifenoles y flavonoides en dicho extracto a los cuales se debe su efecto antimicrobiano. Por otro lado Reagor y colaboradores (2002), evaluaron la inhibición del crecimiento de bacterias gram positivas y negativas por acción del Citrucidal[®]. De un total de 67 especies probadas, en todas se observó cierta inhibición por el antimicrobiano, siendo las más susceptibles a este las gram positivas como *Staphylococcus spp.* y *Enterococcus spp.*

En otro experimento, se probó la efectividad del Citrucidal[®] y su combinación con otros aceites como antimicrobiano contra cepas resistentes a metilicina de

Staphylococcus aureus. Estos investigadores encontraron que la combinación de Citrucidal[®] con aceite de geranio tuvo el mayor efecto antimicrobiano en dichas cepas (Edwards et al., 2004). También hay evidencia de que el Citrucidal[®] puede inhibir el crecimiento de bacterias gram negativas como *V. cholerae*. En un estudio se probó que a una concentración de 50 ppm, se requieren de 5 minutos de contacto para producir muerte bacteriana, a medida que la concentración aumenta hasta 1000 ppm, el tiempo de contacto disminuye para producir el efecto bactericida (Mata, 1993).

Efecto antimicrobiano en productos cárnicos sous vide

Específicamente en un producto sous vide, recientemente se reportó el efecto antimicrobiano del Citrucidal[®] contra esporas de *C. perfringens* en un producto hecho a base de pollo marinado. Con una temperatura de almacenamiento de 25 °C se retrasó el crecimiento del patógeno por 9 h y a 19 °C se requirió de 13 h para lograr niveles similares, con la adición de 200 ppm del antimicrobiano (Juneja et al., 2006). Debido a que este microorganismo se comporta de forma diferente en los sistemas cárnicos, resulta necesario conocer si el Citrucidal[®] tiene el mismo efecto en productos sous vide hechos a base de otras fuentes cárnicas.

Irradiación

Aun cuando se ha demostrado la efectividad del tratamiento térmico aplicado a los alimentos, esta presenta un efecto selectivo sobre el tipo de

organismos presentes en ellos. La presencia de organismos termorresistentes en los alimentos pre-cocidos ha provocado el interés en nuevas tecnologías de conservación que no involucren la utilización de calor, como la irradiación; así como en la combinación del tratamiento térmico con estas últimas (Grant y Patterson, 1992).

Definición y fuentes de radiación ionizante

Podemos definir a la irradiación como un proceso en el cual un alimento es expuesto a diversos niveles de energía radiante, que al penetrar el producto inactiva microorganismos sin elevar la temperatura interna de forma considerable (Federal Register, 1999). La dosis de energía radiante aplicada se expresa en términos de kilograys (kGy), que representan una función de la energía proveniente de la fuente de irradiación y el tiempo de exposición del producto. Un Gray (Gy) es equivalente a un Joule de absorción de energía por kilogramo de material, aunque el Gray puede utilizarse para cualquier tipo de irradiación, no describe el efecto biológico de los diferentes tipos de radiación (Mahapatra et al., 2005).

El nivel de energía que se usa es pequeño, pues las dosis utilizadas para alimentos se encuentran en el rango de 2-7 kGy dependiendo del producto. Para productos cárnicos refrigerados la FDA permite el uso de hasta 4.5 kGy y 7 kGy para aquellos congelados, ya que se ha reportado que no hay variación en los atributos organolépticos y de calidad, cuando se utilizan dichas dosis (Nanke et al., 1998; Fu et al., 1995).

La radiación ionizante se refiere a aquellas formas de energía que tienen la capacidad de crear iones en el sustrato al que son dirigidos. Hasta el momento solo tres formas de dicha energía han sido aprobadas para su aplicación en la carne y sus productos: rayos x, irradiación beta y gamma.

Los rayos x son generados cuando electrones de alta energía chocan con una placa de metal (tungsteno o tantalio). Aunque presenta el mismo poder de penetración que la irradiación gamma, el alto costo de operación y mantenimiento restringen su uso en la industria (Niemira, 2000).

La irradiación beta es producida por máquinas en las que la energía es provista por un haz de electrones que viajan a la velocidad de la luz. Aunque esta clase de aparatos no requiere de un núcleo renovable de electrones, no son muy utilizados debido a la baja penetración en los alimentos, hasta 5 cm en carne y sus productos. Además, demanda un alto costo en energía eléctrica y mantenimiento (Diehl, 1995).

La mayoría de las instalaciones utilizan los rayos gamma, comúnmente se usa un núcleo de Co^{60} o Ce^{137} como fuente de ellos. La radiación gamma se produce a partir de ondas electromagnéticas que tienen la capacidad de desalojar electrones de algunas moléculas de los alimentos convirtiéndolos en iones. Sin embargo no tienen suficiente energía para afectar las partículas del núcleo de dichas moléculas, por lo que no es posible inducir radioactividad en el alimento (Mahapatra et al., 2005).

Legislación

En América Latina solo Argentina, Brasil y Chile cuentan con legislación referente a la aplicación de irradiación en alimentos para consumo humano. Cabe destacar que en ellos se permite el uso de la irradiación en productos avícolas hasta un máximo de 7 kGy (Oliveira, 2000).

En la Unión Europea existe una gran diversidad en cuanto a la regulación de productos irradiados, que va desde la ausencia de ésta en Portugal, hasta su prohibición en Alemania. En estos momentos esta en proceso la adopción de la legislación por todos los países integrantes, cabe señalar que al igual que América Latina solo se permite el uso de la irradiación en carne de aves, hasta un máximo de 5 kGy (Neysen, 2000).

Con respecto a la región del Pacífico y Asia, al igual que en el caso de la Unión Europea, existen diferencias en las legislaciones de cada uno de los países integrantes. En Asia para homogeneizar la regulación de los productos irradiados, se ha hecho hincapié en que las dosis mínimas permitidas se basen en los requerimientos para lograr la inhibición de organismos patógenos. Las dosis máximas entonces, serán aquellas en las que el producto no sufra degradación de sus atributos organolépticos (Luckamn, 2002).

En los Estados Unidos, el Servicio de Inspección y Seguridad de Alimentos (por sus siglas ingles, FSIS) permite el uso de radiación ionizante para tratar carne cruda, cocida y otros subproductos con el fin de reducir los niveles de microorganismos patógenos y alargar la vida de anaquel. Cabe señalar que es

el único país que permite el uso de irradiación en carne distinta a la de aves, hasta un máximo de 4.5 kGy y 7.0 kGy en carne refrigerada y congelada respectivamente. Finalmente para el caso de productos avícolas se permite la utilización de 1.5-3.0 kGy (Federal Register, 1999).

A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud permite el uso de hasta 10 kGy en productos cárnicos, sin embargo, ningún país permite esta dosificación actualmente.

Aplicación en productos cárnicos

El efecto antimicrobiano de la radiación ionizante se debe principalmente al daño que esta ejerce sobre el DNA de los organismos (Farkas, 2006). La resistencia de un microorganismo a la radiación, se indica con un valor D_{10} que al igual que para la resistencia térmica indica la dosis en kGy necesaria para inactivar el 90% de la población (Grant y Patterson, 1992).

La dosis requerida para inactivar organismos patógenos no esporulados en la carne y sus productos se encuentra entre 1-4 kGy. Se ha demostrado que el uso de 3 kGy reduce la población de microorganismos aerobios, psicotrópicos y mesofílicos en lomo de cerdo empacado al vacío. Con lo que se logró extender su vida de anaquel de 41 a 90 días (Lebepe et al, 1990). Por otro lado, con la aplicación de 1.91 kGy en carne molida de cerdo, no se pudo detectar crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios mesófilos, ni de organismos capaces de crecer a 10 °C (Thayer et al., 1993). Al estudiar el efecto de 2.5 kGy en carne de res en salmuera en el crecimiento de diversos

organismos patógenos, se observó que el más sensible a la radiación fue *Bacillus cereus* (células vegetativas), presentando un valor D_{10} de 0.288 kGy, los valores D_{10} restantes oscilan entre 0.342 y 0.697 kGy (Grant y Patterson, 1992).

Con el objeto de evaluar el efecto del proceso de irradiación en las características microbiológicas, químicas y sensoriales de productos étnicos provenientes de la India, Kanat y colaboradores (2005) aplicaron dosis desde 1 hasta 3 kGy, en dichos productos. Lo que resultó en la eliminación de *S. aureus*, cuenta viable, coliformes fecales y hongos; siendo la dosis de 3 kGy la que presentó mayor reducción de organismos y aumentó la vida de anaquel por dos semanas.

En cuanto a productos listos para consumir, se han utilizado dosis de hasta 2.5 kGy para inactivar microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Yersinia enterocolitica*; inoculados en un producto tipo sándwich. En todos los casos, se logró una reducción en los niveles de los patógenos, siendo el más resistente *Salmonella* spp. con un valor D_{10} de 0.61 kGy (Sommers y Boyd, 2006).

Finalmente, cabe recalcar que la utilización de la irradiación como tratamiento antimicrobiano no garantiza la destrucción de toxinas, virus ni esporas; a las dosis aplicadas para destruir células vegetativas (debajo de 10 kGy). Por lo que para garantizar la sanidad de los productos, en cuanto a este tipo de microorganismos; este proceso debe ser parte de un programa de

buenas practicas de manufactura o, combinarlo con otros métodos antimicrobianos (Satín, 2002).

Efecto Combinado de Tratamientos Antimicrobianos

En los últimos años se ha demostrado que al utilizar el efecto combinado de diversos factores, denominados barreras, la estabilidad de los productos alimenticios es considerablemente superior (Leistner, 2000).

Al investigar el efecto de la composición de productos elaborados con carne de puerco, la combinación de irradiación, especias y cloruro de sodio, en el crecimiento de *Y. enterocolitica* se encontró que esta fue inhibida por la acción combinada de dichos antimicrobianos (Kamat et al., 1997). Por otro lado, al investigar el efecto combinado del empaque de carne de cerdo con atmósferas modificadas (25% CO₂, 75% N₂) y una dosis de 1.75 kGy, almacenada en condiciones de abuso de temperaturas. Se logró disminuir la población de *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *E. coli* y *Y. enterocolitica* (P<0.05) en comparación con las muestras sin irradiar (Grant y Patterson; 1991).

Recientemente, se reportó el efecto combinado de irradiación y cocimiento tipo sous vide en carne de pollo. Al aplicar 3 kGy seguido de cocimiento a 71.1 °C se logró eliminar 6 log UFC/g de *L. monocytogenes*, aumentando la vida de anaquel del producto hasta 8 semanas, cuando se almacena a 8 °C (Shamsuzzaman et al., 1995).

La combinación de tratamientos térmicos e irradiación, para mejorar su efecto antimicrobiano, se reportó hace algunos años en forma *in Vitro*. Gombas y Gómez (1978) demostraron que la radiación gamma disminuye la resistencia térmica de esporas de *C. perfringens* contenidas en buffer (pH 7). Sin embargo al aplicar tratamiento térmico seguido de irradiación no observaron cambios en los valores de resistencia a la irradiación.

JUSTIFICACIÓN

El alto riesgo del crecimiento de microorganismos patógenos en los productos sous vide ha llevado a buscar la aplicación de barreras antimicrobianas que ayuden a garantizar la seguridad microbiológica de esta clase de productos.

HIPÓTESIS

La acción combinada de Citrucidal® e irradiación gamma inhibe el crecimiento de *C. perfringens* en un platillo de carne de cerdo en salsa verde, elaborado mediante la tecnología sous vide, cuando éste se almacena a temperaturas por arriba de la refrigeración.

OBJETIVOS

General

Evaluar la actividad antimicrobiana de Irradiación y Citrucidal ® sobre el crecimiento de *C. perfringens*, en un platillo cárnico elaborado mediante la tecnología sous vide, almacenado a diferentes temperaturas.

Particulares

- ✓ Evaluar el crecimiento de *C. perfringens* en un platillo de carne de cerdo en salsa verde elaborado mediante la tecnología sous vide, almacenado a 4, 15 y 25 °C.
- ✓ Evaluar el efecto de Irradiación gamma y Citrucidal[®] a diferentes niveles sobre el crecimiento de *C. perfringens* en carne de cerdo y salsa verde elaborado con la tecnología sous vide, almacenado a 4, 15 y 25°C.
- ✓ Evaluar el efecto de la Irradiación y Citrucidal[®] en el crecimiento de *C. perfringens* en carne de cerdo y salsa verde, a 25°C después de un tiempo de almacenamiento a 4°C.
- ✓ Evaluar la inactivación térmica de *C. perfringens* en carne de cerdo y salsa verde adicionada con diferentes concentraciones de Citrucidal[®] a 60°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y Preparación del Cultivo

Se utilizaron las cepas NCTC (National Collection of Culture Types) 8238, NCTC 8239, y NCTC 10240 de *C. perfringens*, que forman parte de la colección del Eastern Regional Research Center (Pensylvania, USA). La esporulación se llevó a cabo en el medio de Duncan y Strong, siguiendo la metodología propuesta por Juneja y colaboradores (1993). Una vez obtenidas las esporas de cada cepa se realizaron lavados con agua destilada, manteniéndose como suspensiones a 4°C. Para la inoculación se preparó una mezcla conteniendo esporas de las tres cepas en igual cantidad. La cantidad de esporas por mililitro se determinó por conteo en placa de agar tioglicolato-sulfito-cicloserina. Una vez conocida la concentración de esporas por mililitro de solución, se calculó la cantidad necesaria para inocular de 3 log₁₀ UFC de esporas por gramo de muestra.

Preparación del Producto

Para la elaboración del producto se utilizó salsa verde marca Herdez[®] (Melting Pot Foods) y espaldilla de cerdo que se obtuvo en puntos de venta locales (Wyndmoor, PA.). El Citrucidal[®] (Nutriteam, Inc. Ripton, Vt.) en presentación líquida (asumiendo 60% de extracto de toronja) se adicionó a la

salsa verde en 3 concentraciones diferentes 0 en el caso del control; 200 y 800 ppm, las cuales de acuerdo con Torres (2006), presentan actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. El producto fue elaborado de acuerdo a lo descrito por Luque (2001), en una relación 60:40 carne-salsa. Que según lo reportado por este autor, presenta las mejores características organolépticas.

La carne fue precocida a 90 °C por una hora y mantenida en congelación hasta su uso. Para la preparación de las muestras se pesaron tres gramos de carne de cerdo troceada y se añadieron dos gramos de salsa verde adicionada con la concentración de Citrucidal[®] adecuada para cada tratamiento, además de 1% del peso total del producto de NaCl. Esta mezcla se homogeneizó por dos minutos en un stomacher, todo esto se realizó en bolsas estériles (Whirl-Pak[®] Long-Term Sample Retention Bags). A continuación se inocularon 3 log₁₀ UFC de esporas de *C. perfringens* por gramo de muestra. El producto fue homogeneizado nuevamente dos minutos en un stomacher para finalmente sellarse a una presión negativa de 1000 milibares, utilizando una máquina de sellado al vacío (Multivac A 300/16, USA).

Para el caso de las muestras no irradiadas se procedió con el proceso de cocción que a continuación se describe, en el caso de las muestras irradiadas, este proceso fue realizado antes del proceso de cocción.

Cocción, Almacenamiento y Abuso de Temperaturas

Las bolsas se colocaron en un baño caliente (Termo NESLAB Digital Plus), con la temperatura regulada a 23°C programado para alcanzar 71°C en 1 hora.

Posteriormente las muestras fueron colocadas en una mezcla hielo-agua hasta alcanzar una temperatura de 4°C, para después ser almacenadas a las diferentes temperaturas 4, 15, y 25°C. Las muestras almacenadas a 25°C fueron analizadas a 0, 3, 6, 9, 13, 16, 18, 20, 22, 24 y 26h; aquellas a 15°C a 0, 8, 15, 22, 30 y 45 días; finalmente las almacenadas a 4°C en el día 0, 7, 14, 21 y 28. Para determinar el efecto del abuso estático de temperaturas, algunas muestras almacenadas a 4°C fueron trasladadas a 25°C por 13 y 15 horas, en los mismos días de muestreo a esta temperatura.

Irradiación

Las muestras fueron irradiadas en una unidad de irradiación gamma de Ce^{137} del Easter Regional Research Center (Wyndmoor, PA.), a una dosis final de 2.0 kGy y temperatura de 4°C. Estas muestras fueron sometidas al proceso de cocción previamente explicado, para finalmente almacenarse a las diferentes temperaturas.

Inactivación Térmica

Para la evaluación de la resistencia térmica de células vegetativas de *C. perfringens*, se prepararon las muestras siguiendo el proceso descrito previamente. Una vez terminada la cocción las muestras fueron colocadas en un baño de agua (Thermo Neslab, Digital Plus) con temperatura regulada a 25 °C por 24 horas, para permitir el crecimiento del patógeno hasta aproximadamente 7 log₁₀ UFC/g de producto. Una vez finalizado el tiempo de

incubación las muestras se colocaron en otro baño de agua estabilizado a 60°C, de donde se tomaron 2 bolsas por cada tratamiento a intervalos de tiempo regulares. Y fueron conservadas en un baño de agua-hielo para evaluar la población total de *C. perfringens* dentro de los 30 minutos siguientes, con la metodología descrita en el siguiente apartado.

Análisis Microbiológico

La cuantificación de *C. perfringens* se realizó según la técnica de la Federal Drug Administration de los Estados Unidos (FDA, 2001). En forma aséptica se abrieron las bolsas que contenían el producto y se agregó agua peptonada para obtener una dilución 1:10. Esta mezcla se homogeneizó por 2 minutos, del homogeneizado obtenido se realizaron diluciones seriadas (proporción 1:2) en agua peptonada, las cuales fueron sembradas en agar triptosa-sulfito-cicloserina (TSC) sin yema de huevo a las que se les agregó 15 ml adicionales del agar y se dejaron solidificar.

Finalmente las placas fueron colocadas en una cámara de anaerobiosis (Bactron Anaerobic/Environmental Chamber, Sheldon Manufacturing) con un 10 % de CO₂ y se incubaron a 35 °C por 48 h. Al terminar la incubación se seleccionaron las placas con 20-200 colonias negras para contabilizarse y finalmente se calcularon las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de alimento.

Análisis Físicoquímicos

La medición de la actividad de agua (A_w) se realizó con el medidor de actividad acuosa AquaLab CX-2 (Decagon Devices, USA), y el pH con un potenciómetro digital (AB 15, Fischer Scientific).

Procesamiento de Datos

Una vez obtenidos los conteos del patógeno por cada tiempo de muestreo, se realizó una transformación logarítmica base 10 de las UFC/g de alimento y se graficó en función del tiempo, para cada temperatura de almacenamiento y tratamiento antimicrobiano empleado. Estos datos fueron analizados por medio de una regresión no lineal para ajustarlos al modelo de Baranyi, utilizando el programa DMFit (Baranyi y Roberts, 2004). Con estos ajustes, se obtuvieron las constantes de crecimiento del patógeno: duración de la fase lag (λ) y la velocidad de crecimiento específica (K) (Huang, 2003). Estas se tomaron como variable de respuesta en los análisis estadísticos correspondientes.

Para evaluar la resistencia térmica de las células vegetativas de *C. perfringens* se calculó el valor D a 60°C. Para esto el \log_{10} de los sobrevivientes se ajustaron por medio de la ecuación logística usando el programa Data Fit (Oakdale Engineering, Oakdale, PA.). El valor D fue tomado como el valor absoluto de la pendiente de la regresión obtenida con dicho programa.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño factorial en bloques completos con arreglo factorial, donde los efectos principales fueron la aplicación de irradiación (0 y 2.0 kGy) y la adición de Citrucidal[®] (0, 200 y 800 ppm), con la temperatura de almacenamiento (4, 15 y 25°C) como factor de bloqueo. Se realizó un análisis de varianza por modelo lineal general para la concentración de Citrucidal[®] e irradiación gamma, con el objeto de estimar su efecto individual y combinado en los parámetros de crecimiento calculados con el modelo de Baranyi y los valores D. Las estimaciones fueron hechas a un nivel de significancia de 5% en el error. Se efectuó una prueba de rango múltiple de Duncan, para comparación de medias, utilizando el paquete estadístico NCSS, 2000.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Almacenamiento en Condiciones de Abuso de Temperaturas

En la tabla 3, se presenta el cambio acumulativo del crecimiento de *C. perfringens*, durante el almacenamiento a 4 °C del producto hecho con carne de cerdo en salsa verde cocido a 71°C. Independientemente de la aplicación de irradiación gamma o Citrucidal[®] no se observó crecimiento del microorganismo, después de 28 días de almacenamiento. Resultados similares fueron reportados por Juneja y Majka (1995) en carne molida de res cocida a 71.1°C, almacenada a 4°C. Es importante mencionar que si bien no hubo crecimiento del patógeno, la cantidad de esporas inoculadas permaneció constante durante el periodo de almacenamiento. Por lo que si hubiera un aumento en la temperatura de almacenamiento, las esporas de *C. perfringens* podrían germinar y alcanzar niveles de peligro para la salud del consumidor.

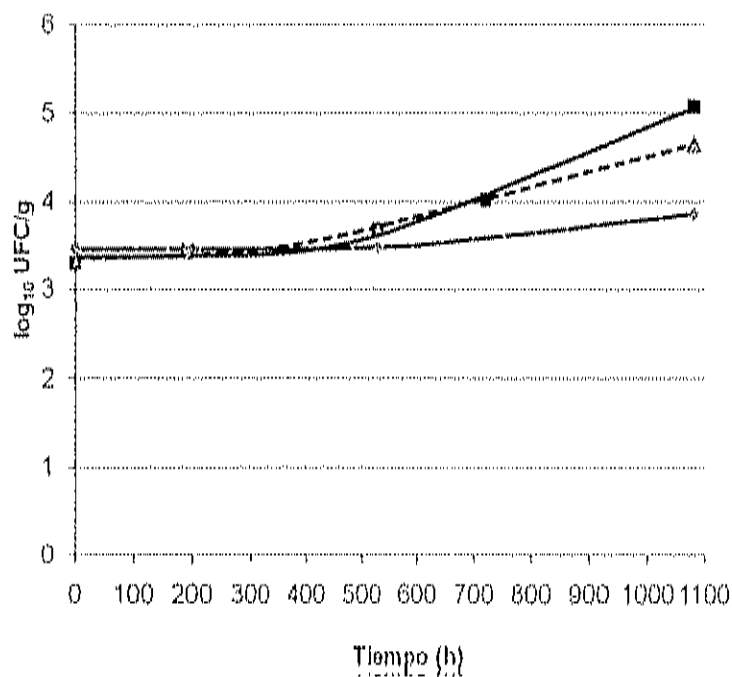
Tabla 3. Cambio acumulativo* del crecimiento de *Clostridium perfringens* en carne de cerdo con salsa verde almacenado a 4°C adicionada con 0, 200 y 800 ppm de Citrucidal® y 0 y 2 kGy de irradiación gamma.

Días a 4°C	2 kGy			0 kGy		
	0 ppm	200 ppm	800 ppm	0 ppm	200 ppm	800 ppm
7	0.2	-0.13	-0.06	-0.17	-0.07	-0.22
14	-0.08	-0.44	-0.13	-0.05	0.15	-0.17
21	0.14	-0.07	0.1	-0.26	-0.13	-0.22
28	0.16	-0.14	0.05	-0.08	0.00	-0.18

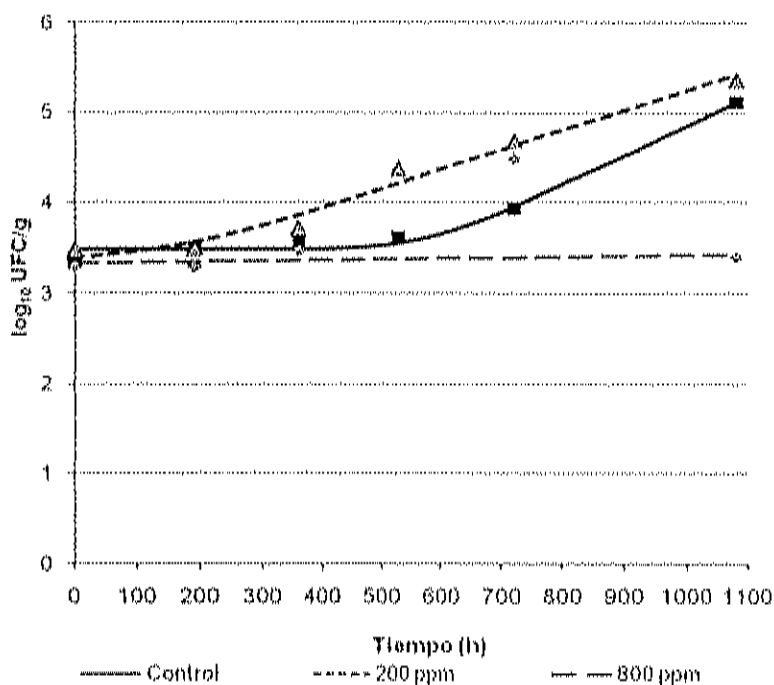
*Datos expresados en log₁₀ UFC/g
 UFC/g (día X) – UFC/g (día 0) en cada día de muestreo.

La figura 2 muestra las curvas de crecimiento de *C. perfringens* en carne de cerdo y salsa verde con 0 (a) y 2 kGy (b) de irradiación gamma durante su almacenamiento a 15°C. En las muestras sometidas a irradiación, no se observó crecimiento del patógeno en las muestras con 800ppm de Citrucidal® durante todo el tiempo que duró el experimento (figura 1a). En aquellas con 0 y 200 ppm la población microbiana aumentó hasta 5 log₁₀ UFC/g al final del almacenamiento. Este comportamiento también se observó en las muestras no irradiadas (figura 2b).

Si bien no hubo crecimiento de este microorganismo en las muestras suplementadas con 800 ppm de Citrucidal®, las que contenían 0 y 200 ppm permitieron el crecimiento de *C. perfringens* hasta 5 log₁₀ UFC/g al final del periodo de almacenamiento. Aun cuando la adición de 800 ppm de Citrucidal® tiene la habilidad de inhibir el crecimiento de este patógeno, es importante mencionar que este antimicrobiano no presentó un efecto bactericida en este alimento. Por lo tanto, de existir un aumento en la temperatura de almacenamiento el patógeno podría desarrollarse a niveles de riesgo para el consumidor.



(a)



(b)

Figura 2. Curvas de crecimiento de *Clostridium perfringens* en carne de cerdo con salsa verde, almacenado a 15°C. Con la aplicación de 2kGy de irradiación gamma (a) ó 0 kGy (b); suplementados con 0 (■), 200(▲) y 800(◆) ppm de Citrucidal[®]. La regresión no lineal con el modelo de Baranyi se muestra con las líneas continuas.

Los reportes del crecimiento de este microorganismo a 15°C en carne de cerdo son escasos, sin embargo existen algunos trabajos en otras matrices cárnicas. En carne de pollo marinada con mole poblano con 200 ppm de Citrucidal® *C. perfringens* creció hasta 7 log₁₀ UFC/g después de 10 días de almacenamiento a 19°C (Juneja et al., 2006). Por otro lado, en carne de res envasada al vacío este microorganismo creció hasta 8 log₁₀ UFC/g después de 40 días de almacenamiento a 15°C (Juneja et al., 1994). El crecimiento de esporas de *C. perfringens* inoculadas en carne de res envasada al vacío, adicionada con 0.3% de pirofosfato de sodio fue valorado por Juneja y Majka (1995). Después de 20 días de almacenamiento a 15°C, el patógeno creció hasta 4 log₁₀ UFC/g. Comparando estos reportes con lo observado en este trabajo, *C. perfringens* muestra un crecimiento más lento en carne de cerdo con salsa verde que en carne de res, cuando el producto se almacena a 15°C.

La curva de crecimiento de *C. perfringens* en carne de cerdo con salsa verde, durante su almacenamiento a 25°C se muestra en la figura 2. No se encontraron efectos significativos en el crecimiento de este patógeno como resultado de la aplicación individual o combinada de los tratamientos antimicrobianos. Después de 26 horas de almacenamiento, el microorganismo creció hasta 7.5 log₁₀ UFC/g, sin importar el nivel de adición de Citrucidal® o la aplicación de irradiación gamma. Resultados similares fueron reportados por Juneja y colaboradores (2006^b) para el crecimiento de este patógeno en jamón curado, después de almacenar a 26.7°C por 24 horas. Sin embargo con la

adición de 200 ppm de Citrucidal[®] en carne de pollo con mole poblano (Juneja et al., 2006), este microorganismo alcanzó una población de 7 log₁₀ UFC/g en tan solo 16 horas de almacenamiento a 25°C. Debido a que el tipo de salsa utilizada para la preparación del producto es diferente a la utilizada en este trabajo, las diferencias en la velocidad de crecimiento del patógeno no se pueden atribuir únicamente a la fuente cárnica.

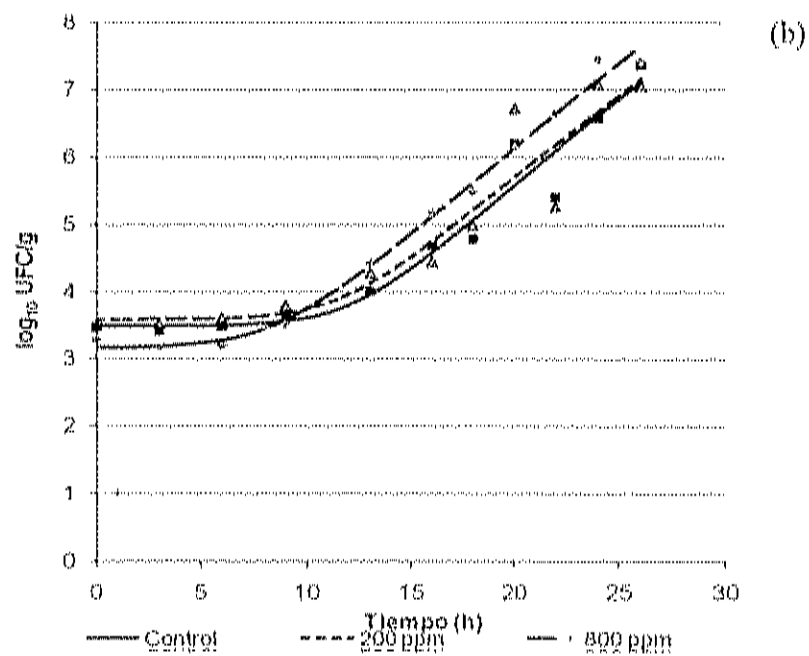
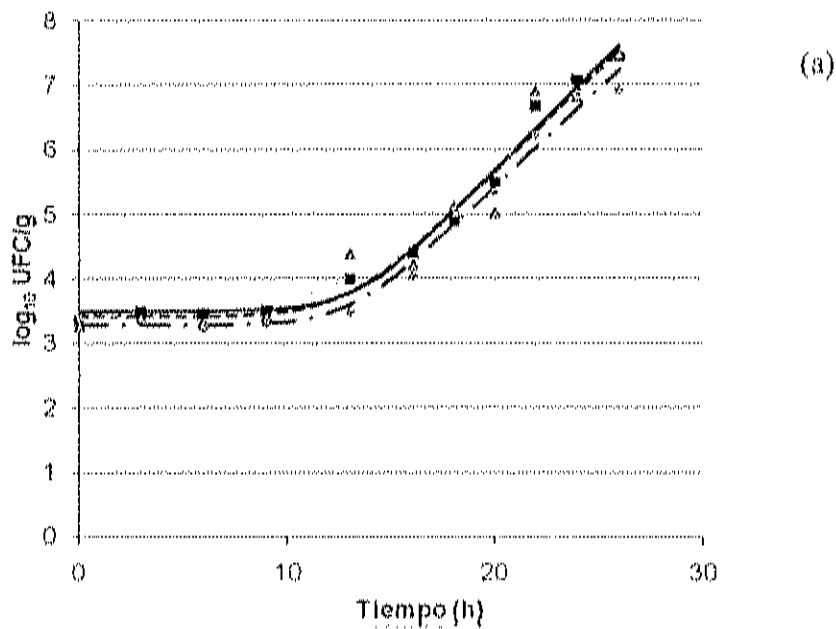


Figura 3. Curvas de crecimiento de *Clostridium perfringens* en carne de cerdo con salsa verde, almacenado a 25°C. Con la aplicación de 2kGy de irradiación gamma (a) ó 0 kGy (b); suplementados con 0 (■), 200(▲) y 800(◆) ppm de Citrucidal®. La regresión no lineal con el modelo de Baranyi se muestra con las líneas continuas.

Efecto en las Constantes de Crecimiento

La duración de la fase lag y la raíz cuadrada de la velocidad de crecimiento calculadas con el modelo de Baranyi se muestran en la tabla 4. En las muestras almacenadas a 15°C la interacción de la aplicación de irradiación gamma y Citrucidal[®] resultó en una disminución significativa ($p < 0.05$) en la duración de la fase lag. Sin embargo, los tratamientos antimicrobianos no tuvieron ningún efecto sobre la raíz cuadrada de la velocidad de crecimiento ($p > 0.05$). La duración de la fase lag disminuye significativamente ($p < 0.05$) de 721.05 (0kGy) a 633 horas (2kGy), como resultado de la aplicación de irradiación gamma. En los tratamientos con 200 ppm de Citrucidal[®], la aplicación de 2 kGy de irradiación gamma se tradujo en un incremento significativo ($p < 0.05$) de la fase lag de 357 a 520.55 horas en las muestras con 200ppm-0kGy y 200ppm-2kGy, respectivamente.

Los resultados de la duración de la fase lag a una temperatura de almacenamiento de 15°C, indican que la aplicación combinada de los tratamientos antimicrobianos resulta en un acortamiento de este parámetro de crecimiento. Sin embargo, la combinación de 200ppm y 2kGy de irradiación gamma hacen que este acortamiento sea menos drástico comparando con la adición de 200ppm del antimicrobiano. Debido a que la adición de 800ppm de Citrucidal[®], inhibió el crecimiento de *C. perfringens* a esta temperatura de

almacenamiento podemos pensar que existe una concentración óptima para la adición de este antimicrobiano, en el producto de carne de cerdo con salsa verde.

Independientemente del tratamiento antimicrobiano aplicado, la fase lag obtenida en este trabajo es considerablemente mayor que la reportada por Juneja y colaboradores (1999) en medio de cultivo (154.75 horas). Valores similares a este último fueron reportados en carne de res envasada al vacío almacenada a 15°C (122.56 horas) y en carne de res con 0.3% de pirofosfato de sodio, también envasada al vacío (200.52 horas) (Juneja et al., 1994; Juneja y Majka, 1995). Sin la aplicación de los tratamientos antimicrobianos, la fase lag calculada es de 721 horas en carne de cerdo con salsa verde, lo cual indica que *C. perfringens* tarda más tiempo en adaptarse a esta matriz alimentaria. Hecho que posiblemente se deba a que la salsa impide el acceso a los aminoácidos de la carne que el patógeno requiere para crecer.

Las constantes de crecimiento calculadas para el almacenamiento a 25°C también se presentan en la tabla 4. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la duración de la fase lag y la raíz cuadrada de la velocidad de crecimiento como resultado de los tratamientos antimicrobianos. La fase lag promedio es de 12.22 horas y la raíz cuadrada de la velocidad de crecimiento de 0.552. Juneja y colaboradores (1999) reportan una fase lag de 7.059 horas a 25°C en medio de cultivo, utilizando la ecuación logística. Con la ecuación de Gompertz se reportó una fase lag de 12.83 horas en carne de res envasada al

vacio con 0.3% de pirofosfato de sodio a 28°C (Juneja y Majka, 1995). Las diferencias en la duración de la fase lag, pueden ser atribuidas a la distinta disponibilidad de los nutrientes que requiere *C. perfringens*. Ya que en medio de cultivo éstos se encuentran en gran cantidad y de forma tal que puedan asimilarse rápidamente, contrariamente a lo que sucede en los productos alimenticios.

Tabla 4. Parámetros de crecimiento* de *Clostridium perfringens* en carne de cerdo con salsa verde, suplementados con 0, 200 y 800 ppm de Citrucidal[®] además de 0 y 2 kGy de irradiación gamma; calculados con el modelo de Baranyi.

Temp °C	Citrucidal [®]	0 kGy		2 kGy	
		Duración de la fase lag (h)	Raíz cuadrada de la velocidad de crecimiento	Duración de la fase lag (h)	Raíz cuadrada de la velocidad de crecimiento
15	0 ppm	721.05±9.35 ^a	0.060±0.02	633.0±9.35 ^c	0.053±0.02
15	200 ppm	357.0±9.35 ^b	0.066±0.02	520.55±9.35 ^d	0.074±0.02
15	800 ppm	ND	ND	ND	ND
25	0 ppm	13.205±1.16	0.554±0.02	13.93±1.16	0.602±0.02
25	200 ppm	11.792±1.16	0.517±0.02	12.89±1.16	0.562±0.02
25	800 ppm	8.802±1.16	0.519±0.02	12.725±1.16	0.562±0.02

* Promedio ± Error estándar

^{a,b,c,d} Diferente letra en la columna indica diferencia significativa (p<0.05)

ND no determinado

Abuso Estático de la Temperatura de Almacenamiento

Con el objeto de simular las condiciones que pueden ocurrir durante la distribución de los productos *sous vide*, se evaluó el efecto del abuso estático de temperaturas en el crecimiento de *C. perfringens* en carne de cerdo con salsa verde. Mediante la transferencia de muestras almacenadas a 4°C, en el día de muestreo programado, a 25°C por 13 y 15 horas. No se encontraron cambios estadísticos debido al tiempo de almacenamiento a 4°C ($p > 0.05$). Razón por la cual, en la tabla 5 solo se presentan los incrementos en el crecimiento del microorganismo agrupados en los tratamientos antimicrobianos y condiciones de abuso de temperaturas (promedio de 7 días de muestreo). No se encontraron diferencias significativas en el incremento de la población de *C. perfringens* como resultado de la aplicación de irradiación gamma y Citrucidal® en las muestras sometidas a 15 horas de abuso a 25°C ($p > 0.05$). Sin embargo, en aquellas con 13 horas de abuso a la misma temperatura, se observó una reducción de 0.69 \log_{10} UFC/g ($p < 0.05$) en el cambio acumulativo del crecimiento del patógeno, como resultado de la interacción de 2 kGy de irradiación gamma y 200 ppm de Citrucidal®. De la misma forma la adición de 800 ppm del antimicrobiano resultó en una reducción de 0.802 \log_{10} UFC/g ($p < 0.05$) del incremento de la población del microorganismo.

Tabla 5. Cambio acumulativo del crecimiento de *Clostridium perfringens* en carne de cerdo con salsa verde*, durante el abuso estático de temperaturas de almacenamiento por 15 y 13 horas a 25 °C. Suplementados con 0, 200 y 800 ppm de Citrucidal[®] además de 0 y 2 kGy de irradiación gamma.

Citrucidal [®]	13 horas a 25°C		15 horas a 25°C	
	0 kGy	2 kGy	0 kGy	2 kGy
0 ppm	1.554±0.13 ^a	0.062±0.15 ^b	1.192±0.19 ^{ab}	1.032±0.19 ^{ab}
200 ppm	1.327±0.13 ^a	0.631±0.15 ^c	0.752±0.19 ^a	0.915±0.19 ^{ab}
800 ppm	0.752±0.13 ^c	0.280±0.15 ^{bc}	1.553±0.19 ^b	0.735±0.19 ^a

*Promedio ± Desviación estándar

Datos expresados en log₁₀ UFC/g

^{a,b,c}Diferente literal dentro de las columnas indica diferencia significativa

(p<0.05)

En carne molida de res envasada al vacío y almacenada a 4°C, se reporta que durante el abuso por 15 horas a 28°C no hay crecimiento de *C. perfringens*, sin embargo al aumentar el tiempo de exposición hasta 20 horas hay un incremento de 4 log₁₀ UFC/g. La adición de 3% de sal inhibió el crecimiento de este patógeno durante el abuso por 20 horas a 28°C (Juneja y Majka, 1995). En el presente trabajo, la fase lag para el almacenamiento a 25°C es de aproximadamente 12 horas, por lo que durante el abuso por 15 horas el microorganismo se encuentra en su fase de crecimiento exponencial y pudiera deberse a este hecho la ineffectividad de los tratamientos antimicrobianos para controlar el crecimiento del patógeno. Por otro lado en el abuso por 13 horas *C. perfringens* está más cerca de la fase de adaptación (lag) razón por la cual la aplicación de los tratamientos antimicrobianos tiene un efecto significativo. Esto concuerda con lo presentado en la tabla 4, en donde solo se observan cambios en la duración de la fase lag y no en la velocidad de crecimiento. La aplicación de los tratamientos antimicrobianos (Citrucidal® e irradiación gamma) sólo tiene efecto durante la fase lag y no en la fase de crecimiento exponencial de *C. perfringens* inoculado en carne de cerdo con salsa verde.

Inactivación Térmica

La figura 4 muestra la resistencia térmica de células vegetativas de *C. perfringens* en carne de cerdo con salsa verde a 60°C. No se observó una fase de latencia durante el proceso de inactivación térmica. En las muestras sin Citrucidal[®], la población del patógeno disminuyó en 5.06 log₁₀ UFC/g después de 60 minutos de tratamiento térmico. En las que se agregaron 200 y 800 ppm del antimicrobiano se obtuvieron reducciones de 4.14 y 4.29 log₁₀ UFC/g, respectivamente. Aunque el número de sobrevivientes es menor con la adición del antimicrobiano, para valorar el efecto de éste en el proceso térmico es necesario evaluar la velocidad de muerte del patógeno, para lo cual haremos uso del cálculo del valor D. Este valor resultó en 12.53, 11.89 y 11.64 minutos para la adición de 0, 200 y 800 ppm de Citrucidal[®] respectivamente, valores que no fueron diferentes estadísticamente ($p > 0.05$).

Estos resultados son diferentes con lo observado en carne molida de res y pavo (Juneja y Marmer, 1998), ya que a 60°C reportaron valores D iguales a 5.3 y 4.2, respectivamente. Recientemente se reportó la resistencia térmica de células vegetativas de *C. perfringens* en un producto cárnico crudo a base de carne de cerdo con un valor D igual a 8.5 a 60°C (Byrne et al., 2006). Las diferencias encontradas en la resistencia térmica de *C. perfringens*, pueden ser atribuidas a la distinta complejidad de los productos alimenticios que repercute en la distribución del calor en ellos.

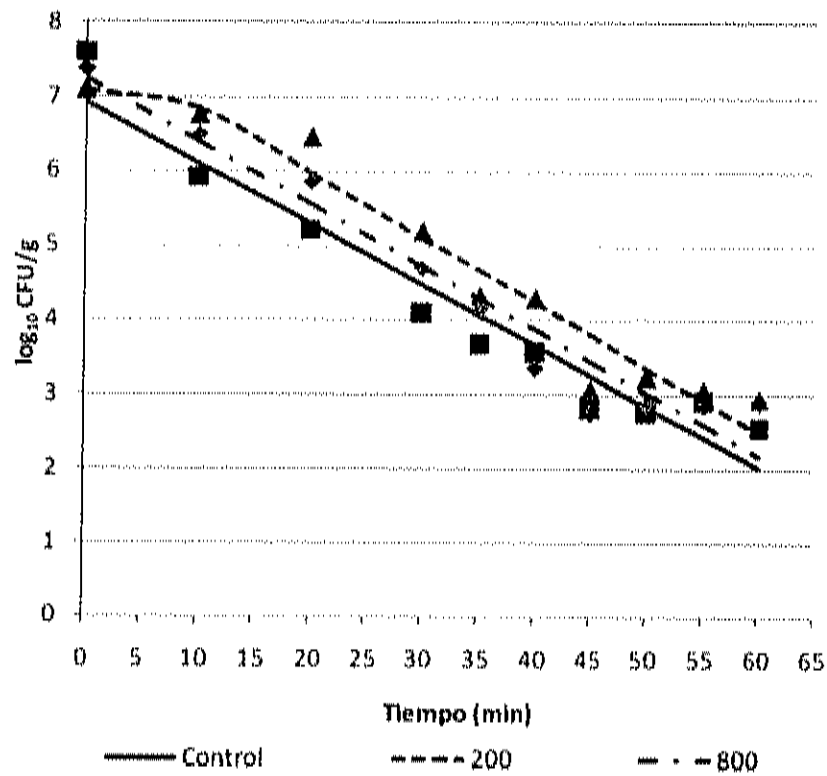


Figura 4. Inactivación térmica de *Clostridium perfringens* en carne de cerdo con salsa verde a 60°C. Suplementada con 0 (■), 200(▲) y 800(◆) ppm de Citrucidal[®]. La regresión no lineal se muestra con las líneas continuas.

Si bien, la adición de Citrucidal[®] no afectó la resistencia térmica de *C. perfringens* en carne de cerdo con salsa verde, el valor D calculado puede servir de ayuda para predecir el tiempo necesario para reducir un cierto número de log₁₀ UFC/g del patógeno, en este producto específicamente.

Análisis Fisicoquímicos

No se encontraron cambios significativos ($p > 0.05$) en la actividad de agua (A_w) del producto como resulta de la aplicación de irradiación gamma ni la adición de Citrucidal[®]. La A_w se mantuvo constante durante el almacenamiento a las diferentes temperaturas en un valor de 0.97 ($p > 0.05$). En la tabla 6, se presentan los cambios acumulativos en el pH del producto durante su almacenamiento a 4, 15 y 25°C. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) debido a la aplicación de irradiación gamma ni a la adición de Citrucidal[®], después de 26 horas de almacenamiento a 25°C. De la misma forma, no hubo cambios significativos ($p > 0.05$) en el incremento de pH al finalizar el almacenamiento a 15°C (45 días). Una reducción significativa ($p < 0.05$) en el cambio acumulativo de pH se encontró en las muestras almacenadas a 4°C por 28 días, como resultado de la adición de 200ppm de Citrucidal[®].

Tabla 6. Cambio acumulativo de las mediciones de pH* en carne de cerdo con salsa verde, durante el almacenamiento a 25, 15 y 4°C. Suplementados con 0, 200 y 800 ppm de Citrucidal[®] además de 0 y 2 kGy de irradiación gamma.

Citrucidal [®]	26 horas a 25 °C		45 días a 15°C		28 días a 4 °C	
	0 kGy	2 kGy	0 kGy	2 kGy	0 kGy	2 kGy
0 ppm	0.09±0.06	0.07±0.06	0.28±0.10	0.46±0.10	0.37±0.06 ^a	0.37±0.06 ^{cd}
200 ppm	0.15±0.06	0.02±0.06	0.24±0.10	0.15±0.10	0.25±0.06 ^{ab}	0.13±0.06 ^c
800 ppm	0.08±0.06	0.15±0.6	0.01±0.10	0.27±0.10	0.07±0.06 ^b	0.42±0.06 ^d

*Promedio ± Error estándar

^{a,b,c,d} Diferente literal dentro de la columna indica diferencia significativa (p<0.05)
pH (promedio días de muestreo) – pH (día 0)

CONCLUSIONES

Se encontró efecto de la combinación del extracto de toronja e irradiación gamma (200 ppm y 2kGy) en la duración de la fase lag de *Clostridium perfringens* en carne de cerdo con salsa verde. Los principales efectos antimicrobianos fueron resultado de la adición del Citrucidal[®]. Si el producto se almacena en refrigeración es posible inhibir el crecimiento del patógeno. La adición de 800 ppm de Citrucidal[®] pudo inhibir el desarrollo de *C. perfringens* si el abuso de temperaturas en el almacenamiento no supera los 15°C. Sin embargo, si dicha temperatura aumenta hasta 25°C, el microorganismo puede crecer hasta niveles peligrosos después de 20 horas, incluso con la presencia de Citrucidal[®] a los niveles adicionados. Si hay alguna sospecha de mal manejo del producto, se recomienda que sea recalentado antes de su consumo, por un tiempo mínimo de 72 minutos a 60°C para mantener la seguridad del consumidor.

REFERENCIAS

- Andersson, A.; Rönner, U.; Granum, P.; 1995. "What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?"; *International Journal of Food Microbiology* 28, 145-155.
- Barák, I.; Ricca, E.; Cutting, S.; 2005. "From fundamental studies of sporulation to applied spore research"; *Molecular Microbiology* 55 (2), 330–338.
- Baranyi, J. y Roberts, T.; 1994; "A dynamic approach to predicting bacterial growth in food"; *International Journal of Food Microbiology*, 23:277-294.
- Borch, E.; Arinder, P.; 2002; "Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures"; *Meat Science*, 62, 381-390.
- Bos, J.; Smithee, L.; McClane, B.; Distefano, R.; Uzal, F.; Songer, G.; Mallonee, S.; Crutcher, M.; 2005. "Fatal necrotizing colitis following a food borne outbreak of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* Type A infection", *Clinical Infection Diseases*, 40, 78-83.
- Byrne, B.; Dunne, G. y Bolton, D.; 2006; "Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll"; *Journal of Food Microbiology*, 23:803-808.
- Collee, J.G.; Knowlden, J.A.; Hobbs, B.C.; 1961; "Studies of the growth, sporulation and carriage of *Clostridium welchii* with special reference to food poisoning strains" in: *Dynamic computer simulation of Clostridium perfringens* growth in cooked ground beef, *International Journal of Food Microbiology* 87, 217-227.
- Creed, P. G.; Reeve, W.; 1998; "Principles and application of sous vide processed foods" in: *Development of a sous-vide packaging process for Korean seasoned beef*, *Food Control* 2006, (16) 285-291.
- Cvetnic, Z.; Vladimir, S.; 2004; "Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract", *Acta Pharm* (54), 243-250.
- Deok, J., Sun, L.; 2005. "Development of a sous-vide packaging process for Korean seasoned beef"; *Food Control*, 16 285-291.
- Diehl, J.; 1995; "Safety of irradiated foods" in: *Microbial safety of minimally processed foods*, CRC Press.

- Edwards, V.; Buck, R.; Shawcross, S.; Dawson, M.; Dunn, K.; 2004; "The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model", *Burns* 30 (8), 772-777.
- Farkas, J.; 2006; "Irradiation for better foods"; *Trends in Food Science and Technology*, 17:148-152.
- Federal Register; 1999; "Irradiation of Meat Food Products, Final Rule"; 246 (64).
- Fett, W. y Cooke, P.; 2003; "Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on laboratory-inoculated Alfalfa Seed with Commercial Citrus-Related Products"; *Journal of Food Protection*, 66(7):1158-1165.
- FDA, 2001; *Clostridium perfringens* in: "Bacteriological Analytical Manual on line", fecha de acceso: 13 de junio de 2006.
- FSIS; 1999; "Directive 7111.1, performance standards for the production of certain meat and poultry products"; United States Department of Agriculture; Federal Register.
- Fu, A.; Sebranek, J. y Murano, E.; 1995; "Survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* and Quality Attributes of Cooked and Cured Ham after Irradiation"; *Journal of Food Science*, 60 (5):1001-1008.
- Garcla, J; Labbé, R.; Rodriguez, M.; 1992; "Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A at 37 and 43°C"; *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (4), 1411-1414.
- Gaze, J.; 2005; "Microbiological aspects of thermally processed foods"; *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1381-1386.
- Gombas, D. y Gomez, R.; 1978; "Sensitization of *Clostridium perfringens* spores to heat by gamma irradiation"; *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 36(3):403-407.
- Grant, I. y Patterson, M.; 1991; "Effect of irradiation and modified atmosphere packaging on the microbiological safety of minced pork stored under temperature abuse conditions" *International Journal of Food Science and Technology*, 26:521-533.
- Grant, I. y Patterson, M.; 1992; "Sensitivity of foodborne pathogens to irradiation in the components of a chilled ready meal"; *Food Microbiology*, 9: 95-103.

- Huang, L.; 2003; "Estimation of growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef under fluctuating temperature conditions", *Food Microbiology*, 20, 549-559.
- James, S.; Evans, J.; 1992; "Consumer handling of chilled foods: temperature performance", in: The fate of *Clostridium perfringens* spores exposed to ozone and/or mild heat pretreatment on beef surfaces followed by modified atmosphere packaging, *Food Microbiology* 2004, 21, 667–673.
- Jay, J.; 2000; "Food poisoning caused by gram-positive sporeforming bacteria" in: *Modern Food Microbiology*, Aspen Publication, pag. 461.
- Jay, J.; 2000^b; "Food preservation with chemicals" in: *Modern Food Microbiology*, Aspen Publication, pag. 254.
- Jay, J.; 2000^c; "High-temperature food preservation and characteristics of thermophilic microorganisms" in: *Modern Food Microbiology*, Aspen Publication, pag. 341.
- Johnson, E.; 1990; "*Clostridium perfringens* food poisoning", in: Delayed *Clostridium perfringens* growth from a spore inocula by sodium lactate in sous-vide chicken products, *Food Microbiology* 2006, (23) 105–111.
- Juneja, V.; Call, J. y Miller, A.; 1993; "Evaluation of methylxanthines and related compounds to enhance *Clostridium perfringens* sporulation using a modified Duncan and Strong medium"; *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 2:203-218.
- Juneja, V.; Marmer, B. y Miller, A.; 1994; "Growth and sporulation of *Clostridium perfringens* in aerobic and vacuum-packaged cooked beef"; *Journal of Food Protection*, 57:393-398.
- Juneja, V. y Majka W.; 1995; "Outgrowth of *Clostridium perfringens* spores in cook-in-bag beef products"; *Journal of Food Safety*, 15:21-34.
- Juneja, V. y Marmer, S.; 1998; "Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* vegetative cells in ground beef and turkey as affected by sodium pyrophosphate"; *Journal of Food Microbiology*, 15:281-287.
- Juneja, V., Whiting, R., Marks, H. y Snyder, O.; 1999; "Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* at temperatures applicable to cooling of cooked meat"; *Journal of Food Microbiology*, 16:335-349.

- Juneja, V. K.; 2003; "Sous-vide processed foods: safety hazards and control of microbial risks" in: *Microbial Safety of Minimally Processed Foods*, CRC Press.
- Juneja, V.; Xueting, F.; Peña-Ramos, A.; Diaz, M.; Pacheco-Aguilar, R.; 2006. "The effect of grapefruit extract and temperature abuse on growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula in marinated, sous-vide chicken products"; *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7:100-106.
- Juneja, V., Huang, L. and Thippareddi, H.; 2006^b; "Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* in cooked cured pork"; *International Journal of Food Microbiology*, 110:85-92.
- Kamat, A.; Khare, S., Doctor, T. y Nair, P.; 1997; "Control of *Yersinia enterocolitica* in raw pork and pork products by irradiation"; *International Journal of Food Microbiology*, 36:69-76.
- Kannat, S.; Chander, R. y Sharma, A.; 2005; "Effect of radiation processing on the quality of chilled meat products"; *Meat Science*, 69:269–275.
- Kaur, C. y Kapoor, H.; 2001; "Antioxidants in fruits and vegetables the millennium health"; *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703-725.
- Lebepe, S.; Molins, R.; Chroen, H.; Farrar H. Y Skowronski, R.; 1990; "Changes in Microflora and Other Characteristics of vacuum-packaged Pork Loins Irradiated at 3.0 kGy"; *Journal of Food Science*, 55(4):918-924.
- Leistner, L.; 2000; "Basic aspects of food preservation by hurdle technologie"; *International Journal of Food Microbiology*, 55:181-186.
- Luckman, G.; 2002; "Food irradiation: regulatory aspects in the Asia and Pacific region"; *Radiation Physics and Chemistry*, 63:285-288.
- Luque, B.; 2001; "Desarrollo y enlatado de carne con chile y barbacoa de avestruz"; Tesis de Licenciatura, CIAD, A. C.; Hermosillo, Son. , Mex.
- Mahapatra, A.; Muthukumarappan, K. y Julso, J.; 2005; "Applications of Ozone, Bacteriocins and Irradiation in Food Processing: A Review"; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:447–461.
- Mañas, P.; Pagán, R.; 2005; "Microbial inactivation by new technologies of food preservation"; *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1387–1399.

- Mata, V.; 1993. "Efecto de Citrucidal[®], Cloro y Bentolate en el crecimiento de *Vibrio cholerae* in vitro", Tesis de Licenciatura, UNISON, Sonora, Mex.
- Mead, P.; et al.; 1999; "Food-related illness and death in the United States", Emerging Infectology Disease, (5) 607-625, in: Microbial Safety of Minimally Processed Foods, CRC Press.
- Moir, A.; Corfe, B.; Behravan, J.; 2002; "Spore germination", CMLS Cellular and Molecular Life Sciences 59, 402-409.
- National Food Processors Association; 1988; "Safety considerations for new generation refrigerated foods"; Dairy and Food Sanit., 8:5-7.
- Nanke, K.; Sebranek, J.; Olson, D.; 1998; "Color characteristics of Irradiated vacuum-packaged pork, beef and turkey"; Journal of Food Science, 63 (6):1001-1006.
- Neyssen, P.; 2000; "Practical implications of developments in legislations on food irradiation in the European Union"; Radiation Physics and Chemistry, 57:215-217.
- Niemira, B.; 2000; "Irradiation of fresh and minimally processed fruits, vegetables and juices" in: Microbial safety of minimally processed foods, CRC Press.
- Novak, J. y Juneja, V.; 2002; "*Clostridium perfringens*: hazards in new generation foods", Innovative Food Science and Emerging Technologies, 3 127-132.
- Oliveira, L.; 2000; "Present situation of food irradiation in South America and the regulatory perspectives for Brazil"; Radiation Physics and Chemistry, 57:249-252.
- Pflug, I. y Gould, G.; 2000; "Heat treatment" en: Microbiological Safety and Quality of Foods, Springer, pag. 37
- Phillips, C.; 1996; "Review: Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce"; International Journal of Food Science and Technology, 31, 463-479.
- Reagor, B.; Gusman, J.; McCoy, L.; Carino, E.; Heggors, J.; 2002. "The Effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: I. An In vitro agar assay", The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 8 (3) 325-332.
- Rodehamel, J. y Harmon, S.; 1998; "*Clostridium perfringens*"; en: Microbial Safety of Minimally Processed Foods, CRC Press.
- Rood, J. y Cole, S.; 1991; "Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*"; Microbiological Reviews, 55(4):621-648.

- Sabah, J.; Tippareddi, H.; Marsden, J.; Fung, D.; 2003; "Use of organic acids for the control of *Clostridium perfringens* in cooked vacuum-packaged restructured roast beef during an alternative cooling procedure", *Journal of Food Protection*, 66(8): 1408-1412.
- Sabah, J.; Juneja, V.; Fung, D.; 2004; "Effect of spices and organic acids on the growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked ground beef", *Journal of Food Protection*, 67 (9), 1840-1847.
- Satin, M.; 2002; "Use of irradiation for microbial decontamination of meat: situation and perspectives"; *Meat Science*, 62:277–283.
- Schellekens, M.; 1996; "New research sous-vide issues in cooking"; *Trends in Food Science and Technology*, 7:256-262.
- Setlow, P.; 2003; "Spore germination"; *Current Opinion in Microbiology*, 6:550–556.
- Shamsuzzaman, K.; Lucht, L.; Chuaqui-Offermans, N.; 1995; "Effects of combined electron-beam irradiation and sous-vide treatments on microbiological and other qualities of chicken breast meat"; *Journal of Food Protection*, 58:497-501.
- Sommers, C. y Boyd, G.; 2006; "Variations in the radiation sensitivity of foodborne pathogens associated with complex ready-to-eat food products"; *Radiation Physics and Chemistry*, 75:773-778.
- Steele, F. M. and Wright, K.H.; 2001; "Cooling rate effect on outgrowth of *Clostridium perfringens* in cooked, ready-to-eat turkey breast roasts"; *Poultry Science*, 6:813-816.
- Subba, M.; Soumithri, T. y Suryanarayana, R.; 1967; "Antimicrobial action of citrus oils"; *Journal of Food Science*, 32:225-227.
- Taormina, P.; Bartholomew, G.; Dorsa, W.; 2003; "Incidence of *Clostridium perfringens* in commercially produced cured raw meat product mixtures and behavior in cooked products during chilling and refrigerated storage", *Journal of Food Protection*, 66 (1), 72-81.
- Taormina, P.; Dorsa, W.; 2004; "Growth potential of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked meats"; *Journal of Food Protection*, 67 (7):1537-1547.
- Thayer, D.; Boyd, G.; y Jenkins, R.; 1993; "Low-dose Gamma Irradiation and Refrigerated Storage in vacuum Affect Microbial Flora of Fresh Pork"; *Journal of Food Science*, 58 (4):717-719.
- Thippareddi, H.; Juneja, V. K.; Phebus, R. K.; Marsden, J. L.; Klastner, C.; 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 (3):376-381.

Torres, A.; 2006. "Inactivación térmica de *Listeria monocytogenes* en carne con chile y cerdo en salsa verde empacado al vacío (sous vide)", Tesis de Licenciatura, Universidad de Sonora, Mex.

Woedtke, T.; Schluter, B.; Pflugel, P.; Lindequist, U.; Julich, WD.; 1998; "Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained", *Journal of Food Protection*, 61(3):272-275.