

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE CORTES BOVINOS
ENVASADOS AL VACÍO Y MANTENIDOS A TEMPERATURA DE
REFRIGERACIÓN**

por

**Víctor Leonardo DELGADO PONTET
Leonardo QUARTINO CARRASCO**

**TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección - Control
y Tecnología de los Alimentos de Origen
Animal**

MODALIDAD ESTUDIO DE CASO

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2013**

PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. Jorge Fernández

Segundo Miembro (Tutor):

Dra. Cristina López

Tercer Miembro:

Dr. Pablo Formento

Fecha:

12 de Diciembre 2013

Autores:

Victor Leonardo Delgado Pontet

Leonardo Quartino Carrasco

AGRADECIMIENTOS

A Jorge González y Luis Castro por su colaboración.

A Ariel Aldrovandi por su valioso tiempo y conocimientos.

A nuestra tutora Cristina López por la paciencia y las horas de su tiempo.

Y a nuestras familias por el apoyo de siempre.

TABLA DE CONTENIDO

	PÁGINA
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	5
1. RESUMEN.....	6
2. SUMMARY	7
3. INTRODUCCIÓN.....	8
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
4.1. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA CARNE	9
4.1.1. Aspectos económicos de la carne.	9
4.1.2. Valor nutricional de la carne	9
4.1.3. Factores que influyen en la calidad de la carne.....	13
4.2. CONVERSIÓN DEL MÚSCULO EN CARNE	14
4.3. MICROBIOLOGÍA DE LA CARNE.....	15
4.3.1. Factores que influyen en el desarrollo de los microorganismos en la carne.....	16
4.4. CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS A ESTUDIAR.....	18
4.4.1. Microorganismos aerobios mesófilos	18
4.4.2. Coliformes	19
4.4.3. Bacterias ácido lácticas	20
4.4.4. <i>Pseudomonas</i>	20
4.4.5. <i>Brochothrix thermosphacta</i>	21
4.5. LOS SISTEMAS DE ENVASADO.	21
5. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	25
6. OBJETIVOS	25
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	25
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1. MATERIA PRIMA	25
7.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	26
7.3. MEDIOS DE CULTIVO	26
7.3.1. Plate Count Agar	26
7.3.2. Violet Red Bile Lactose Agar	26
7.3.3. M.R.S.Agar	26
7.3.4. Cetrimide Agar.....	27
7.3.5. S.T.A.A Agar Base	27
8. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	27
9. VALORES DE REFERENCIA.....	28
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
11. RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
12. CONCLUSIONES.....	36
13. RECOMENDACIONES	36
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS	PÁGINA
Tabla 1: Composición química promedio del tejido muscular del bovino, libre de grasa subcutánea.	9
Tabla 2: Composición en aminoácidos de las carnes frescas en porcentajes de la proteína bruta.	11
Tabla 3: Medios de cultivo y utilidad de las bacterias estudiadas.	28
Tabla 4: Valores de referencia utilizados.	28
Tabla 5: Promedios de los recuentos de las bacterias estudiadas expresadas en log ufc/g.	29

FIGURAS	PÁGINA
Figura 1: Proceso de envasado al vacío.	22
Figura 2: Carne envasada al vacío en bolsa termorretráctil.	23
Figura 3: Análisis exploratorio de los datos: Box – plot que ilustra la distribución de conjuntos de datos para cada variable estudiada.	30
Figura 4: Grafica de datos promedio expresados en log para aerobios mesófilos con su correspondiente límite.	31
Figura 5: Grafica de datos promedios expresados en log para coliformes con su correspondiente límite.	32
Figura 6: Grafica de datos promedios expresados en log para <i>Pseudomonas</i> con su correspondiente límite.	33
Figura 7: Grafica de datos promedios de los recuentos obtenidos por <i>Brochothrix thermosphacta</i> y bacterias ácido lácticas, expresados en log, donde se observa la relación de crecimiento.	34

1. RESUMEN

El presente estudio de caso tuvo como objetivo general generar un estudio que cuantifique la calidad microbiológica de cortes vacunos enfriados y envasados al vacío. Se emplearon para tal fin 90 muestras del corte *Longissimus dorsi* (Bife angosto), proporcionado por un planta de faena y desosado habilitada por el MGAP para mercado interno y exportación. Las mismas fueron elegidas al azar, envasadas al vacío en bolsas de reducida permeabilidad al O₂ y en condiciones de refrigeración a 0-1°C.

Dichas muestras se sometieron a análisis microbiológicos que fueron realizados en el Laboratorio del Área Microbiología de Alimentos, Departamento de Calidad Agroalimentaria del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, con el fin de determinar el desarrollo de los siguientes microorganismos: aerobios mesófilos, coliformes, bacterias ácido lácticas, *Pseudomonas*, y *Brochothrix thermosphacta*. Se realizaron análisis los días: 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 en muestras pareadas.

Se registraron valores mínimos o ausentes de los microorganismos indicadores y alterantes; que se mantuvieron sin cambios significativos hasta el día 75 aproximadamente. Hasta los 90 días todos los recuentos totales fueron inferiores a los límites (siendo los límites de aceptación 5,7 log ufc/g para aerobios mesófilos y 6 log ufc/g para *Pseudomonas*), observándose un marcado predominio de la flora láctica. A partir de los 90 días el crecimiento aumentó multiplicándose de manera significativa hasta el día 105 donde perdió las cualidades para ser apto para consumo.

Como conclusión los resultados de este estudio mostraron un posible período de aptitud de 90 a 105 días para la carne bovina envasada al vacío y mantenida bajo condiciones de refrigeración.

A partir del día 105 se obtuvieron recuentos, para los microorganismos estudiados, que sobrepasaron los límites establecidos. De acuerdo a la bibliografía consultada, esto indicaría una posible alteración desde el punto de vista microbiológico.

2. SUMMARY

The main objective of this case study was to generate a study to quantify the microbiological quality of chilled beef cuts and vacuum packed. Were used for this purpose ninety samples of the cut *Longissimus dorsi* (commonly referred to as the loin or the backstrap), provided by a slaughtering and deboning plant authorized by the MGAP to domestic market and export. Samples were randomly selected, vacuum packaged in bags of O₂ reduced permeability, and refrigerated at 0-1°C.

Samples were subjected to microbiological analyzes that were performed in the Laboratorio del Área Microbiología de Alimentos, Departamento de Calidad Agroalimentaria del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, in order to determine the development of the following organisms: aerobic mesophilic organisms, coliforms, lactic acid bacteria, *Pseudomonas* and *Brochothrix thermosphacta*. Analyses were performed the days 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 120 in paired samples.

There were minimal or absent values of indicators and spoilage microorganisms; that were maintained without significant changes until approximately 75 days. Until 90 days all total counts were below the limits (acceptance limits being 5,7 log ufc/g for aerobic mesophilic and 6 log ufc/g for *Pseudomonas*), and revealed a marked predominance of lactic flora. After 90 days growth increased multiplying significantly until day 105 where it lost the qualities needed to be suitable for consumption.

In conclusión the results of this study showed a posible period of suitability from 90 to 105 days of meat chilled, vaccum packed and held under refrigeration.

From day 105 counts obtained for studied microorganisms exceeded the limits. According to the literature, this would indicate a possible alteration from a microbiological point of view.

3. INTRODUCCIÓN

El hombre ha empleado durante muchos siglos los tejidos animales como alimento, sin prestar demasiada atención ni a sus funciones vitales, ni a los cambios que en ellos suceden antes de ser consumidos. Sin embargo, con la llegada de técnicas de producción masiva, como las que utiliza en la actualidad la industria cárnica, ha aumentado la búsqueda de métodos que controlen la calidad y la uniformidad del producto final. Esto ha llevado a investigar las causas de variación de calidad de la carne con miras a su mejora.

En la actualidad existe una tendencia creciente por los consumidores a preferir aquellos alimentos percibidos como frescos y de los productores hacia una centralización de la distribución.

La vida útil de los alimentos, tal como los cortes vacunos frescos, puede definirse como el tiempo máximo en el que los mismos mantienen sus cualidades nutricionales, sensoriales, microbiológicas y de inocuidad alimentaria por encima de un nivel considerado como aceptable por los consumidores (Masana y col., 2002).

El conocimiento de los mecanismos que producen la pérdida de la aceptabilidad permite plantear estrategias para extender la vida útil que no afecten las características nutricionales y sensoriales del alimento. En el caso de las carnes vacunas frescas es sabido que las causas microbiológicas están en primer lugar dadas sus condiciones óptimas en nutrientes y las pocas barreras naturales que las mismas poseen para el desarrollo de una gran variedad de microorganismos. De acuerdo a Masana y col. (2002) en forma general los cortes vacunos son rechazados por los consumidores cuando su carga microbiana supera un umbral de 10^7 microorganismos por gramo debido a los productos que el metabolismo bacteriano genera.

Es por lo expuesto que se entiende que haya una relación directa entre la vida útil y el número y tipo de microorganismos presentes en el momento inicial de la producción del corte vacuno.

Desde hace un tiempo, han surgido distintas alternativas para la extensión de la vida útil de los cortes frescos vacunos, sin producir cambios sensoriales notables en el producto por ejemplo a través de variantes de su envasado (envasado al vacío). Este sistema busca dificultar el desarrollo de aquellos microorganismos que más rápidamente deterioran los cortes vacunos.

Considerando estos aspectos, nuestro presente trabajo está motivado a conocer la calidad microbiológica de cortes vacunos (*Longissimus dorsi*) refrigerados y envasados al vacío de una planta de faena y desosado, mediante la detección y cuantificación de microorganismos indicadores y alterantes.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA CARNE

4.1.1. Aspectos económicos de la carne

Nuestro país, además de ser uno de los principales productores cárnicos del mundo, es el primer país del mundo en consumo de carne vacuna, con 60 kilos por persona por año (INAC, 2013).

Produce cerca de 580 mil toneladas de carne vacuna al año, 180 mil para el consumo interno y 400 mil se distribuyen por el mundo.

Esta carne se exporta a más de 100 países y representa la cuarta parte de las exportaciones de bienes del Uruguay.

Uruguay ha diseñado los mejores sistemas de información ganadera del mundo, contribuyendo a mejorar las condiciones de exportación: la Trazabilidad y el Sistema Electrónico de Información de la Industria Cárnica (S.E.I.I.C.).

Estos logros sumados al status sanitarios alcanzado por Uruguay y la calidad del producto han potenciado a la carne uruguaya en los mercados exigentes.

4.1.2. Valor Nutricional de la Carne

Según Price y Schweigert (1976) la carne es una fuente excelente de proteínas de alta calidad, de vitaminas del complejo B y de ciertos minerales, sobre todo de hierro. Además de ser fácilmente digestible, la carne magra aporta nutrientes que contribuyen significativamente al equilibrio dietético. Además, el contenido en aminoácidos de la proteína aportada compensa las deficiencias que existen comúnmente en las proteínas vegetales y en los productos cereales.

Tabla 1. *Composición química promedio del tejido muscular del bovino, libre de grasa subcutánea. Extraído de Fenemma (1996)*

Componente	Proporción
Agua	65-80 %
Proteínas	16-22 %
Carbohidratos	0,5-1,5%
Lípidos	1,5-13 %
Sales minerales	1 %

La composición del músculo magro procedentes de diferentes especies animales es relativamente constante en lo que respecta a la proteína, grasa minerales y el contenido acuoso, independientemente del grado de cebamiento del animal. Sin

embargo, las diferentes piezas de carne utilizadas varían en la cantidad de grasa externa y de grasa inter e intramuscular.

4.1.2.1. **Proteínas/Aminoácidos**

La proteína del músculo bovino es de alto valor nutritivo para el hombre, no solo por el contenido, sino también por su balance en aminoácidos esenciales y alta digestibilidad (Aberle y col., 2001).

Todas las proteínas están compuestas primariamente por aminoácidos, pero las proporciones en que se presentan los veinte o más aminoácidos comunes difieren considerablemente de una proteína a otra. Algunos aminoácidos son esenciales en la dieta, y tienen que ser aportados por el alimento, ya que no son sintetizados por el organismo.

La carne y la mayor parte de los restantes productos animales tienen porcentajes relativamente altos de nutrientes esenciales, en proporciones que cubren fácilmente las necesidades nutritivas. Se admite, por consiguiente, que sus proteínas son de buena o alta calidad (Price y Schweigert, 1976).

Estudios sobre la composición en aminoácidos esenciales y no esenciales de las carnes frescas, de las carnes curadas y procesadas y de las carnes y productos cárnicos enlatados, han permitido explicar el elevado valor biológico de la proteína de la carne, al comprobar que las cantidades relativas de los aminoácidos esenciales presentes en la proteína de la carne se corresponden bastante bien con las cantidades relativas necesitadas para mantener el balance nitrogenado del adulto.

En lo que respecta a los aminoácidos esenciales, la carne vacuna parece tener un contenido algo mayor en leucina, lisina y valina que la carne de cerdo y de cordero, y un menor contenido en treonina (Forrest y col., 1979).

Se ha indicado, que el contenido de arginina, valina, metionina, isoleucina y fenilalanina aumenta (respecto a las concentraciones relativas de otros aminoácidos) al aumentar la edad del animal. Además existen pruebas de que el contenido en determinadas aminoácidos esenciales puede variar en diferentes partes de la canal.

El procesamiento de la carne afecta el contenido en aminoácidos, aunque a menos que las condiciones del procesamiento sean simultáneamente severas y prolongadas la destrucción que causan es mínima. Bastante más importante es la posibilidad de que ciertos aminoácidos dejen de estar disponibles.

Tabla 2. *Composición en aminoácidos de las carnes frescas en % de la proteína bruta. Extraído de Lawrie (1977)*

Aminoácido	Clase	Carne vacuna
Isoleucina	Esencial	5,1
Leucina	Esencial	8,4
Lisina	Esencial	8,4
Metionina	Esencial	2,3
Cistina	Esencial	1,4
Fenilalanina	Esencial	4,0
Treonina	Esencial	4,0
Triptófano	Esencial	1,1
Valina	Esencial	5,7
Arginina	Esencial (niños)	6,6
Histidina	Esencial (niños)	2,9
Alanina	No esencial	6,4
Ácido aspártico	No esencial	8,8
Ácido glutámico	No esencial	14,4
Glicina	No esencial	7,1
Prolina	No esencial	5,4
Serina	No esencial	3,8
Tirosina	No esencial	3,2

4.1.2.2. Lípidos

La carne posee numerosos lípidos, algunos de ellos desempeñan importantes papeles activos en el metabolismo, como los ácidos grasos esenciales, colesterol, los fosfolípidos y las vitaminas liposolubles. Otros, fundamentalmente los ésteres de los ácidos grasos, son menos activos metabólicamente pero constituyen una reserva de energía y protegen a los órganos. Las grasas, o ésteres del glicerol y de los ácidos grasos, son los lípidos más abundantes, ya que suponen más del 95% de los lípidos totales del organismo. Desde el punto de vista nutritivo los componentes lipídicos más importantes son: los triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y vitaminas liposolubles (Price y Schweigert, 1976).

La composición lipídica de la carne se puede dividir en lípidos del tejido muscular y los propios del tejido adiposo. Los primeros se depositan en dos compartimentos diferentes. Algunos lípidos lo hacen dentro de la fibra muscular (intracelulares), pero la mayoría se localiza en el tejido adiposo asociado a los septos de tejido conectivo laxo que se encuentra entre los haces musculares; este último tipo de depósito graso se le conoce como veteado, marmoleo o "marbling". El conjunto de ambos compartimentos constituye la grasa intramuscular. En general se considera que los lípidos del músculo (grasa intramuscular) tienen un grado superior de insaturación que los del tejido adiposo (Piironen y col., 2002).

Por otra parte la oxidación de los ácidos grasos altamente insaturados que se encuentran en la membrana de la fibra muscular puede ser muy importante en algunas de las reacciones de deterioro de la carne. (Fenemma, 1996) Morrissey y col. (1998), afirman que al incrementarse el grado de insaturación de estos lípidos musculares se reduce su estabilidad oxidativa.

Desde el punto de vista cuantitativo el contenido total en grasa de la canal varía dependiendo del tipo de alimentación del animal. La grasa corporal de los rumiantes tiene una composición bastante constante debido en parte a que consumen dietas pobres en grasa. Como es sabido una dieta alta en grasa se considera indeseable, principalmente por su vínculo con el colesterol y su asociación con enfermedades cardiovasculares (Warris, 2000).

4.1.2.3. **Carbohidratos**

La mayor parte de los cortes de carne constituyen fuentes pobres de carbohidratos. Estos suponen menos del 1% del peso de la carne, la mayoría de los cuales la componen el glucógeno y el ácido láctico. La mayoría de los carbohidratos del organismo animal se presentan en el hígado, ya que constituye el lugar principal donde se almacena el glucógeno.

Los tejidos animales contienen carbohidratos que se encuentran libres o formando parte de otros componentes; glucosa, fructuosa y ribosa, son azúcares presentes en la carne. Entre los polisacáridos de mayor importancia está el glucógeno el cual desempeña un papel muy importante en los cambios bioquímicos postmortem.

4.1.2.4. **Vitaminas**

La carne es una excelente fuente de vitaminas hidrosolubles del complejo B, pero es pobre en vitamina C, también hidrosoluble, mientras que las vitaminas liposolubles A, D, E y K están principalmente en la grasa del organismo. En la carne se encuentran todas las vitaminas del complejo B, siendo las más abundantes la tiamina, B1, la riboflavina y la niacina.

La cantidad de cada una de las diversas vitaminas que contiene una pieza de carne depende de la especie (y en cierto grado de la raza), la edad, el grado de cebamiento y el tipo de alimentación del alimento de que procede, así como también de la situación del corte en la canal. El cebamiento también afecta el contenido de vitamina B que, por ser hidrosoluble, se encuentran principalmente en las porciones magras de la carne (Price y Schweigert, 1976).

Las carnes cocinadas frecuentemente contienen más vitaminas por unidad de peso que las crudas debido a la pérdida de humedad, efecto notable en los casos de la niacina y la B2, pero no con la B1 y la B6 que son termolábiles, pues algo de éstas se destruye durante la cocción.

La mayor parte de las vitaminas que contiene la carne son relativamente estables a los procedimientos de procesado y de tratamiento culinario, aunque puede perderse una cantidad sustancial con el caldo o jugo.

4.1.2.5. **Minerales**

La carne es rica en hierro, cobre, zinc y selenio. El hierro en la carne tiene alta biodisponibilidad por lo tanto la carne se considera una fuente inestimable de este mineral en la dieta humana (Pearson y Gillet, 1999). Este mineral se encuentra asociado a la proteína mioglobina la cual es la que provee oxígeno y le da color al tejido muscular rojo. Con respecto a los demás minerales, la carne presenta valores relativamente bajos de calcio (con aproximadamente 100 mg/ 100 g) y contiene generalmente 60 a 90 mg de sodio y 300 mg de potasio/100 g de carne fresca.

Una característica general del contenido mineral de la carne es su incremento durante el cocinado debido fundamentalmente a la pérdida de humedad del producto. En lo que refiere a las diferencias de especie destaca el elevado contenido en hierro de la carne vacuna respecto a la de cordero o cerdo, que sin duda es un reflejo de la mayor concentración de mioglobina en la primera especie. Sin embargo, en las tres especies citadas la concentración de hierro es claramente mayor en el hígado que en tejido muscular.

El procesado no reduce el contenido mineral de la carne a no ser que se produzcan pérdidas de jugo. No obstante, a muchas carnes procesadas se añade sal o agentes de curado, que afectan considerablemente al contenido en sodio.

Los componentes minerales están principalmente asociados a las fracciones acuosa y proteica de la carne. Por esta razón los cortes magros, o las porciones magras de un corte, son más ricos en minerales que los tejidos grasos.

La carne también posee cantidades vestigiales de varios otros componentes minerales como aluminio, cobalto, cobre, manganeso y zinc. Algunos de estos minerales tienen importancia nutritiva, pero no se han establecido las relaciones cuantitativas entre el contenido de los alimentos en dichos minerales y las necesidades dietéticas.

4.1.3. **Factores que influyen en la calidad de la carne**

Según Hoffman (1994), la calidad de la carne se podría definir como “la suma de todas las propiedades sensoriales, nutricionales, higiénicas, toxicológicas y tecnológicas de la carne”.

En tanto Wood (1990), la define como el conjunto de características logradas durante la producción y procesamiento que permiten brindar al comprador un producto diferenciado a fin de que pueda escoger el que llene sus expectativas.

La calidad de la canal bovina y de su carne puede variar por diversos factores, los que se pueden subdividir en aquellos que son dependientes del animal o propios (intrínsecos) y por otra parte en aquellos que dependen del ambiente en que son mantenidos (extrínsecos) inmediatamente antes, durante y después del sacrificio. Existen una serie de componentes de la calidad de la carne, que incluyen: rendimiento y composición, apariencia y características tecnológicas, palatabilidad, sanidad y otros componentes referidos al trato que reciben los animales antes del sacrificio. Estos componentes serán más o menos importantes dependiendo de la percepción del individuo y del lugar que éste ocupe dentro de la cadena de producción y consumo de la carne.

4.2. CONVERSIÓN DEL MÚSCULO EN CARNE

Como ya fue mencionado existe un número realmente grande de variantes que influyen en la calidad de la carne debidas a los cambios que aparecen después del sacrificio del animal.

El músculo no se convierte en carne repentinamente al detenerse sus funciones. Esta conversión implica una serie de cambios continuos en el metabolismo de las células musculares así como en la estructura de sus proteínas, que se producen en un periodo de varias horas o aun de días.

En este proceso, la homeostasis (definida por Forrest y col. (1979) como la conservación de un ambiente interno fisiológicamente equilibrado) tiene un enorme interés por dos razones: muchas de las reacciones y cambios que se producen durante esta conversión son consecuencia directa de la homeostasia. La segunda razón es que las condiciones del período inmediatamente anterior al sacrificio pueden modificar los cambios musculares postmortem y afectar a la calidad de la carne.

El descenso del pH muscular a consecuencia de la acumulación de ácido láctico es uno de los cambios postmortem más significativos que suceden en el músculo durante su conversión en carne.

En el animal vivo el ácido láctico originado en el metabolismo anaeróbico es transportado desde el musculo al hígado, donde se utiliza para la síntesis de glucosa y de glucógeno. Puesto que el animal degollado no dispone de sistema circulatorio, el ácido láctico permanece en el musculo, aumentando su concentración a medida que prosigue el metabolismo.

El acúmulo de ácido láctico en las primeras fases del periodo postmortem puede tener un efecto negativo en la calidad de la carne. El desarrollo de condiciones ácidas en el musculo (pH bajo), antes que el calor corporal natural y el metabólico se hayan disipado durante la refrigeración de la carne, da lugar a la desnaturalización de las proteínas musculares.

La desnaturalización de las proteínas les hace perder solubilidad, capacidad de retención de agua e intensidad del color del pigmento muscular.

Otros de los cambios postmortem que suceden durante la conversión del musculo en carne es el fenómeno del rigor mortis. La rigidez de los músculos después de la muerte se debe a la formación de enlaces cruzados permanentes entre los filamentos de actina y miosina de músculo. La diferencia entre el estado vivo y el rigor mortis es que en el último la relajación es imposible, ya que no se dispone de energía para separar la actomiosina.

La pérdida de la protección frente a la invasión bacteriana es otro de los fenómenos postmortem. Según Forrest y col. (1979) durante el proceso de conversión del musculo en carne se alteran las propiedades de la membrana y el musculo se hace susceptible a la acción bacteriana, ya que no actúan los sistemas circulatorio y linfático, no pudiendo evitarse la difusión de los microorganismos.

La actividad enzimática dentro de los tejidos del músculo luego de la faena contribuye a cambios favorables, pero las modificaciones sensoriales observadas en

la descomposición son el resultado de la proliferación de los microorganismos y sus metabolitos (Carrillo y Audisio, 2007).

4.3. MICROBIOLOGÍA DE LA CARNE

La carne y los productos cárnicos son productos muy alterables, por lo que deben manejarse con especial cuidado durante todas las operaciones de procesado. La alteración se inicia pronto, como resultado de acciones microbianas, químicas y físicas. Si no se frenasen pronto estas acciones se convertiría la carne en un producto no apto para el consumo. Es necesario minimizar su deterioro para prolongar el tiempo durante el que la carne mantiene un nivel de calidad aceptable. Este tiempo que transcurre entre la producción/envasado del producto y el punto en el cual se vuelve inaceptable bajo determinadas condiciones ambientales Ellis (1994) citado por Hough (2010) lo define como vida útil del producto.

Las carnes son fácilmente alterables, sobre todo si están procesadas (ya sea picada o trozada) pues tienen un pH entre 5,1 y 5,6, adecuado para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos, y un potencial de reducción que permite el crecimiento de los anaerobios en profundidad y los aerobios en la superficie (Carrillo y Audisio, 2007).

El no aplicar las medidas de control de calidad, durante cualquier operación de procesado, aumenta generalmente la velocidad y la extensión de los cambios alterativos que llevan al deterioro y, finalmente, a la putrefacción de la carne.

La carne vacuna está considerada como el origen de la diseminación de *E. coli*. Las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., se encuentran en un bajo número sobre las superficies de las carnes crudas pero puede aumentar por una manipulación inadecuada.

La industria cárnica emplea diversos métodos para retrasar los cambios alterativos y prolongar el período de aceptabilidad. Estos procedimientos constituyen los diversos métodos de conservación de la carne. El tiempo de almacenamiento durante el que se mantiene el óptimo de aceptabilidad, depende del método de conservación utilizado y de las propiedades inherentes al producto cárnico específico del que se trate.

Según Forrest (1979), entre los cambios alterativos se incluyen los debidos a microorganismos (bacterias, mohos y levaduras), enzimas endógenas (presentes naturalmente en los tejidos cárnicos), enzimas exógenas (producidas por los microorganismos), reacciones químicas distintas a las enzimáticas (como la rancidez oxidativa) y acciones físicas (quemadura del frío, exudación, decoloración luminosa, aparición de colores anormales).

Brown (1982), señala que las características de las poblaciones de microorganismos que se desarrollen en la carne serán un reflejo de las condiciones medioambientales que rodean la carne y de la carga microbiana presente en los distintos utensilios y superficies con que la carne está en contacto, pudiendo ocurrir una contaminación cruzada durante su procesamiento. También serán importantes las condiciones de almacenamiento y las reacciones químicas que ocurran en la carne durante este período.

Los factores asociados con la alteración de la carne vacuna suelen ser cambios de color y textura, así como el desarrollo de malos olores y limo. La formación de limo tiene lugar en la superficie (generalmente producido por *Pseudomonas*) mientras que el agriado ocurre en el interior. El limo se detecta cuando la población microbiana alcanza un valor de 10^7 ufc/g y la actividad de agua (A_w) está próxima a 0,99.

El enverdecimiento producido por peróxido de hidrógeno es debido a lactobacilos heterofermentadores y *Leuconostoc*, mientras que el color verde originado al reaccionar el sulfuro de hidrógeno con la hemoglobina es causado por *Shewanella putrefaciens* y algunas otras bacterias (Carrillo y Audisio, 2007).

Los anaerobios son importantes cuando la temperatura se eleva por sobre los 25°C y predominan los clostridios (Carrillo y Audisio, 2007).

La velocidad de deterioro de la carne es mayor cuanto más alto sea el número inicial de microorganismos, la temperatura de almacenamiento y la A_w de la superficie de los tejidos. Casi toda la contaminación se concentra en la superficie de las reses y sólo un porcentaje pequeño de los microorganismos que el animal transportaba en la piel y el intestino, está implicado en la alteración cuando se conserva la carne por debajo de 5°C.

Cuando la carne se almacena al vacío y con refrigeración, los causantes del deterioro son bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta* en la mayoría de los casos. El tipo de organismos predominantes depende de la eficiencia de la barrera al oxígeno y del pH, valores bajos de este último favorecen a las bacterias lácticas.

El crecimiento de bacterias ácido lácticas en la carne envasada al vacío es deseable, ya que inhiben el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos y mejora la calidad microbiológica de la carne. Las bacterias lácticas homofermentativas transforman los hidratos de carbono principalmente en ácido láctico, el cual posee cierta acción bacteriostática (Cárdenas y Gianuzzi, 2005).

En ausencia de oxígeno la presencia de ácido láctico, presente en la carne tras el rigor mortis y favorecida por el crecimiento de las bacterias lácticas, inhibe el crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* a pH bajos (Grau, 1980).

4.3.1. Factores que influyen en el desarrollo de microorganismos en la carne

Los factores que afectan el desarrollo de microorganismos en la carne dependerán de factores intrínsecos como: pH, actividad de agua (A_w), potencial redox, entre otros, y de factores extrínsecos como: temperatura y humedad relativa durante el almacenamiento, presencia o ausencia de oxígeno (como los tres factores más importantes) y estado físico de la carne.

4.3.1.1. Factores intrínsecos

1. La actividad de agua se define como la presión de vapor de la solución en cuestión dividida por la presión de vapor del solvente puro. La A_w de la carne fresca tiene un valor aproximado de 0,99 o más, que está cerca de la A_w óptima para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, principalmente bacterias. En

general las bacterias son las más exigentes en actividad de agua, siendo los menos exigentes los mohos, mientras que las levaduras ocupan una posición intermedia.

2. El rango de pH óptimo para el crecimiento de microorganismos generalmente está próximo al neutro. Los mohos son los que toleran un rango de pH más amplio, aunque su crecimiento generalmente lo favorece el pH ácido. Valores de pH inferiores a 5,5 son desfavorables para las bacterias y en combinación con otros factores como temperaturas bajas, pueden prevenir el desarrollo bacteriano.

3. El potencial de óxido reducción de la carne constituye una indicación de su capacidad oxidante y reductora. Para alcanzar un crecimiento óptimo algunos microorganismos necesitan condiciones de reducción y otros de oxidación. Los microorganismos aerobios se ven muy favorecidos por un alto potencial de óxido reducción (reactividad oxidante), los potenciales bajos (reactividad reductora) favorecen el crecimiento de los microorganismos anaerobios. Después de la muerte del animal, el potencial redox va bajando paulatinamente hasta que la masa cárnica en su interior se hace anaeróbica.

4.3.1.2. Factores extrínsecos

1. La Temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los microorganismos es de 15-40 °C. No obstante algunos microorganismos crecen bien a temperaturas de refrigeración, algunos incluso a temperaturas inferiores a 0°C y otros a temperaturas mayores de 100°C. Los microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento es inferior a 20°C se llaman psicrófilos. Los que poseen temperaturas de crecimiento óptimas superiores a 45°C se llaman termófilos, y aquellos cuyas temperaturas óptimas están entre las de los psicrófilos y las de los termófilos se llaman mesófilos.

A medida que la temperatura se aproxima a los 0°C son menos los microorganismos que pueden crecer y su desarrollo es más lento. Las temperaturas menores de 5°C retrasan mucho el crecimiento de los más importantes microorganismos causantes de alteración y también previenen el crecimiento de casi todos los patógenos. Consecuentemente, 5°C se considera como temperatura crítica para la manipulación y almacenamiento de la carne y no puede superarse durante ningún período de tiempo, sin una pérdida sustancial de la calidad y del aspecto de la carne. Después de un almacenamiento prolongado, la alteración comienza a temperaturas de 5 a 7°C y se manifiestan bacterias psicrótróficas que predominan en la superficie de la res. Estas son mesófilos que pueden crecer a temperaturas bajas, por lo tanto, se les puede considerar como psicrófilos facultativos. Son bacilos Gram negativos, aerobios, móviles o no, siendo el género *Pseudomonas* el responsable de más del 50% de los casos (Carrillo y Audisio, 2007).

2. La humedad relativa es otro de los factores extrínsecos que influencia el desarrollo microbiano. La humedad relativa necesaria para mantener las condiciones óptimas de almacenamiento varía con la temperatura en general, cuanto más altas las temperaturas corrientes de refrigeración de la carne (-1 a 3°C), la humedad relativa debe oscilar aproximadamente entre el 88-92%. Si hay sudoración las superficies se humedecen y se convierten en muy aptas para el desarrollo microbiano para la alteración cárnica.

3. La presencia de oxígeno es importante porque determina el tipo de microorganismo que se desarrollará; algunos son absolutamente dependientes del

oxígeno (aerobios), otros crecen en ausencia total de este gas (anaerobios) y todavía existen otros que crecen en presencia o ausencia de oxígeno (microorganismos facultativos). Todos los mohos que crecen en la carne son aeróbicos y las levaduras presentes en este alimento también se desarrollan mejor cuando prevalecen condiciones aeróbicas; sin embargo, las bacterias de la carne pueden ser aeróbicas, anaeróbicas o facultativas.

4. El estado físico de la carne es el último factor extrínseco que influye en la actividad microbiana y la velocidad de alteración de este alimento. El estado físico de la carne depende de que se trate de canales, piezas grandes, trozos o carne picada, así como del tratamiento que se haya aplicado durante el proceso.

4.4. CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS A ESTUDIAR

Considerando los microorganismos que se van a estudiar, se presentan a continuación sus características más relevantes:

4.4.1. Microorganismos aerobios mesófilos

Los microorganismos que forman parte de este grupo son muy heterogéneos. En este grupo se incluyen todas las bacterias que en aerobiosis muestran capacidad para formar colonias visibles, bajo condiciones de temperatura entre 25 y 40°C.

En el recuento de microorganismos aeróbicos mesófilos se estima la flora total, pero sin especificar tipos de gérmenes.

Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración. Tiene un valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas. Recuentos en alimentos estables a menudo indican materias primas contaminadas o tratamiento no satisfactorio desde el punto de vista sanitario (Pascual Anderson y Calderón, 1999).

El cuidado esmerado de la higiene durante la faena puede reducir de modo importante la carga microbiana de las carnes, pero no puede prevenir la contaminación.

Un recuento total de aerobios mesófilos baja, no asegura que un alimento esté exento de patógenos o sus toxinas; tampoco un recuento total alto significa, inevitablemente, presencia de flora patógena.

Excepto en productos que se elaboran por fermentación, altos recuentos microbianos se consideran poco aconsejables para la mayor parte de los alimentos.

Su significado es diverso:

- Materia prima excesivamente contaminada.
- Deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos.
- La posibilidad, por tratarse de microorganismos mesófilos de que entre ellos pueda haber patógenos, dado que esta flora suele ser mesófila.
- Altos recuentos suelen ser signos de inmediata alteración del producto. Tasas superiores a 10^6 - 10^7 gérmenes por gramo suelen ser ya inicio de descomposición.

En los productos perecederos pueden indicar también condiciones inadecuadas de tiempo/temperatura durante su almacenamiento.

La presencia de un número elevado de bacterias aerobias mesófilas que crecen bien a temperatura corporal o próxima a ella, significa que puede haberse dado condiciones favorables a la multiplicación de los microorganismos patógenos de origen humano o animal (Pascual Anderson y Calderón, 1999).

La mayoría de las bacterias patógenas conocidas vehiculizadas por los alimentos son mesófilos y en algunos casos contribuyen con su presencia a los recuentos en placa encontrados. Los recuentos de bacterias mesófilas no explican la vida útil en un alimento conservado en refrigeración, ya que muchos microorganismos mesófilos no crecen a temperatura por debajo de los 5°C. Para esta finalidad es preferible el recuento de bacterias viables psicrótroficas con temperatura de incubación entre 0° y 5°C durante 10 días (Pascual Anderson y Calderón, 1999).

4.4.2. Coliformes

Las *Enterobacteriaceae* lactosa – positivas o grupo *coli - aerogenes* constituyen un grupo de bacterias que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por criterios taxonómicos. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, más o menos rápidamente, en un período de 48 hs. y con una temperatura de incubación comprendida entre 30 y 37°C.

Son bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Del grupo “coliformes” forman parte varios géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, y *Citrobacter*.

Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también en otros ambientes: suelo, plantas, etc.

Aunque su especificidad como indicadores no es buena, se suelen usar como índice de contaminación fecal por: su frecuencia en heces, su fácil detección en laboratorio, y sus características semejantes, en algún aspecto, a las de algunos miembros patógenos de la familia *Enterobacteriaceae*.

Dentro de este grupo, son los coliformes fecales los que tienen significado sanitario, y por consiguiente, los que más interesan en el análisis microbiológico de los alimentos.

Se considera a los coliformes fecales como presuntos *Escherichia coli*. Sus principales características son: su aptitud para desarrollarse entre los 43,5 – 45,5°C, su capacidad para crecer en presencia de sales biliares, y su facultad para producir indol en agua de peptona.

En los alimentos que han recibido un tratamiento para garantizar su sanidad, la presencia de niveles considerables de *Enterobacteriaceae* o de coliformes puede ser indicativo de dos elementos:

- Un tratamiento inadecuado y/o contaminación posterior al tratamiento, más frecuentemente a partir de materias primas, equipos sucios o manejo no higiénico.

- La multiplicación microbiana que pudiera haber permitido el crecimiento de toda la serie de microorganismos patógenos y toxigénicos (Carrillo y Audisio, 2007).

4.4.3. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Son bacterias cocoides o bacilares, Gram positivos, anaerobios aerotolerantes, inmóviles.

No necesitan de oxígeno para crecer, toleran la presencia de dióxido de carbono, nitritos, humo y concentraciones de sal relativamente altas y toleran valores de pH bajos. Por ello las condiciones existentes en las carnes envasadas al vacío favorecen el crecimiento de estos microorganismos.

En general las condiciones que favorecen el crecimiento de estas bacterias, resultan en un incremento considerable de la vida útil de la carne refrigerada, ya que inhiben el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos y mejora la calidad microbiológica de la carne. Las bacterias lácticas homofermentativas transforman los hidratos de carbono principalmente en ácido láctico, el cual como ácido no disociado, posee cierta acción bacteriostática.

En carnes con diferentes pH almacenadas a temperaturas cercanas a los 0°C en envase permeable, se puede observar un crecimiento de hasta 10^8 ufc/g en aproximadamente 20 días, en cambio en envases impermeables sólo las que presentan pH elevado muestran niveles máximos de 10^5 ufc/g. En tanto a pH menores se observa un menor desarrollo del número microbiano inicial, durante un tiempo de conservación de 50 días (Cárdenas y Giannuzzi, 2005).

4.4.4. *Pseudomonas*

Son microorganismos Gram negativos, móviles, aeróbicos estrictos aunque a veces pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. No forman esporas. Tienen reacciones positivas a la oxidasa y catalasa.

Estas bacterias son una de las principales responsables de la alteración de productos cárnicos almacenados incorrectamente en condiciones de aerobiosis. Algunos miembros del género son psicrófilos, por lo que la alteración de los alimentos que producen también tiene lugar durante la conservación en temperatura de refrigeración.

Algunas especies atacan los carbohidratos oxidándolos, algunas reducen los nitratos y el óxido de trimetilamina a dimetilamina, otras son fuertemente lipolíticas. Algunas son pigmentadas produciendo pigmentos amarillos, verdes y azulados. Son muy comunes en el suelo y el agua y son poco resistentes al calor. Producen malos olores en los alimentos cuando se encuentran poblaciones del orden de 10^7 ufc/g.

Las especies del género *Pseudomonas* son organismos ubicuos, que se encuadran dentro del grupo de las proteobacterias. En general inocuas para el hombre, también existen: patógenos oportunistas como *P.aeruginosa*; patógenos de animales y patógenos de plantas como *P.syringae*.

4.4.5. *Brochothrix thermosphacta*

Es un bacilo pequeño, regular no ramificado que habitualmente mide entre 0,6-0,75 μm de diámetro y 1-2 μm de largo, Gram positivo, anaerobio facultativo. No forma cápsula, ni endosporas. Es capaz de crecer en presencia de un 50% de CO_2 .

Es un microorganismo responsable del deterioro de productos cárnicos y pescado. Se ha encontrado como microorganismo dominante en carne almacenada en atmósfera modificada (80% O_2 , 20% CO_2) y constituye, junto con las bacterias ácido lácticas (BAL), la microbiota predominante en productos cárnicos envasados al vacío.

No se desarrolla bien en los envases impermeables al oxígeno, pero en los permeables a veces representa el 20-30% de la flora alterante total (Hayes, 1993). Requiere de pH igual o superior a 5,8 para crecer.

El principal producto metabólico de la *Brochothrix thermosphacta* en condiciones anaeróbicas es el ácido láctico, aunque también forma otros ácidos volátiles en pequeñas cantidades.

Esta bacteria en falta de azúcar fermentable, produce una rápida degradación de aminoácidos, originando productos de olor desagradable, como el H_2S , debido a su carácter proteolítico y a la producción de ácido láctico, etanol y ácidos grasos de cadena corta que provocan la aparición de dichos olores.

4.5. LOS SISTEMAS DE ENVASADO

La función primordial del envasado de la carne y de los productos cárnicos consiste en protegerlos de daños físicos, cambios químicos y de la contaminación microbiana y presentar al consumidor de forma atractiva. Por consiguiente, al elegir los materiales para el envasado de productos específicos deben tenerse en consideración múltiples factores, algunos de ellos conflictivos. El envasado requiere con carácter esencial el conocimiento básico de la química y de la biología de las carnes y sus productos, así como de las propiedades físicas y químicas de los materiales de envasado.

Las exigencias del envasado de los productos cárnicos dependen además de los tipos de procesado y comercialización a que se sometan. Los envases de las carnes congeladas deben retener las características deseables del producto a temperaturas de congelación durante un período de tiempo prolongado. Unos productos se procesan térmicamente una vez envasados y otros se envasan nuevamente después de procesados. Debe tenerse en cuenta que los envases sólo pueden retener, nunca mejorar, la calidad del producto envasado. Los envases, sin embargo, no deben reducir la calidad del producto.

Lundquist (1994) clasifica los sistemas de envasado según la forma o el tipo de material de envasado, el proceso de elaboración del envase y el proceso por el cual se elimina el oxígeno del mismo.

Según este autor, el envasado al vacío es el sistema más importante de envasado y mantenimiento de la calidad de los productos cárnicos. Consiste en la eliminación total del aire del interior del envase sin que sea reemplazado por otro gas, existiendo una diferencia de presión entre el exterior y el interior del envase

(FAO, 2001). Esto inhibe consecuentemente el crecimiento de algunos organismos alterantes, extendiendo la vida útil del producto.

Para este sistema de envasado se utilizan bolsas retráctiles. El envasado retraíble se implantó como proceso comercial al introducir las películas termorretraíbles de cloruro de vinilideno y de un copolímero del cloruro de vinilo. Estas películas son extruidas en forma de tubos soplados continuos que pueden cortarse longitudinalmente en películas con la anchura deseada, o bien se pueden extruir en tubos de menor diámetro que se cortan transversalmente en segmentos que cierran en un extremo para formar bolsas (Ramsbottom, 1976).

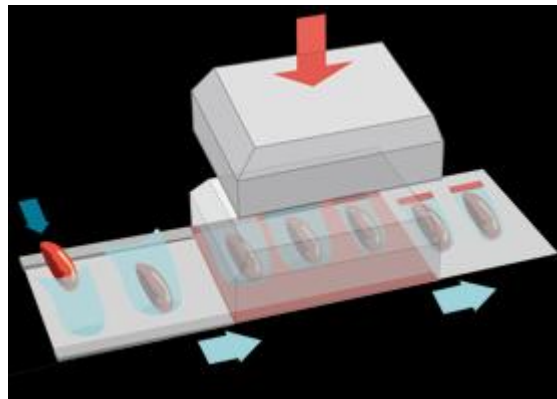


Figura 1. *Proceso de envasado al vacío*

Uno de los sistemas más utilizados es el Cryovac® y fue inventado por W. R. Grace hace aproximadamente 50 años. Este sistema tiene una extensa aplicación y actualmente se usa en el envasado de casi todos los productos cárnicos.

La operación de envasado al vacío, generalmente conocida como proceso Cry-O-Vac, se realiza básicamente de la siguiente manera: se introduce el producto en la bolsa, se extrae el aire, se cierra con alta temperatura y se sella el envase. La película de la bolsa se retrae al introducirla momentáneamente en agua caliente (88 a 99°C). Con el calentamiento desaparecen las arrugas y pliegues de la película. El resultado es un envase hermético, evacuado de aire, de aspecto atractivo y excelente durabilidad.

Ventajas de este proceso:

- * Excelente aspecto del envase gracias a la tecnología de retractilado.
- * Mayor vida comercial para el segmento de los productos refrigerados gracias a la tecnología de vacío.
- * Gran flexibilidad en las dimensiones del producto con ajuste instantáneo al perfil del artículo.
- * El producto mantiene el olor a carne fresca y el color característico de la misma.
- * Las enzimas de la carne la maduran mientras está conservada en la bolsa.



Figura 2. Carne envasada al vacío en bolsa termorretráctil.

Según Price y Schweigert (1976), el éxito del proceso depende de la selección de la carne; que tenga un contenido microbiano muy bajo en el momento de envasarla, que los materiales de envasado posean una permeabilidad muy baja al oxígeno y a la humedad y que las temperaturas de almacenamiento se encuentren justamente por encima del punto de congelación de las carnes frescas. El color rojo brillante o rosado de las carnes frescas cambia a tonos rojo oscuro o púrpura cuando se envasan a vacío en películas con baja permeabilidad al oxígeno.

En los envases a vacío, tanto la presión negativa interior como la positiva exterior desempeñan una función conveniente. A la presión negativa o vacío interior y a la presión positiva exterior se debe que la película queda adherida contra el producto en todas las direcciones, lo que asegura la íntima adaptación del envase al producto que es deseable en casi todos los productos cárnicos.

Bourgeois (1994), distingue dos fases en la conservación de un producto envasado al vacío:

- * una fase inicial aeróbica, debido a que el vacío no siempre es perfecto y que el agotamiento del O_2 no siempre es total.

- * una segunda fase anaeróbica resultante del consumo de O_2 por los tejidos y por los microorganismos. En esta fase se produce dióxido de carbono y vapor de agua.

El aumentar las concentraciones de CO_2 en el envase actúa como inhibidor frente a muchos microorganismos, incluidos mohos y *Pseudomonas*, las cuales constituyen la flora dominante de las carnes frescas alteradas. Las bacterias lácticas y las levaduras son mucho más resistentes a niveles altos de CO_2 . (Hayes, 1993)

Con respecto al papel de la temperatura, Schöbitz y col. (1990) señala que la técnica del envasado de carne al vacío, ha significado un avance importante en la conservación de este producto por un tiempo prolongado, sin que sea necesaria su congelación. Sin embargo para poder extender la vida útil de la carne al vacío y lograr una duración de ocho a más semanas es necesario almacenarla a una temperatura menor a $10^\circ C$ y lo más cercana a los $0^\circ C$. En cuanto al pH, en el momento del envasado éste debe ser igual o inferior a 5,8. Esto implica que los animales antes del sacrificio no deben haber estado sometidos a ningún tipo de “estrés” y el enfriado post mortem debe haber sido adecuado.

Al envasar la carne al vacío, se impide la contaminación por microorganismos del medioambiente. Posteriormente al aplicar el termoencogido, el envase se

adhiera estrechamente al producto y con ello cambia la humedad, la composición gaseosa y el potencial de óxido-reducción de la carne. Estas modificaciones, influyen en el desarrollo y composición de la microflora de la carne.

Según Brody (1996), si el envasado no se realiza adecuadamente y no se logra excluir el oxígeno, crecerán *Pseudomonas*, llegando finalmente a alterar la carne, de la misma forma que en el almacenamiento en aerobiosis. El envasado al vacío o la reducción de oxígeno en el entorno de los microorganismos, aumenta la vida útil de la carne fresca en comparación con la de la carne envasada en películas permeables al O₂. El CO₂ que se forma en el interior de la bolsa, generado por la actividad enzimática de la carne y de los microorganismos, retrasa e inhibe el crecimiento de algunas bacterias como *Pseudomonas*. También se ha comprobado que la inhibición de *Pseudomonas* tiene lugar a niveles de CO₂ tan bajos como un 10%.

Jay (2000), señala, que cuando las carnes envasadas al vacío experimentan alteraciones, con frecuencia los organismos predominantes son lactobacilos, *Brochothrix thermosphacta* o ambos.

5. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

La planta de faena y desosado en la cual se desarrolló este estudio cuenta con escasos datos microbiológicos de la carne envasada al vacío para exportación. Esta situación puede presentarse como un problema ya que el estudio microbiológico es uno de los componentes que se necesitan para calcular la vida útil de la carne, además de estudios químicos y sensoriales.

Considerando esta situación problema para la industria nacional, nuestro presente trabajo está motivado a conocer la calidad microbiológica de cortes vacunos (*Longissimus dorsi*) refrigerados y envasados al vacío de una planta de faena y desosado, mediante la detección y cuantificación de microorganismos indicadores y alterantes.

Si bien no se puede generalizar el estudio de un caso a lo que acontece a nivel nacional, será una herramienta para conocer datos microbiológicos de la carne, los cuales son importantes como uno de los insumos que se necesitan para calcular la vida útil de la misma.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

- Generar un estudio que cuantifique la calidad microbiológica de la carne bovina enfriada y envasada al vacío almacenada durante 120 días a una temperatura de refrigeración.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener parámetros microbiológicos que permitan conocer la calidad microbiológica de la carne enfriada envasada al vacío.
- Evaluar la presencia y evolución de los microorganismos indicadores y alterantes en períodos determinados (al día 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Equipamiento de laboratorio microbiológico de alimentos.

7.1. MATERIA PRIMA

Carne bovina *Longissimus dorsi* (“Bife angosto”) enfriada, envasada al vacío.

7.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Para este estudio se utilizaron 90 muestras del músculo *Longissimus dorsi* (“Bife angosto”), de aproximadamente 200 gramos cada una, proporcionados por una planta de faena y desosado habilitada por el MGAP para mercado interno y exportación.

Las muestras se envasaron al vacío en bolsas estériles cerradas (Cryovac®), transportadas en un recipiente isotérmico. Las mismas fueron trasladadas en condiciones de refrigeración manteniendo la cadena de frío.

Las muestras de carne fueron transportadas al Laboratorio del Área Microbiología de Alimentos, Departamento de Calidad Agroalimentaria del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, donde se conservaron a temperatura de refrigeración ($0^{\circ} \pm 1^{\circ}$).

El muestreo se realizó siguiendo las directivas de I.C.M.S.F (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*).

7.3. MEDIOS DE CULTIVO

7.3.1. Plate Count Agar

Es un medio utilizado para el recuento de organismos viables en alimentos.

El método consiste en realizar siembra en placa vertida usando muestras diluidas y contando las colonias luego de la incubación. La incubación es por 48hs a 35°C.

7.3.2. Violet Red Bile Lactose Agar

Medio de cultivo utilizado para la detección y el recuento de coliformes totales, a partir de alimentos.

En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano, las sales biliares y el cristal violeta inhiben el desarrollo de la flora acompañante Gram positiva, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y el rojo neutro es el indicador de pH.

Todas las enterobacterias fermentan la glucosa, esto produce la acidificación del medio y el viraje del indicador de pH al color rojo intenso. Debido a esto, se observan colonias de color rojo púrpura, de 1 a 2 mm de diámetro, rodeadas, generalmente, de una zona rojiza de bilis precipitada.

7.3.3. M.R.S. Agar

El M.R.S. Agar fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas.

Este medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. Características de las colonias: generalmente pequeñas, blanco-grisáceo, lisas o rugosas.

La siembra se realiza por inoculación directa del material a analizar mediante la técnica de siembra en superficie: a una temperatura de incubación de 35-37°C, durante 24 - 72 hs.

7.3.4. Cetrimide Agar

Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Las colonias típicas de *Pseudomonas aeruginosa* son pequeñas, generalmente de color verdoso, con fluorescencia verdosa a la luz ultravioleta.

7.3.5. STAA Agar Base

Es un medio que se utiliza para el aislamiento de *Brochothrix thermosphacta* de muestras de alimentos. El medio STAA posee Sulfato de estreptomycin, acetato de talio y actidione (Ciclohexamida). El sulfato de estreptomycin inhibe los organismos Gram positivos y la mayoría de los organismos Gram negativos en grandes concentraciones, mientras que *Brochothrix thermosphacta* permanece resistente. El acetato de talio inhibe la mayoría de las levaduras y también muchas bacterias aerobias y anaerobias facultativas. La incorporación de ciclohexamida sirve para inhibir levaduras y hongos filamentosos.

8. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Se realizaron los análisis microbiológicos necesarios para determinar el desarrollo de los siguientes microorganismos: aerobios mesófilos, coliformes, bacterias ácido lácticas, *Pseudomonas*, y *Brochothrix thermosphacta*. Los análisis microbiológicos se realizaron los días: 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 en muestras pareadas.

Dichos análisis se realizaron según el *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 2001).

Cada bife en el tiempo correspondiente fue retirado de la bolsa con una pinza estéril, se tomó una muestra de aproximadamente 10 g y se colocó en una bolsa Stomacher.

Se agregó 90 ml de buffer fosfato (APHA, 1992) a la bolsa, obteniéndose la dilución 10-1. La muestra se homogeneizó por 1 minuto a velocidad lenta en un homogeneizador (Stomacher). Posteriormente se realizaron las diluciones adicionales necesarias para los recuentos de aerobios mesófilos, coliformes, bacterias ácido lácticas, *Pseudomonas*, *Brochothrix thermosphacta*.

Semanalmente se realizaron exámenes visuales para detectar pérdida de vacío y cambios de color y monitoreo de temperatura de refrigeración 0 ± 1 °C.

Tabla 3. Medios de cultivo y utilidad de las bacterias estudiadas.

Microorganismo	Utilidad	Medio de cultivo
Aerobios mesófilos	Indicador de vida útil	Plate Count Agar
Coliformes	Indicador de higiene	Violet Red Bile Lactose Agar
Bacterias ácido lácticas (BAL)	Indicador de alteración	Man Rogosa Sharpe Agar (MRS)
<i>Pseudomonas</i>	Indicador de alteración	Cetrimide Agar
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Indicador de alteración	Streptomycin Thallium Acetate Actidione Agar (STAA)

9. VALORES DE REFERENCIA

Se seleccionaron como valores de referencia los fijados por el Reglamento Bromatológico Nacional Decreto 315/994, M. Moragas Encuentra y M. B. De Pablo Busto en *Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico químicos de interés sanitario* (2004), y G. Noskowa en *Microbiología de las carnes conservadas por el frío* (1972).

Tabla 4. Valores de referencia utilizados.

Aerobios	5×10^5 ufc/g	5,7 log ufc/g (a)
Coliformes	1×10^2 ufc/g	2 log ufc/g (b)
<i>Pseudomonas</i>	1×10^6 ufc/g	6 log ufc/g (c)

Nota:

a) Extraído del Reglamento Bromatológico Nacional Decreto 315/994.

b) Extraído de M. Moragas Encuentra y M. B. De Pablo Busto en *Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico químicos de interés sanitario* (2004).

c) Extraído de G. Noskowa en *Microbiología de las carnes conservadas por el frío* (1972).

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido a que los recuentos microbianos son lo suficientemente variables como para tener valores muy “alejados / dispersos” se decidió utilizar el logaritmo de los mismos. Ello permitió tener los datos en una escala más cercana y comparable entre los diferentes valores obtenidos.

Se practicó un análisis exploratorio de datos de cada variable / indicador con la finalidad de estudiarlas y describirlas.

En los casos en que los indicadores tenían límites permitidos, se practicó el test “t de Student” de comparación con un parámetro, utilizando un nivel de significación del 5%.

Se utilizó el software estadístico PAST versión 2.17b.

11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En base a los datos obtenidos podemos observar como los valores mínimos o ausentes de microorganismos indicadores que se encontraron en los primeros días de producción del producto, comenzaron a aumentar lentamente a partir de los 60 - 75 días manteniéndose en bajas concentraciones; las cuales comenzaron a acentuarse sobre el día 90, a partir del cual el crecimiento se disparó multiplicándose de manera exponencial, hasta el día 105 donde perdió las cualidades necesarias para ser apta para el consumo.

En la TABLA 5 se presentan los promedios de los recuentos de las bacterias estudiadas expresados en log ufc/g.

Tabla 5. Promedios de los recuentos de las bacterias estudiadas expresados en log ufc/g.

Tiempo	Aerobios (a)	Coliformes (b)	<i>Pseudomonas</i> (c)	Bacterias ácido lácticas	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
0	2,2274*	1,8010	0,0000	0,0000	0,0000
15	2,4683*	1,5396	0,0000	2,0570	0,0000
30	3,2457	1,7386	0,0000	2,1087	0,0000
45	3,3005*	1,3891	1,6505	2,0731	0,0000
60	3,5094*	1,5000	1,5880	0,0000	1,5000
75	4,3010*	1,6990	1,5000	2,0938	1,4515
90	4,3934	2,0570	2,0880	0,0000	2,1228
105	5,2632*	2,3817	2,1963	0,0000	2,0966
120	6,3779	3,1901*	2,3266	0,0000	2,6590

Nota:

- El límite máximo admitido es de 5,70 log ufc/g. Aquellos valores que mostraron diferencias significativas con dicho límite se indican con un asterisco.
- El límite máximo admitido es de 2,00 log ufc/g. Aquellos valores que mostraron diferencias significativas con dicho límite se indican con un asterisco.
- El límite máximo admitido es de 6,00 log ufc/g. Aquellos valores que mostraron diferencias significativas con dicho límite se indican con un asterisco.

En la FIGURA 3 se resumen las características de los indicadores durante todo el estudio.

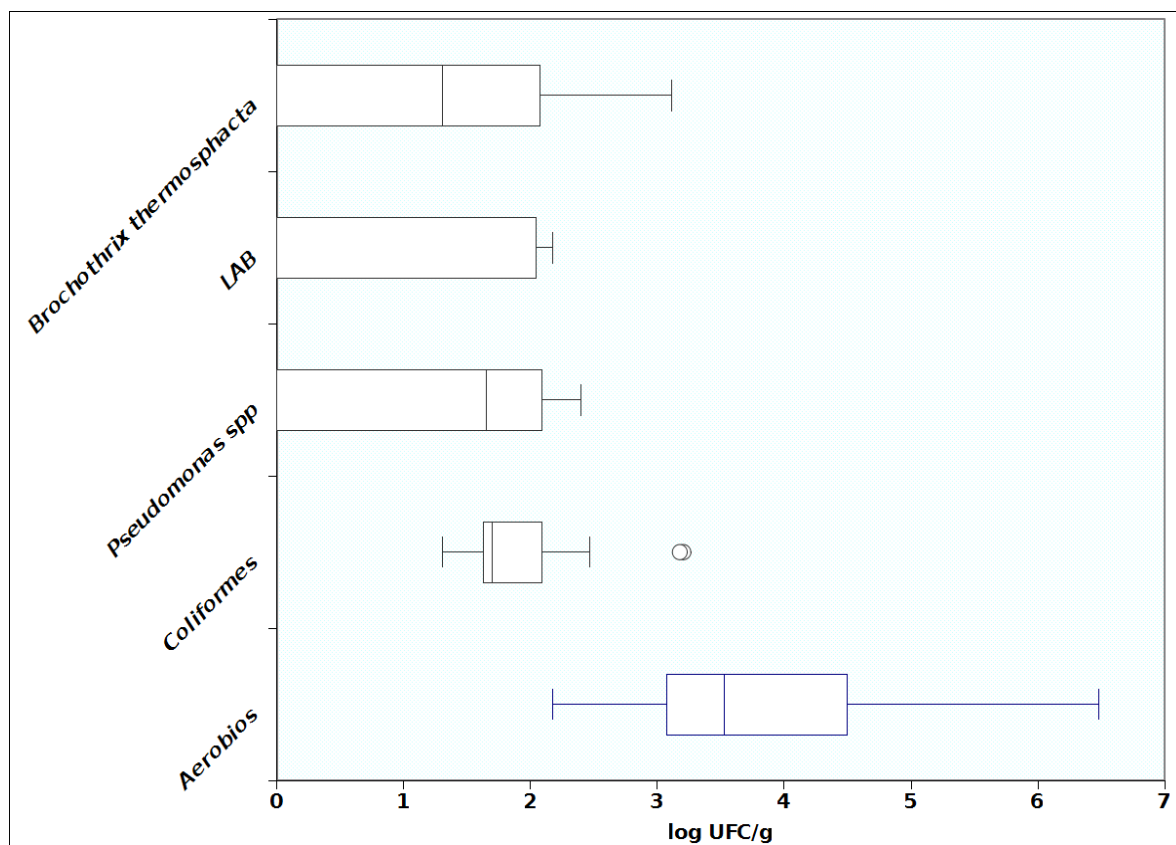


Figura 3. Análisis exploratorios de los datos: Box – plot que ilustra la distribución del conjunto de datos para cada variable estudiada.

En la FIGURA 4 se observa el comportamiento de aerobios mesófilos. Al comienzo del estudio, el recuento fue 2,23 log ufc/g. De acuerdo a los valores de referencia utilizados (5,70 log ufc/g) extraídos del Reglamento Bromatológico Nacional Decreto 315/994, al día 105 comenzó a acercarse al límite microbiológico considerado, con un valor promedio de 5,26 log ufc/g y al día 120 sobrepasa el límite preestablecido: 6,40 log ufc/g.

De acuerdo al ICMSF (1999) para canales antes de refrigerar el límite para aerobios mesófilos totales es de 6,00 log ufc/g, ya que una carne con un recuento superior a 7,00 log ufc/g, ha sufrido una contaminación considerable, ha estado expuesto a unas condiciones que han permitido multiplicación de la flora presente inicialmente hasta unas tasas próximas a las que ya mostrarían evidencias de una incipiente alteración.

En un estudio similar realizado por Lee y Yoon (2001) en Australia en seis establecimientos frigoríficos donde utilizaron cortes similares, envasados al vacío y enfriados a -0,5 °C para determinar su vida útil, obtuvieron recuentos de aerobios y de bacterias ácido lácticas diferentes a los establecidos por otros estudios realizados en ese país, donde la fase estacionaria alcanzó los 7-8 log ufc/g luego de 5 a 8 semanas. En el mencionado estudio australiano el recuento raramente superó los 7 log ufc/g incluso después de 30 semanas. De ahí concluyeron que diferentes variables como el pH de la carne, la temperatura y la concentración de CO₂ se combinan para crear condiciones en las cuales hay escaso o nulo crecimiento de dichas bacterias.

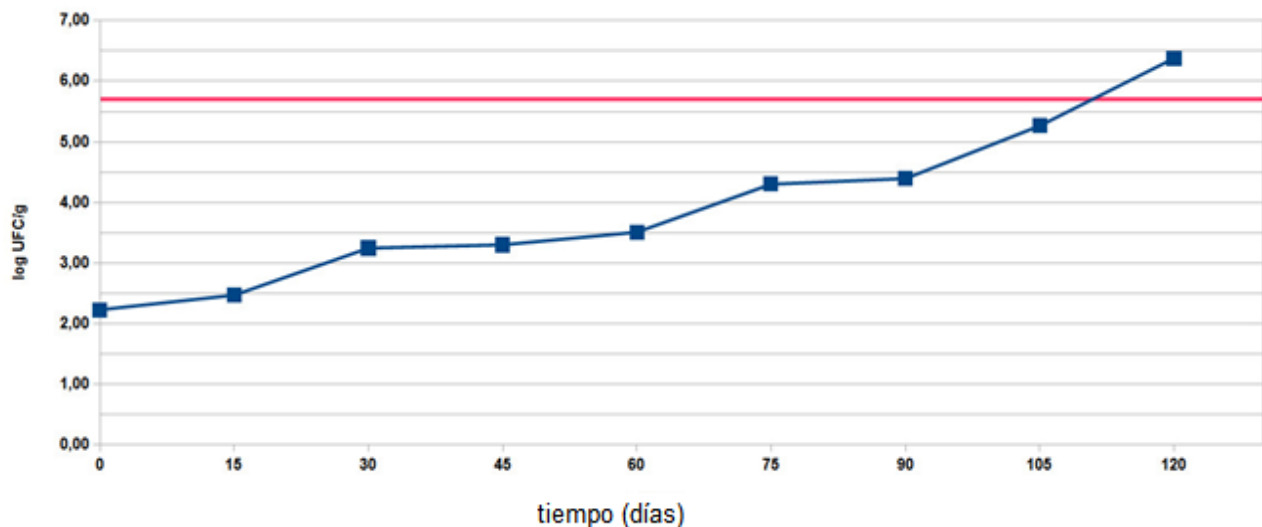


Figura 4. Gráfica de datos promedio expresados en log para aerobios mesófilos con su correspondiente límite.

En otro estudio realizado en laboratorios del INTA (Instituto de Tecnología de Alimentos) de Argentina con el fin de determinar la vida útil de cortes *Longissimus dorsi* (envasados en bolsas de reducida permeabilidad al O₂ envasados al vacío) los recuentos de aerobios mesófilos fueron muy similares a los de este estudio, desde el inicio al final de los días (Masana y col., 2002).

El recuento de enterobacterias, bacterias coliformes y *Escherichia coli* es utilizado como índice de contaminación de la carcasa, con microorganismos asociados al contenido intestinal del animal, pudiendo también provenir de la piel de éste (Grau citado por Schöbitz y col., 1990).

La FIGURA 5 muestra el comportamiento de coliformes. Desde el inicio al día 90 los valores se mantuvieron constantes (entre 1,40 log ufc/g y 1,80 log ufc/g). A partir de este día se comenzó a constatar un leve crecimiento llegando a finalizar con valores de 3,20 log ufc/g.

En el estudio del INTA (Masana y col., 2002) los recuentos de coliformes se mantuvieron constantes al igual que el presente estudio en niveles cercanos a 2 log ufc/g hasta el día 90.

En un estudio similar, Schillinger y Lücke (1987) obtuvieron también valores muy bajos los primeros días de muestreo alcanzando posteriormente como máximo, al día 45, recuentos de 4,00 log ufc/g en carne envasada al vacío a pH normal.

De acuerdo a los valores de referencia utilizados en este estudio (2 log ufc/g) (MSP, 1994) los recuentos mostraron valores de aceptabilidad hasta el día 90 (2,06 log ufc/g).

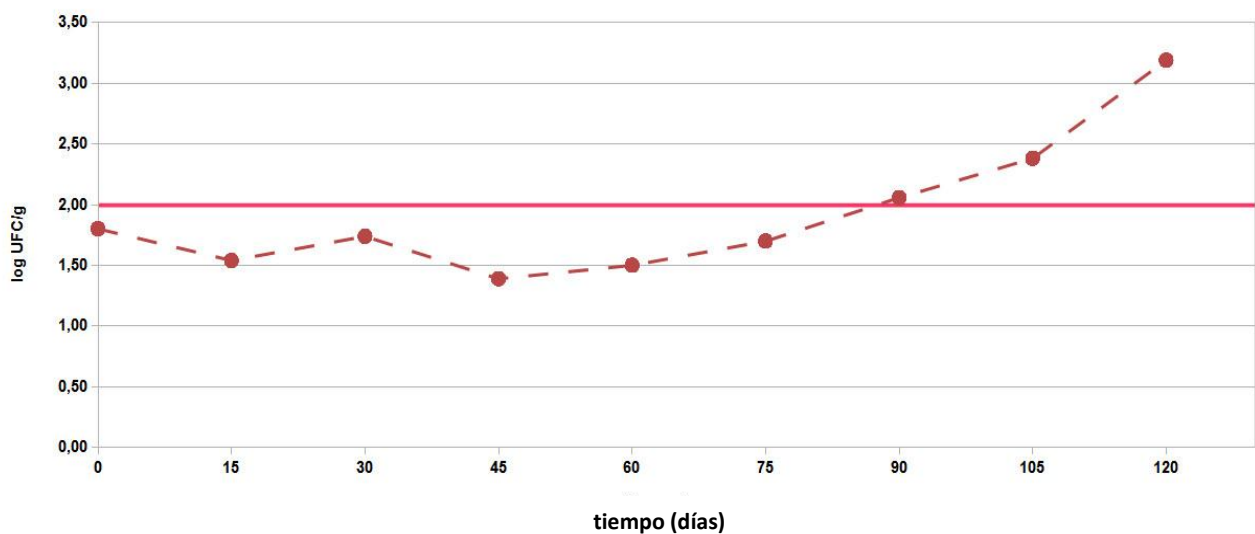


Figura 5. Gráfica de datos promedio expresados en log para coliformes con su correspondiente límite.

La FIGURA 6 muestra el crecimiento de *Pseudomonas* que comenzó entre el día 30 y el día 45, con recuentos de 1,65 log ufc/g, y se mantuvo constante hasta el día 75 donde comenzó a crecer nuevamente en forma lenta, alcanzando el día 120 el valor de 2,33 log ufc/g. Se podría afirmar que en el caso de *Pseudomonas*, los valores de aceptabilidad se mantuvieron hasta el día 120, de acuerdo a los valores de referencia utilizados (6 log ufc/g)(Noskowa, 1972).

En el estudio mencionado realizado por el INTA (Masana y col., 2002) la cinética de crecimiento de *Pseudomonas* fue muy similar a este estudio pero alcanzando valores más elevados desde el día 0 (1,92 log ufc/g) hasta el día 90 (4,29 log ufc/g) donde se aproxima a los valores de referencia citados anteriormente (6 log ufc/g) (Noskowa, 1972).

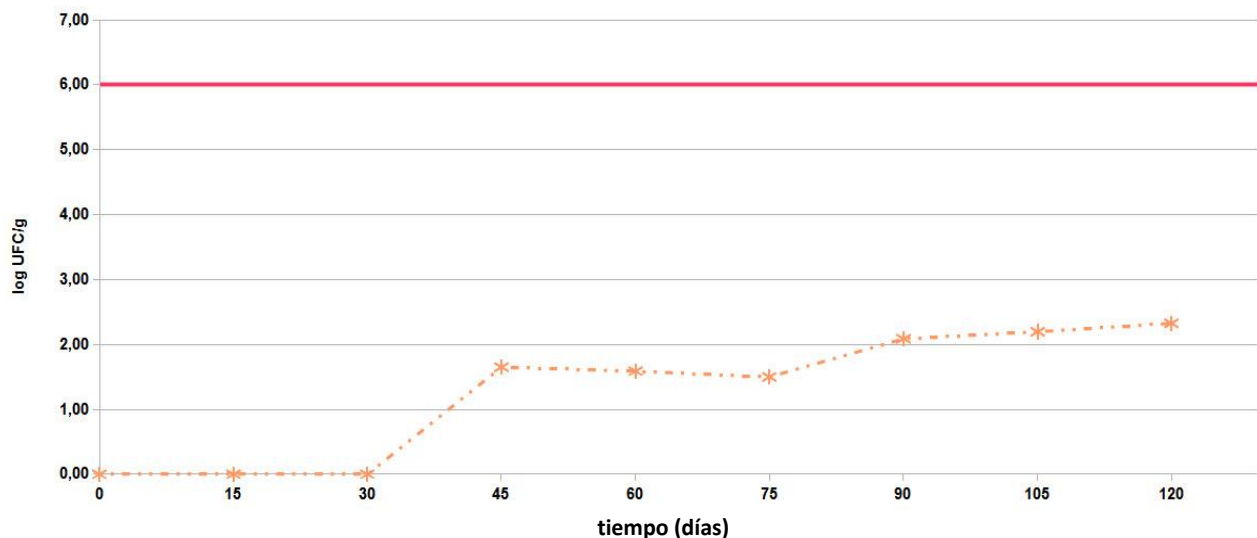


Figura 6. Gráfica de datos promedio expresados en log para *Pseudomonas* con su correspondiente límite.

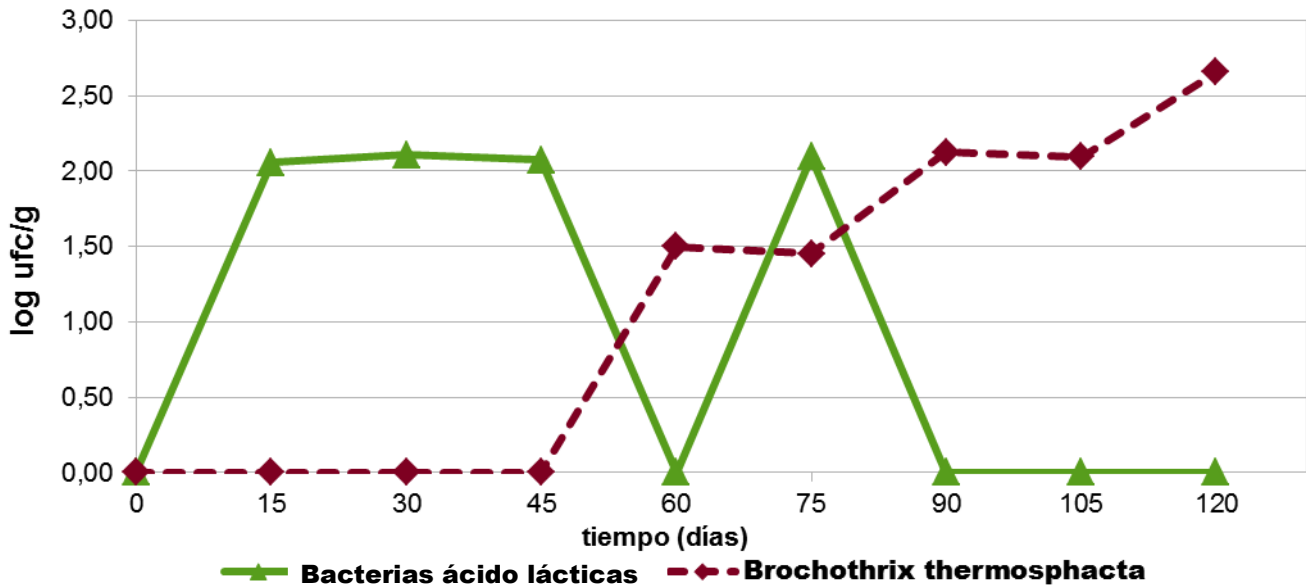


Figura 7. Gráfica de datos promedio de los recuentos obtenidos para *Brochothrix thermosphacta* y bacterias ácido lácticas, expresados en log, donde se observa la relación de crecimiento entre ambos.

En la FIGURA 7 se muestra el desarrollo de las bacterias ácido lácticas durante el almacenamiento de la carne, en relación con el crecimiento de *Brochothrix thermosphacta*.

En este estudio se observó la acción inhibitoria de las bacterias ácido lácticas sobre *Brochothrix thermosphacta*, que como se desarrolló anteriormente (Masana y col, 2002) es sabido que las bacterias ácido lácticas inhiben el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos y mejoran la calidad microbiológica de la carne.

Según los datos obtenidos se pudo ver que al inicio del ensayo no hubo crecimiento de bacterias ácido lácticas. El día 15 se observó el desarrollo de estas bacterias con un recuento de 2,06 log ufc/g, manteniéndose constante hasta el día 45 donde comenzó a decaer, momento en el cual comenzó a evidenciarse el crecimiento de *Brochothrix thermosphacta*. Al día 60 el recuento de bacterias ácido lácticas se redujo a cero mientras que el crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* alcanzó un promedio de 1,50 log ufc/g y al término del periodo (día 120) llegó a una concentración final de 2,66 log ufc/g ($p \geq 0,05$). Las bacterias ácido lácticas volvieron a subir al día 75 y su recuento se volvió negativo al día 90 hasta el final del estudio.

Estos resultados son comparables con lo descrito por Cárdenas y Gianuzzi (2005), los cuales estudiaron el desarrollo de bacterias ácido lácticas en carnes con diferentes pH almacenadas a temperaturas cercanas a los 0°C, y concluyeron que en envases impermeables sólo las que presentaron pH elevado mostraron niveles máximos de 1×10^5 ufc/g (5 log ufc/g). En tanto a pH menores se observó un menor desarrollo del número microbiano inicial, durante un tiempo de conservación de 50 días.

En un estudio realizado en Chile (Jara, 2007) en similares condiciones pero realizado en tres rangos de pH, a pH normal se obtuvieron valores promedios

cercanos en el día 0 a 1,00 log ufc/g. Al día 30 los recuentos fueron de 1,19 log ufc/g, finalizando al día 60 con un recuento de 1,40 log ufc/g.

El comportamiento de *Brochothrix thermosphacta* en el presente estudio concuerda con Schobitz y col. (1990), quienes encontraron en carne de pH normal envasada al vacío a -2°C, un recuento inicial de 1,80 log ufc/g, manteniéndose constante hasta los 45 días, presentándose igual cinética de crecimiento entre ambas investigaciones, llegando a los 60 días a un valor de 3,00 log ufc/g.

Jara (2007) al día 0 obtuvo valores de 0,70 log ufc/g, a los 45 días comenzó su desarrollo llegando al día 60 con recuentos de 1,00 log ufc/g. La cinética de crecimiento se asemeja a la de este estudio, con la diferencia que el estudio chileno finalizó al día 60.

Masana y col. (2002) en su estudio realizado en similares condiciones pero con temperatura de almacenamiento de 1°C obtuvieron valores iniciales de *Brochothrix thermosphacta* de 1,70 log ufc/g evidenciando un crecimiento lento, manteniéndose casi constante hasta el día 60 donde alcanzó valores máximos de 3,40 log ufc/g y luego bajó hasta volver a valores similares al inicial (2,00 log ufc/g).

Schillinger y Lücke (1987), reportaron en carne a pH 5,8 un recuento de 2,00 log ufc/g al inicio del estudio, sin embargo, ya al día 30 estos autores obtuvieron recuentos de 4,00 log ufc/g almacenando la carne a 2°C, siendo este valor superior al encontrado en este estudio, puesto que al día 30 los recuentos todavía eran nulos. Las diferencias presentes entre los resultados de Masana y col. (2002), Schillinger y Lücke (1987) y este estudio se pueden atribuir a la temperatura de almacenamiento ya que en este estudio se trabajó con una temperatura de almacenamiento de 0°C.

12. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos fijados para este estudio, desde el punto de vista microbiológico y según las variables medidas, los resultados mostraron un posible periodo de aptitud de 90 a 105 días para la carne bovina envasada al vacío y mantenida bajo condiciones de refrigeración.

A partir del día 105 se obtuvieron recuentos, para los microorganismos estudiados, que sobrepasaron los límites establecidos. De acuerdo a la bibliografía consultada, esto indicaría una posible alteración desde el punto de vista microbiológico.

13. RECOMENDACIONES

Podríamos plantearnos un desafío más ambicioso para el futuro, analizando un mayor número de muestras y profundizando los estudios ya existentes. A su vez se podría incrementar el número de microorganismos a estudiar como por ej. *Staphylococcus aureus*, así como clostridios proteolíticos y alterantes. Si se realizaran estudios más exhaustivos podrían llegar a ser una fuente de consulta como valores de referencia.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aberle, E. D., Forrest, J.C., Gerrard, D. E., Mills, E.W., Hedrick, H.B., Judge, M.D., Merkel, R.A. (2001) Principles of meat science. 4a ed. Dubuque, Kendall/Hunt, 354 p.
2. Adams, M. R., Moss, M. O. (1996) Microbiología de los alimentos. Zaragoza, Acribia. 478 p.
3. Almonacid, M. (2003) Estudio de pH y color muscular en cortes comerciales de canales bovinas normales y con la anomalía Corte Oscuro. Tesis, Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, 34 p.
4. American Public Health Assotiation (APHA) (1992). Standard methods for the examination of dairy products. 16a. ed. Washington, Sheridan Books. 546 p.
5. American Public Health Assotiation (APHA) (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4a. ed. Washington, Sheridan Books. 676 p.
6. Amerling, C. (1979) Tecnología de la carne. Antología. San José, EUNED, 529 p.
7. Aspé, E., Roeckel, M., Martí, C., Jiménez, R. (2008) Envasado de Carne de Vacuno con Hueso y Grasa en Atmósfera Modificada con CO₂ y CO. Información Tecnológica 19 (6): 57-69.
8. Belitz, H. D., Grosch, W. (1997) Química de los alimentos. 2ª ed. Zaragoza, Acribia. 1087 p.
9. Bourgeois, C. (1994) Conservación en atmósferas modificadas. En: Bourgeois, C., Mescle, J., Zucca, J. Coord. Microbiología alimentaria. Zaragoza, Acribia, P. 409–422.
10. Brody, A. (1996) Envasado de alimentos en atmósferas controladas, modificadas y al vacío. Zaragoza, Acribia, 213 p.
11. Brown, M., Baird-Parker, A. (1982) The microbiological examination of meat. Meat microbiology. New York, Applied Science. 529 p.
12. Cárdenas, F., Giannuzzi, L. (2005) Influencia del envasado en flora cárnica. La Industria Cárnica Latinoamericana; 137:40-45.
13. Carrillo, L., Audisio, M.C. (2007) Manual de Microbiología de los Alimentos. Jujuy, 10:102-116. Disponible en www.unsa.edu.ar Fecha de consulta: 4 de junio de 2012.
14. Doyle, M., Beuchat, L., Montville, T. (1997) Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Washington, ASM, 411-437.
15. Envasado en bolsa retráctil al vacío (2012) Disponible en: http://www.cryovac.com/es/vacuum_shrink.aspx. Fecha de consulta: 7 de setiembre de 2012.
16. FAO (2001) Disponible en http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/005/x6909S/x6909s04.htm Fecha de consulta: 15 de setiembre de 2012.
17. FDA, U. S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM) Online (2001), Maryland. Disponible en: www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ Fecha de consulta: 6 de junio de 2012.
18. Fennema, D.R. (1996) Food chemistry. 3a ed. Nueva York, Marcel Dekker 1014 p.
19. Forrest, J., Aberle, E., Hedrick, H., Judge, M., Merkel, R. (1979) Fundamentos de ciencia de la carne. Zaragoza, Acribia, 364 p.

20. Gallo, C. (2003) Carnes de corte oscuro en bovinos. *Vetermas* 2(2):16-21.
21. García, T., Martín, R., Sanz, B., Hernández, P. (1995) Extensión de la vida útil de la carne fresca. I: Envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 1:1-15.
22. Gill, C.O., Penney, N. (1985). Modification of in-pack conditions to extend the storage life of vacuum packaged lamb. *Meat Science*. Hamilton, Meat Industry Research Institute of New Zealand; 14:43–60.
23. Girard, J. (1991) *Tecnología de la carne y productos cárnicos*. Zaragoza, Acribia, 300 p.
24. Grau, F. H. (1980) Inhibición del crecimiento anaeróbico de *Brochothrix thermosphacta* debido al ácido láctico. *Appl. Environ. Microbiol*, 40: 433-436
25. Halbinger, R. E., Vidal, M. S., Friedman, R. (1992) *Microbiología de los alimentos conservados por el frío*. Buenos Aires, Hemisferio Sur, 96 p.
26. Hayes, P. (1993) *Microbiología e higiene de los alimentos*. Zaragoza, Acribia, 369 p.
27. Hofmann, K. (1994) Conceptos de calidad en carne y productos cárnicos. *Fleischwirtschaft (Español)*, 2:3–12.
28. Hough, G. (2010) *Sensory Shelf life estimation of food products*. New York, Taylor & Francis, 255 p.
29. International Commission on Microbiology Specification for Food (ICMSF) (1999) *Microorganisms in Food, their significance and methods of enumeration*. 2a ed. Toronto, University of Toronto, 434 p.
30. Jacobsen, T., Leisner, J.J., Granly Koch, A., Soltoft-Jensen, J. (2012) Investigations on the shelf life of Danish saveloy. *Fleischwirtschaft International*, 27:63-69.
31. Jara Villegas, P. (2007) Efecto del pH Sobre la Conservación de Carne de Bovino de Corte Oscuro (DFD) Envasada al Vacío, almacenada a 0°C. Tesis, Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 66p
32. Jay, M. (2000) *Microbiología moderna de los alimentos*. 4ª ed. Zaragoza, Acribia, 616 p.
33. Lama, P. (2002) Caracterización de una bacteriocina producida por una bacteria ácido láctica de carne envasada al vacío. Tesis, Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile. 85 p.
34. Lawrie, R.A. (1977) *Ciencia de la Carne*. Zaragoza, Acribia, 452 p.
35. Lee, K. T., Yoon, C. S. (2001). Quality changes and shelf life of imported vacuum-packaged beef chuck during storage at 0°C. *Meat Science*. Hamilton, Meat Industry Research Institute of New Zealand, 59: 71-77.
36. Lundquist, B. (1994) El envasado de la carne y los productos cárnicos. En: Price, J.F., Schweigert, B.S. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos* Zaragoza, Acribia, p. 441-455.
37. Man, D. (2004) *Caducidad de los alimentos*. Zaragoza, Acribia, 150 p.
38. Masana, M. O., Meichtri, L. H., Rodríguez, R. H. (2002) Determinación de la vida útil en cortes de bovinos. *Idia* 21(2):157-162.
39. Moragas Encuentra, M., De Pablo Busto M. B. (2004) Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico químicos de interés sanitario. *Revista Alimentaria*. 356: 19 – 20.
40. Moreno García, B. (2006) *Higiene e Inspección de Carnes 1*. Madrid, Díaz de Santos. 618 p.

41. Morrissey, P.A., Sheehy, P.J.A., Galván, K., Ferry, J.P., Buckley, D.J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science* 49 (1): 73 – 86.
42. Mossel, D.A.A., Moreno García, B., Struijk, C.B. (2003) *Microbiología de los alimentos: Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos*. 2ª ed. Zaragoza, Acribia. 734 p.
43. MSP (1994) *Reglamento Bromatológico Nacional*. Decreto N° 315/994. 2ª. Ed. Montevideo, Impo – Diario Oficial. 459 p.
44. Noskova, G. L. (1972) *Microbiología de las carnes conservadas por el frío*. Zaragoza, Acribia. 111 p.
45. Pascual Anderson, M. R., Calderón y Pascual, V. (1999) *Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2ª ed. Madrid, Díaz de Santos, 464 p.
46. Pearson, A.M., Gillet, T.A. (1999) *Processed meats*. 3a ed. Maryland, Aspen, 624 p.
47. Periago Castón, M.J., Ros, G.; Martínez, C., Santaella, M., Pérez, D., García, F., Santaella, J. (2000) *Bromatología e Inspección de Alimentos*, Guía Docente de la Universidad de Murcia. Disponible en <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/higiene-inspeccion-y-control-alimentario-1>, Fecha de consulta: 8 de mayo de 2012.
48. Piironen, V., Torvo, J., Lampi, A.M. (2002) New data for cholesterol contents in meat, fish, milk, eggs and their products consumed in Finland. *Journal of Food Composition and Analysis*. 15: 705-713.
49. Prandl, O., Fischer, A., Shmiddhofer, T., Sirvell, J. (1994) *Tecnología e higiene de la carne*. Zaragoza, Acribia, 854 p.
50. Price, J., Schweigert, B. (1976) *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza, Acribia, 592 p.
51. Ramsbottom, J.M. (1976). *Envasado*. En: Price, J., Schweigert, B. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza, Acribia. P. 538-545.
52. Small, A. H., Jenson, I., Kiermeier, A., Sumner, J. (2012) Vacuum-packed beef primals with extremely long shelf life have unusual microbiological counts. *Journal of Food Protection* 75(8):1524-1527
53. Schillinger, U. y Lücke, F. (1987) Bacterias lácticas en carne envasada al vacío y su influencia sobre la conservabilidad. *Fleischwirtschaft (Español)*; 2: 46 – 52.
54. Schöbitz, R., De La Vega, J., Tamayo, R. (1990) Calidad microbiológica y sensorial de la carne de vacuno envasada al vacío almacenada a diferentes temperaturas. *Fleischwirtschaft (Español)*; 2:31-36.
55. *The Oxoid Manual* (2006) 9th Edition, Hampshire. Disponible en http://www.hemakim.com.tr/files/catalogs/OXOID_MANUAL_9th_Edition.pdf 624 p. Fecha de consulta: 30 de setiembre de 2012.
56. Trinchet, C., Trinchet, R. (2007) La definición del problema: el paso primero y fundamental del proceso de investigación científica. *Acimed* 16 (2). Disponible en: bvs.sld.cu/revistas Fecha de consulta: 23 de agosto de 2012.
57. Vollmer, G., Schenker, D., Sturm, W. (1999) *Elementos de bromatología descriptiva*. Zaragoza, Acribia. 672 p.
58. Warris, P.D. (2000) *Meat Science: An introductory text*. Nueva York, CABI, 297 p.
59. Wirth, F. (1987) Tecnología para la transformación de carne de calidad anormal. *Fleischwirtschaft (Español)*; 1:22-28.

60. Wood, J. D. (1990) Consequences for meat quality of reducing carcass fatness. En: Reducing fat in meat animals, Wood, J.D. y Fisher, A. V., London, Elsevier Applied Science, p. 344 – 397.
61. Catálogo de Medios de Cultivo. Disponible en: www.biocen.cu/producto/indicemc/ Fecha de consulta: 17 de noviembre de 2012.
62. Manual de Cortes Bovinos para Abasto. Disponible en: <http://www.inac.gub.uy/> Fecha de consulta: 26 de noviembre de 2013.
63. Medios de cultivo. Disponible en: www.master-gp.com/ Fecha de consulta: 15 de noviembre de 2012.