

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE CARNE BOVINA ENVASADA AL VACÍO Y
REFRIGERADA**

por

**Fátima Marcela HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
María Victoria SCHNECK CASTERA**

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

MODALIDAD: Estudio de caso

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

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

Cuarto miembro

Dr. José Piaggio

Fecha

29 de abril de 2016

Autores

Fátima Marcela Hernández Fernández

María Victoria Schneck Castera

AGRADECIMIENTOS

A Cristina López y José “Pepe” Piaggio por la oportunidad de tenerlos como tutores, por su apoyo, por los conocimientos brindados, por su tiempo y dedicación.

A la Facultad de Veterinaria – UdelaR, por darnos la posibilidad de poder tener un título universitario, herramienta fundamental que tendremos para toda la vida.

A Ariel Aldrovandi por su colaboración durante nuestro trabajo en el laboratorio.

A los diferentes docentes, estudiantes y funcionarios, que siempre vamos a tener un grato recuerdo de ellos, por acompañarnos en este camino.

A nuestras amigas y amigos que han sido nuestra compañía y apoyo a lo largo de toda la carrera en las buenas y en las malas, formando así nuestra segunda gran familia.

A nuestros padres y hermanos que también nos han acompañado y nos han guiado para ser las personas que hoy somos. Pero muy especialmente agradecemos a nuestros abuelos, pilares fundamentales en nuestras vidas.

Gracias a todos, este logro también es de ustedes.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
1. RESUMEN	8
2. SUMMARY.....	9
3. INTRODUCCIÓN	10
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
4.1 Historia de la ganadería uruguaya	12
4.2 Datos actuales de exportación	12
4.3 La carne como alimento	13
4.4 Composición química de la carne.....	14
4.5 Estructura y bioquímica de musculo “in vivo”	17
4.6 Conversión del musculo en carne.....	18
4.7 Calidad.....	19
4.7.1 Características de la calidad de las carnes	22
4.7.2 Factores que afectan la calidad	23
4.8 Contaminación de la carne.....	24
4.9 Alteración de la carne	25
4.9.1 Crecimiento y reproducción de las bacterias	26
4.9.2 Factores que afectan el crecimiento de los microorganismos	27
4.10 Conservación en refrigeración	29
4.11 Envasado al vacío	30
4.11.1 El empaque.....	32
4.11.2 El vacío.....	32
4.11.3 Termocontracción	33
4.12 Vida útil de los cortes envasados al vacío	34
4.13 Descripción de los microorganismos estudiados.....	35
4.14 Límites microbiológicos.....	36
5. OBJETIVO	37
5.1 Objetivo general	37
5.2 Objetivos específicos.....	37
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
6.1 Materiales	38
6.2 Obtención de las muestras/Plan de muestreo.....	38
6.3 Procesamiento de las muestras	39

6.4 Técnicas microbiológicas	40
6.5 Medición de pH.....	42
6.6 Análisis estadístico	42
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
8. CONCLUSIONES	58
9. BIBLIOGRAFÍA	59

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas	Página
Tabla 1: Composición química del músculo después del rigor mortis y antes de los cambios degenerativos <i>postmortem</i> . Extraído de Lawrie (1977).....	16
Tabla 2: Inspección según INAC de algunos parámetros de carne sin hueso. Extraído de INAC (2009)	21
Tabla 3: Criterios de inspección según INAC del envasado al vacío. Extraído de INAC (2009).....	21
Tabla 4: Clasificación de las bacterias según su temperatura de crecimiento. Extraído de Price y Schweigert (1994).....	27
Tabla 5: Límites microbiológicos nacionales e internacionales.....	36
Tabla 6: Bacterias estudiadas, medios de cultivo y sus utilidades.....	40
Tabla 7: Media y error estándar del Log ufc/g de Aerobios Mesófilos totales.....	46
Tabla 8: Media y error estándar del Log ufc/g de Coliformes totales.....	50
Tabla 9: Media y error estándar del Log ufc/g de <i>Brochothrix thermosphacta</i>	53

Figuras	Página
Figura 1: Estructura de la fibra muscular y diagrama de un sarcómero. Extraído de Bielli (2010).....	17
Figura 2: Técnicas de siembra en placa. Extraído de Moreno (2006).....	42
Figura 3: Recuento bacteriano de Aerobios mesófilos totales al día 0 (según Planta Frigorífica).....	44
Figura 4: Recuento bacteriano de Aerobios Mesófilos totales, en los 120 días, expresado en logaritmo decimal.....	47
Figura 5: Evolución del recuento bacteriano de Aerobios Mesófilos totales, en los 120 días de estudio expresado en logaritmo decimal.....	49

Figura 6: Recuento de Coliformes expresado en logaritmo decimal en los 120 días de análisis.....	51
Figura 7: Evolución del recuento bacteriano de Coliformes, en los 120 días de estudio expresado en logaritmo decimal.....	52
Figura 8: Recuento de <i>Brochothrix thermosphacta</i> expresado en logaritmo decimal en los 120 días de análisis.....	54
Figura 9: Evolución del recuento bacteriano de <i>Brochothrix thermosphacta</i> , en los 120 días de estudio expresado en logaritmo decimal.....	55
Figura 10: Temperaturas tomadas en el centro térmico de las muestras en cada uno de los días de análisis.....	56

1. RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el crecimiento bacteriano de microorganismos indicadores de calidad higiénico-sanitaria y microorganismos alterantes en carne bovina refrigerada (0-4°C) y envasada al vacío. Se realizó la detección y cuantificación de *Aerobios mesófilos totales*, *Coliformes totales* y *Brochothrix thermosphacta* durante un periodo de 120 días, y mediante estos se estudió a que tiempo se manifestó la alteración por la carga microbiana. Se utilizaron 90 muestras de bife angosto "*Longissimus dors*" provenientes de dos plantas de faena habilitadas para exportación, las cuales se envasaron al vacío y se mantuvieron bajo condiciones de refrigeración. Los análisis de las muestras fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria - Universidad de la República, el día 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120. Se evaluó el crecimiento de los microorganismos citados previamente, el mantenimiento o pérdida de vacío, la temperatura y la presencia o no de olor al abrir la bolsa de cada uno de las muestras. Los medios de cultivo utilizados para dichos análisis fueron, Plate Count Agar (PCA) para el recuento estándar en placa de microorganismos Aerobios mesófilos; Agar Bilis Rojo Neutro (VRBA) para el recuento directo de Coliformes en placa y Streptomycin Thallium Acetate Actidione Agar (STAA) para el recuento en placa de *Brochothrix thermosphacta*. Se realizó medición de pH con pH-metro al día 0 en las plantas de faena y al día 120 en el laboratorio. Se transformaron los recuentos obtenidos a logaritmo decimal para luego realizar la estadística descriptiva de los mismos. La temperatura se mantuvo controlada durante todo el periodo de análisis dentro de la temperatura de refrigeración (0-4°C). Se obtuvieron recuentos bajos en los primeros días de análisis y comenzaron a aumentar notoriamente entre el día 45 y 60 teniendo un aumento paulatino y constante hacia el final del análisis en donde los recuentos fueron máximos. Al día 120 las medias de las muestras de ambos frigoríficos fue de 7.19 log ufc/g para Aerobios mesófilos totales, 1.13 log ufc/g para Coliformes y 2.32 log ufc/g para *Brochothrix thermosphacta*. Concluyendo el presente estudio, podemos decir que todos los microorganismos estudiados obtuvieron recuentos iniciales dentro de los límites aceptados a nivel nacional e internacional para el día cero. En cuanto a Aerobios mesófilos totales su media superó el límite de 7 log ufc/g para ambos frigoríficos al día 120 de estudio. Los Coliformes en cambio no llegaron al límite de 2 log ufc/g si consideramos la media de ambos frigoríficos. *Brochothrix thermosphacta* aumento hacia el final del estudio como era de esperar, ya que es una bacteria alterante. Estos recuentos se produjeron gracias a las buenas condiciones de almacenamiento, la baja carga inicial de los microorganismos, el pH adecuado luego de la maduración y el correcto envasado al vacío.

2. SUMMARY

The present study had as main objective to evaluate the bacterial growth of microorganisms indicating hygienic-sanitary quality and spoilage in chilled (0-4°C) and vacuum packed beef. We performed the detection and quantitation of total Aerobic mesophilic, total Coliforms and *Brochothrix thermosphacta* for a 120 days, based on the previous studies we researched on when the alteration due to bacterial load was manifested. Ninety striploin (*Longissimus dorsi*) samples from two different slaughter plants authorized to export were used. Those samples were vacuum packed and kept under refrigerated conditions. Analyses of samples were performed in the Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria - Universidad de la República on days 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120. Growth of microorganisms previously mentioned was evaluated together with the maintenance or loss of vacuum, temperature and the presence or absence of odor when opening the bag of each sample. The growth medium used for these analyses were: Plate Count Agar (PCA) for the standard plate count of Aerobic mesophilic microorganisms, *Violet Red Bile Agar (VRBA)* for direct Coliform count plate and Streptomycin Thallium Acetate Actidione Agar (STAA) for plate count of *Brochothrix thermosphacta*. pH measurement was performed with pH meter at day 0 in slaughter plants and 120 days in the laboratory. Counts obtained were transformed into decimal logarithm and descriptive statistics of them were performed. Temperature was kept controlled throughout the analysis period within the cooling temperature (0-4°C). Low counts were obtained in the early days of analysis and began to increase markedly between day 45 and 60 having a gradual and steady increase towards the end of the analysis where counts were highest. On day 120 averages of both slaughterhouses were 7.19 log ufc /g for Aerobic mesophilic, 1.13 log ufc/g for Coliforms and 2.32 log ufc/g for *Brochothrix thermosphacta*. In conclusion, we can say that all microorganisms studied obtained initial counts (day 0) within the accepted national and international limits. In terms of total aerobic mesophilic, its average exceeded the limit of 7log cfu/g for both slaughter plants on day 120. By the other side, Coliforms did not reach the limit of 2 log cfu/g considering the average of both slaughter plants. *Brochothrix thermosphacta* increased towards the end of the study as it was expected, since it is an alterative bacteria. These counts were produced thanks to the good storage conditions, low initial load of microorganisms, proper pH after maturation and proper vacuum packaging.

3. INTRODUCCIÓN

Uruguay se encuentra entre los seis principales exportadores de carne bovina, esto es debido a la calidad de sus productos, la misma le permite acceder a más de 120 países. Entre los mercados que se destacan se encuentran NAFTA (EEUU, Canadá y México), Unión Europea, MERCOSUR, resto de Europa, Asia (República Popular China e Israel) entre otros, exportando 252.572 toneladas peso embarque (INAC). El valor agregado de nuestros productos cárnicos podría ser adjudicado al trabajo constante en los diferentes eslabones de la cadena agroindustrial. Estos eslabones contribuyen a obtener un producto de calidad superior. Uruguay puede garantizarle a sus consumidores, gracias a la trazabilidad grupal e individual, información sobre el producto en toda la cadena agroindustrial, lo que da garantías sanitarias y de inocuidad de la carne.

La exportación a un alto número de mercados implica satisfacer las exigencias de los compradores. Además de las exigencias existe la necesidad de exportar productos de alta calidad como lo es la carne refrigerada. La exportación de este producto a largas distancias, lleva un mejoramiento continuo de los procesos tecnológicos para la conservación de la carne. El tiempo de vida útil de la carne juega un rol fundamental en esto, por ello la importancia de los estudios que aseguren al comprador obtener productos inocuos.

La carne apta para consumo humano se produce en las plantas de faena habilitadas con servicio de Inspección Veterinaria Oficial, que excluye de la cadena alimentaria la carne de animales enfermos, si existiesen. La carne debe ser protegida de la contaminación que se puede producir en los siguientes procesos como almacenamiento y transporte mediante diferentes medidas de higiene. Debido a que este producto es un medio rico para el crecimiento de algunos microorganismos que producen su alteración, es importante la utilización de métodos de conservación como la refrigeración y la modificación del medio ambiente, que frenan el deterioro y determinan la vida útil del producto. (Bell y Garout, 1994)

La carne se compone principalmente por agua, proteínas, lípidos e hidratos de carbono, que le proporcionan las características químicas a la misma. Debido a estos componentes y su biología, la carne desde el momento del sacrificio hasta ser consumida, sufre un proceso de deterioro, por parte de las bacterias siendo el control de estas el factor más importante para conservar la calidad de la carne fresca. Otro factor de suma importancia es la temperatura a la que se va a conservar la misma, ya que por ejemplo si se conservara a temperatura ambiente (20-30°C) su vida útil sería de un día, pero si la refrigeramos a menos de 4°C la vida útil se extendería. (Lambert et al., 1991)

La vida útil de carne vacuna envasada al vacío tiene un óptimo de 9 a 15 semanas si se almacena cercano a las 0°C. (Tewar et al, citado por Lee y Yoon, 2001) Para

muchos países, la importación de carne refrigerada no era viable, por la duración de los viajes y la corta vida útil de los cortes. Actualmente en todo el mundo los consumidores tienen tendencia a optar por cortes de carne refrigerada antes que congelada (la cual tiene una mayor vida útil). El envasado al vacío junto con el almacenamiento a temperaturas bajas proporciona una extensión de la vida útil, para poder soportar el largo plazo de transporte que tienen estos cortes cuando se exportan en barcos en contenedores refrigerados a otros continentes. (Lee y Yoon, 2001)

Considerando todos estos aspectos es que se realizó este trabajo, el cual evalúa los microorganismos en cortes de carne refrigerada y envasada al vacío que se utilizan para la exportación. Esto es de utilidad para demostrar la calidad microbiológica de nuestros productos. De esta manera se asegura a los consumidores de los países a los que se destina nuestra carne, que esta es apta para el consumo y cumple con las condiciones higiénico-sanitarias que necesita. De esta forma se apuesta a que Uruguay continúe con este lineamiento de mercados de alta calidad y pueda abrir nuevas rutas de comercialización de nuestros productos.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Historia de la ganadería uruguaya

La carne es protagonista de la historia de nuestro país desde sus orígenes, representando uno de los productos más importantes en la economía y la sociedad uruguaya. Desde el siglo XVII con la llegada de Hernando Arias de Saavedra (Hernandarias) con tropas de ganado vacuno y equino a nuestras tierras se produjo la repoblación de la Banda Oriental y se comenzaron a explotar nuevos recursos. Para España en ese entonces nuestras tierras eran las “tierras sin ningún provecho” por carecer de oro, pero en ella esos animales se reprodujeron por todo el territorio siendo años después una importante riqueza para nuestro país.

Lo primero que se utilizó fue el cuero y fue el único producto que se exportó por gran parte de este siglo. Así una serie de hechos van marcando la historia de la ganadería uruguaya, donde en 1778 se comienza a utilizar la carne con fines comerciales. Se instala años después el primer saladero y posteriormente comienza a funcionar el primer matadero.

Un hecho que nos llama la atención es que en el año 1876 llega al Río de la Plata el Barco “Le Frigorifique”, momento importante, ya que a partir de este hecho fue que se hizo posible conservar y exportar carne refrigerada a Europa.

4.2 Datos actuales de exportación

Según el Informe estadístico de INAC del ejercicio 2014-2015 la faena de bovinos en los establecimientos habilitados a nivel nacional fue de 2.126.293 cabezas de ganado, representado en un 50% la faena de novillos y en un 48% las de vacas.

En ese mismo periodo (2014-2015) se exportaron a los diferentes mercados que accede el Uruguay 252.572 toneladas peso embarque. Esto equivale a 1.471.535 miles de dólares, de los cuales la gran parte corresponden a carne congelada, pero 371.901 miles de dólares son los ingresos por carne enfriada. El porcentaje restante se adjudica al resto de los productos cárnicos.

Considerando otros datos, en el ejercicio 2013-2014, Uruguay vendió carne congelada a un valor promedio de 4.800 dólares la tonelada mientras que la carne enfriada tuvo un valor promedio de 9.700 dólares la tonelada, lo que demuestra que estos cortes enfriados duplican en valor a los congelados.

Es importante para la industria y para el país abastecer a nuestros compradores con productos de buena calidad y poder garantizar que lleguen a destino siendo aptos para su consumo.

Dentro de la carne refrigerada que se exporta se encuentra la cuota Hilton. La cuota Hilton es un contingente arancelario de la Unión Europea (U.E.) que se originó en el año 1980 en la Ronda Tokio del GATT (General Agreement on Tariffs and Trade/ Acuerdo General sobre Aranceles aduaneros y Comercio). Las exigencias de dicha cuota están establecidas en el INS - HILTON - UE N° 593/2013. (INAC). Dicha cuota o cupo comprende cortes de carne bovina de alta calidad refrigerada (Hilton beef). Estos deben ser de animales bovinos de 22 a 24 meses, con dos dientes incisivos permanentes, que al momento de la faena no pesen más de 460 kilogramos vivos y se hayan alimentado exclusivamente con pasturas. Son siete cortes diferentes que incluye la cuota Hilton entre los que se encuentra el bife angosto.

4.3 La carne como alimento

La carne según el Reglamento Bromatológico Nacional - Decreto N° 315/994 “es la parte muscular comestible de bovinos, ovinos, caprinos, suinos, equinos, aves y conejos, declarada apta para la alimentación humana por la inspección veterinaria oficial, antes y después de la faena, constituida por todos los tejidos que rodean el esqueleto, incluyendo su cobertura grasa, tendones, vasos nerviosos, aponeurosis, ligamentos, cartílagos y todos aquellos tejidos no separados durante la operación de faena. Además se considera carne el diafragma, no así el corazón, el esófago, la lengua y los músculos del aparato hioideo.

El término carne por extensión se aplica también a los productos de caza, aves o mamíferos, que se comercializan tradicionalmente para la alimentación humana”

Por otro lado, según Castro (2002), un alimento ideal debe cumplir con 4 requisitos los cuales son explicados a continuación:

- Completo, para satisfacer las necesidades de los consumidores en cuanto a la calidad y cantidad y que cuente con las principales fuentes nutricionales como el agua, los hidratos de carbono, las grasas, las proteínas, las vitaminas y las sales minerales.
- Grato al paladar, de gran importancia para los consumidores.
- Digestible, para que dure en el tracto gastrointestinal el tiempo necesario para lograr así un mayor aprovechamiento de dicho alimento.
- Económico, con el objetivo de llegar a la mayor cantidad de consumidores posibles.

4.4 Composición química de la carne.

Si realizamos una subdivisión del tejido muscular, la composición del mismo será aproximadamente la siguiente:

- **Agua 75%:** es el mayor componente del tejido muscular, la proporción de la misma varía con la edad del animal entre otros factores, siendo mayor en animales jóvenes y disminuyendo en animales viejos.

- **Proteínas 18%:** Las proteínas están compuestas por aminoácidos encadenados entre sí para formar cadenas proteicas. Son las sustancias de contenido nitrogenado que se encuentran en el músculo. Durante los cambios postmortem, en los que el músculo se convierte en carne, las proteínas cumplen un rol esencial. Estas son de alto valor biológico ya que contienen los aminoácidos esenciales necesarios para el organismo, tanto en cantidad como calidad (Price y Schweigert, 1994). Según Niinivaara y Antila, (1973), el 44,9% de los aminoácidos de las proteínas totales de la carne, corresponden a los aminoácidos esenciales en el novillo y el 43,1% en la vaca, estudiado en el musculo *Longissimus dorsi*. Dentro de estos aminoácidos se encuentran la leucina, lisina, isoleucina, fenilalanina, entre otros.

Según su localización podemos clasificar a las proteínas del músculo en:

- las que forman parte del aparato contráctil: proteínas miofibrilares (10% del músculo). Son proteínas solubles, que proporcionan rigidez al músculo y convierten la energía química a energía mecánica siendo las principales la actina y miosina.
 - las que se encuentran en el sarcoplasma (6%): como enzimas metabólicas, el pigmento mioglobina y los componentes proteicos del núcleo y lisosomas.
 - y finalmente las proteínas del tejido conectivo (2%) que se encuentran fuera de la fibra muscular. Estas ofrecen rigidez, se relacionan posteriormente con la dureza de la carne y proporciona sostén junto con el esqueleto del animal, ya que cubren órganos, conectan los músculos y huesos, además forman parte de varias estructuras del organismo.
(Ockerman, 1981; Price y Schweigert, 1994).
- **Grasas 3%** aproximadamente: la cantidad y calidad de estas varían según especie, sexo, edad, género, raza, alimentación, región anatómica del corte, etc. En la canal de ternero listo para faena corresponde a un 18-30%. Los triglicéridos componen la mayor porción de la fracción de lípidos, dado por la unión de tres ácidos grasos con el glicerol.

La grasa que está relacionada con el tejido muscular puede estar ubicada intra o intermuscularmente. La intramuscular que se conoce como “veteado” o “marmoleado”, corresponde a los adipocitos del tejido conectivo laxo que se encuentran entre las fibras musculares. El bife angosto (*Longissimus dorsi*) tiene aproximadamente 2,5% de grasa intramuscular (Grompone, 2010).

Esta juega un rol importante en la palatabilidad, jugosidad, ternura entre otros, como por ejemplo las reacciones químicas que se pueden producir en ellas, como la oxidación que causa la rancidez de las grasas y el deterioro de la carne.

- **Sustancias solubles no proteicas 3,5%:** en las que se encuentran la creatina, creatinina y purinas las que le otorgan sabor a la carne. La cantidad de carbohidratos como el glucógeno y glucosa, depende en gran medida del estado general del animal previo al sacrificio. El glucógeno se encuentra en mayor porcentaje en carnes de animales en buen estado. Este es de gran importancia en la calidad de la carne, debido a que es utilizado para producir ácido láctico y así disminuir el pH de la misma. Suele encontrarse mayor proporción de carbohidratos en las vísceras comestibles como el hígado que en la carne. (Niinivaara y Antila, 1973).
- **Vitaminas y minerales 0,5%:** principalmente del complejo B como la tiamina y riboflavina y los minerales como el hierro, fosforo y potasio.

Tabla 1: Composición química del músculo después del rigor mortis y antes de los cambios degenerativos postmortem. Fuente: (Lawrie, 1977)

Agua		75%
Proteínas		18%
Miofibrilar	{ miosina, tropomiosina, troponinas, α y β actinas, sustancia M actina	7,5% 2,5%
Sarcolpásmicas	{ miógeno, globulinas mioglobina hemoglobina	5,6% 0,36% 0,04%
Mitocondrial	{ citrocromo C	0,002%
Retículo Sarcolpásmico Sarcolémica Tejido conectivo	{ colágeno elastina "reticulina" enzimas insolubles	2,0%
Grasas		3%
Sustancias solubles no proteicas		3,5%
Nitrogenadas	{ creatina monofosfato de inosina di- y tri-fosfopiridin nucleótidos aminoácidos carnosina, anserina	0,55% 0,30% 0,07% 0,35% 0,30%
Carbohidratadas	{ ácido láctico glucosa-6-fosfato glucógeno glucosa	0,90% 0,17% 0,10% 0,01%
Inorgánicas	{ fósforo soluble total potasio sodio magnesio calcio zinc	0,20% 0,35% 0,05% 0,02% 0,007% 0,005%
Trazas de intermediarios glucolíticos, metales trazas, vitaminas, etc.		0,1%

4.5 Estructura y bioquímica del músculo “in vivo”

El músculo esquelético estriado constituye una gran parte de la masa muscular de los bovinos. Está compuesto por fascículos, fibras, fibrillas y filamentos. Las fibras son las unidades fundamentales del músculo, son células multinucleadas y muy largas. El color rojo está dado por un pigmento soluble que se encuentra en el interior de la fibra -la mioglobina-. (Swatland, 1991).

Estas fibras tienen dos tipos de estriaciones, las longitudinales por la orientación de las células y las transversales dadas por las bandas A (oscuras) y bandas I (claras). Las zonas H, divide en dos partes a cada banda A y la zona Z divide en dos a cada banda I (Figura 1). En cuanto a las fibrillas, estas son largas estructuras constituidas por miles de sarcómeros, que se extiende entre dos líneas Z y también están constituidas por filamentos paralelos de los cuales hay dos tipos, los filamentos gruesos (compuestos por miosina) y los finos (actina principalmente) que determinan la estructura del sarcómero y de las bandas A e I. (Bielli, 2010)

En la contracción, los filamentos gruesos se desplazan sobre los finos, este proceso necesita de energía para producirse, proporcionada por el ATP el cual sufre un proceso de hidrólisis para liberar la energía. Cuando el músculo se convierte en carne, no dispone de ATP, por lo que los filamentos quedan trabados y se produce el llamado rigor mortis. (Swatland, 1991)

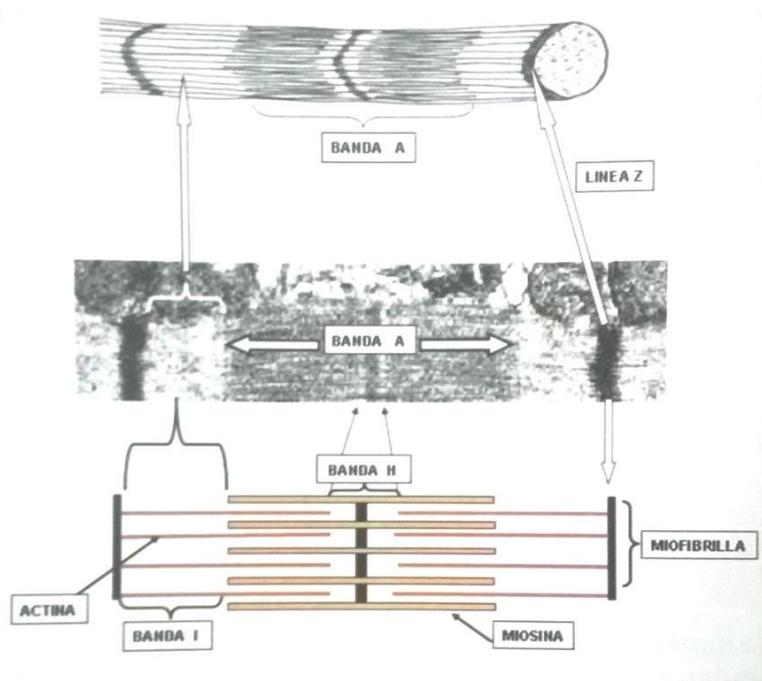


Figura 1: Estructura de la fibra muscular y diagrama de un sarcómero.

Fuente: Bielli, (2010)

4.6 Conversión del musculo en carne

Luego de que los animales son sacrificados se da lugar a procesos químicos y físicos que se producen en el músculo para convertirse en carne.

Al momento del sacrificio del animal, es importante extraer de la canal toda la sangre posible para obtener carne de buena calidad. De lo contrario la sangre residual le da un mal aspecto a la carne y es un buen medio de cultivo para los microorganismos.

La insensibilización es obligatoria antes del desangrado excepto en sacrificios rituales. Cuando se realiza la insensibilización con cualquiera de los métodos autorizados, no se debe destruir el bulbo raquídeo ya que los centros que allí se encuentran (que controlan el corazón y los pulmones) deben actuar para facilitar la expulsión de la sangre luego del degüello.

Cuando se produce la muerte del animal se desencadenan tres reacciones: la estimulación del sistema nervioso central, la anoxia y la liberación de catecolaminas. (Anón, 1971, citado por Lawrie, 1977).

El sangrado se realiza seccionando la arteria carótida y la vena yugular. Se produce un descenso de la presión sanguínea, aumenta el bombeo cardiaco para mantener irrigados los órganos vitales y los vasos periféricos se contraen con el mismo fin (Mateauda, 2013) facilitando el desangrado completo del animal.

El cambio inmediato que ocurre luego del desangrado del animal, es el fallo en el aporte de oxígeno proveniente de la sangre a los músculos (fallo circulatorio). No se sintetiza más ATP de la ATP-asa de la miosina. La energía va a provenir entonces de la ATP-asa del sarcoplasma, y se produce simultáneamente fosfato inorgánico que estimula la degradación del glucógeno a ácido láctico. El ácido láctico produce el descenso del pH. Comienza entonces, la resíntesis de ATP por glucólisis anaeróbica, siendo un proceso poco eficaz en el tiempo, por lo que continúa descendiendo el ATP y se forma actomiosina; así, es que aparece el rigor mortis. (Lawrie, 1977).

La carne de vacuno, para que finalice el rigor mortis y así recuperar su terneza ideal, necesita de varias horas de maduración luego del sacrificio a temperatura ligeramente superior al punto de congelación. (Swatland, 1991).

El principal cambio en la carne que se produce en las primera 24-36 hrs en la etapa de maduración, es la glucólisis postmortem, donde se alcanza el pH final. En este proceso se desnaturalizan las proteínas porque se someten a un pH inferior (próximo a 5,6) al que tenía el tejido vivo (pH 7 aproximadamente). Las proteínas también se desnaturalizan debido a las temperaturas bajas, a la desecación entre otros. El colágeno y la elastina son las únicas proteínas que no se desnaturalizan postmortem. (Lawrie, 1977)

El proceso de maduración sanitaria de las canales es también muy importante porque con pH por debajo de 5,8 denominado “zona de protección ácida” se logra la inactivación del virus de la Fiebre Aftosa. Es una exigencia sanitaria de mercados como Estados Unidos, Unión Europea, entre otros a los que Uruguay exporta. (INAC)

En el músculo *longissimus dorsi* del vacuno, cuando faenamos animales bien alimentados y no estresados, el pH cae de 7,2 hasta 5,5 aproximadamente. (Warriss, 2003)

La conversión del músculo en carne se completa cuando se agotan las reservas energéticas de los músculos o pierde la capacidad de utilizar la reserva energética que les queda. (Swatland, 1991)

4.7 Calidad

Según INAC, Calidad de la carne es, el “conjunto de características de la carne que satisfacen las expectativas del consumidor. Hay factores de calidad, que son aquellos que en conjunto determinan la calidad de la carne: propiedades nutritivas que la carne lleva implícitas; propiedades higiénico-sanitarias que hacen a la inocuidad alimentaria; propiedades sensoriales tales como color, terneza, jugosidad, aroma y sabor; factores cuantitativos como ser la relación entre cantidad de carne magra y grasa. Hay factores de influencia, que no son en sí mismos características de calidad, pero que influyen sobre ellas: características intrínsecas del animal dadas por raza, categoría y edad; condiciones de producción, como manejo y alimentación; el manejo antemortem; condiciones de industrialización, que implican las tecnologías aplicadas; condiciones de almacenamiento y transporte; preparación culinaria. La calidad de la carne se va integrando a la misma a lo largo de todo el proceso de producción, industrialización, comercialización y consumo”.

Se define calidad como el conjunto de características de un producto o servicio que satisfacen los deseos explícitos y/o implícitos del consumidor. (Castro, 2002).

La gran demanda internacional como la nacional ha llevado a que se pongan en práctica políticas y estándares de análisis y aplicación de protocolos con un diseño conveniente que garantice la calidad de los productos. El Codex Alimentarius, y la norma ISO 22.000 son algunos de los ejemplos de normas, buenas prácticas y otras recomendaciones importantes a tener en cuenta.

Las principales características sensoriales de calidad son color, jugosidad, terneza y flavor, que son medidos por los seres humanos al momento del consumo o por paneles capacitados para realizar una evaluación sensorial del alimento. Para aceptar o rechazar un producto, primero se debe visualizar la carne en su envase

para luego utilizar los sentidos del gusto, olfato y tacto cuando se corta la carne y se produce el acto de la masticación en la boca para la aceptación o no final del producto (Miller, 2010).

El Instituto Nacional de Carnes (INAC), tiene competencias en la fijación de normas de calidad y especificaciones técnicas con el fin de exportar con niveles de calidad aceptables. Para esto, es que realiza inspección de la producción en diferentes puntos de la faena con el objetivo de obtener un producto final que reúna las condiciones de calidad necesarias. En la sala de desosado donde obtenemos el producto de nuestro estudio los puntos de control son: en el lugar de entrada de la materia prima, una vez terminado de preparar el corte en la mesa de charqueo y al final de la línea de producción. (INAC, 2009)

En el manual de control de calidad de INAC también se describen criterios a utilizar para evaluar los defectos que afectan la calidad de los productos con hueso, sin hueso y sus envases. Es importante realizar ciertas definiciones, para luego entender las tablas 2 y 3, donde se muestran algunos de los criterios que presentan las normas de inspección de INAC de carne sin hueso y envasado al vacío:

Defecto crítico: cuando puede producir peligro, inseguridad o impide que se lleve a cabo la función normal del producto.

Defecto mayor: tiene la probabilidad de ocasionar una falla o reducir el uso del producto.

Defecto menor: se produce una pequeña desviación de los requisitos por lo que tiene pequeño efecto en la función y el uso.

Tabla 2: *inspección según INAC de algunos parámetros de carne sin hueso.*

Fuente: (INAC, 2009)

	Defecto menor	Defecto mayor	Defecto crítico
Huesos	Aserrín, superficie < 9 cm ²	Hueso < 1 cm. de longitud y Aserrín, superficie > 9 cm ² y	Hueso > 1cm. de longitud. Aserrín superficie > 15 cm ²
Ligamento / Cartílago	< 1 cm. de longitud.	> 1 cm. de long. o + de 5 unidades.	
Machucamiento (Hematomas)	Machucamiento o coágulo < 4 cm. de long.	Machucamiento o coágulo > 4 cm. de long.y < 10 cm. de superficie, profundidad 2 cm	Machucamiento o coágulo > 10 cm. de superficie y profundidad 5 cm. Petequias/ equimosis: generalizadas.
Encuadre	Variación < 10% del estándar	Variación > 10% del estándar	
Prolijidad	Desgarro o corte de longitud y profundidad < 10% de la dimensión del corte.	Desgarro o corte en longitud y profundidad > 10% de la dimensión del corte.	

Tabla 3: *Criterios de inspección según INAC del envase al vacío*

Fuente: (INAC, 2009)

	Defecto menor	Defecto mayor	Defecto crítico
Vacío	Pequeñas burbujas de aire en el jugo.	Presencia de aire entre el producto y la bolsa.	Falla total del vacío.
Termo contracción	Bolsa con arrugas menores.	Bolsa con arrugas mayores.	
Sellado	A menos de 3 cm. o más de 8 cm. del producto.	Pequeña falla que potencialmente puede permitir el ingreso de aire.	Soldadura de la bolsa que se desprende al ser traccionada con los dedos
Presentación	Corte deformado o arrugado que no afecta presentación.	Corte deformado o arrugado que afecta presentación.	

4.7.1 Características de la calidad de las carnes.

- **Color:** brindado por la mioglobina (pigmento de la carne). El color varía según diferentes factores como el pH, edad (cuanto menor edad, menos cantidad de mioglobina), sexo, proceso industrial, tipo de envasado entre otros. Es uno de los cambios más variables y que más se identifican. De todos los factores mencionados, el que produce más variación del color de forma natural es la edad, debido a la pérdida de afinidad por el oxígeno de la mioglobina. Se necesita más mioglobina para mantener la transferencia de oxígeno al músculo, por lo que animales con más edad tendrán un color más oscuro en la carne.

Las principales diferencias observadas en el color de la carne están dadas por el estado químico en que se encuentra la mioglobina. Cuando tenemos mioglobina, el color es rojo púrpura. Cuando en el proceso de oxigenación, la mioglobina se transforma a oximioglobina, la carne queda de color rojo brillante para luego, por el proceso de oxidación, pasar a metamioglobina quedando con un color marrón. (Lawrie, 1977)

- **Sabor:** es una característica sensorial de la carne con un papel fundamental en la calidad, por ser un ítem crítico en cuanto a la aceptación o rechazo del producto por el consumidor junto con el aroma que presenta.
- **Jugosidad:** es la cantidad de “jugo” exprimible producido por la masticación. Tiene relación directa con: la edad que presenta el animal al momento de la faena, al proceso de conservación empleado por la capacidad de retención de agua y también tiene gran influencia el porcentaje de grasa que contenga el corte. La jugosidad tiene gran importancia en la calidad, ya que la valoración de los consumidores es más positiva en carnes jugosas que en carnes secas.
- **Terneza:** constituida por las proteínas del músculo, influyendo en esta característica la raza, edad, sexo, diámetro de fibra y grasa etc. Se mide por la facilidad de segmentación que presenta la carne en la boca cuando se produce la masticación.
- **Inocuidad alimentaria:** busca garantizar la máxima seguridad de los alimentos, por lo que es de gran importancia sanitaria. Hoy en día es una característica de calidad de gran relevancia, ya que es una exigencia fundamental de los países a los que exportamos la mayoría de nuestros productos.

4.7.2 Factores que afectan la calidad

Las características deseables de la calidad de la carne pueden ser modificadas durante la conversión del músculo en carne, durante la refrigeración y el almacenamiento o maduración. Por lo tanto, un control adecuado de los procedimientos que mencionaremos a continuación mejoraría la calidad del producto final.

Un problema importante y frecuente relacionado con la calidad de la carne, es cuando la carne vacuna pierde su color característico, observándose cortes de color más oscuro luego que esta toma contacto con el oxígeno. Este aspecto oscuro, hace que la carne parezca de animales viejos, poco atractivos para el consumidor. Esto causa reducción del valor de la carne, y por lo tanto, importantes pérdidas económicas. Esta condición sería consecuencia principalmente, del estrés que sufren los animales previo al sacrificio, que haría que estos consuman sus reservas de glucógeno rápidamente. El glucógeno es un compuesto esencial para que una vez sacrificado el animal, el nivel de pH baje correctamente y de esta forma inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos que no se desarrollan a pH bajo. Existen varias situaciones de estrés que deberían de evitarse en el ganado vacuno como son: excitación por manejo inapropiado, estrés durante el transporte, mezcla de animales de distinta procedencia, mala alimentación, privación de agua, entre otros (Price y Schweigert, 1994).

El primer evento que influye sobre la calidad de la carne dentro de la playa de faena puede estar dado por la inmovilización y el aturdimiento del animal. Si no se realiza correctamente, se puede producir un estrés a corto plazo, produciendo aumento del metabolismo muscular y como consecuencia se obtienen carnes pálidas, blandas y exudativas por el descenso rápido del pH.

El rigor mortis también influye en este parámetro. Cuando se produce una mayor contracción muscular se afecta la terneza, jugosidad y el color de la carne, haciendo que el mismo sea más pálido. Si el pH desciende en el menor tiempo posible se producirá con mayor facilidad la terminación del rigor mortis.

Otro factor que puede afectar la calidad de la carne es la temperatura. Esta, tiene una incidencia directa sobre los procesos químicos, enzimáticos y microbiológicos que se producen en el músculo. Se debe considerar que el descenso de la temperatura de las reses, disminuye la pérdida de proteínas e inhibe el crecimiento microbiano. Rápidas reducciones de la temperatura pueden afectar la terneza dando carnes más duras. El frío acorta las fibras musculares ya que aumenta el calcio libre y los músculos se contraen más de lo normal.

Por último, tenemos la maduración que tiene efecto importante en la terneza, jugosidad y flavor. Las “calpaínas”, enzimas del músculo que rompen las proteínas

estructurales de la carne son las que producen la mejora en la terneza. El tiempo de almacenamiento prolongado puede afectar el flavor lo cual está relacionado directamente con el crecimiento de microorganismos sobre la canal.

4.8 Contaminación de la carne

La contaminación puede ser endógena, cuando se produce por microorganismos que llegan a la carne por infección en el animal vivo o puede ser una contaminación exógena, cuando la invasión de las bacterias se produce luego de la muerte del animal. Obviamente que de los dos tipos de contaminación mencionados, la alteración de la carne por microorganismos proveniente de la vía exógena es la más frecuente.

Desde el momento que se desangra el animal, hasta el momento que la carne llega a los consumidores, está expuesta a la contaminación microbiana. En la planta de faena son fuentes de contaminación: la piel de los animales, la suciedad que ella presenta, el contenido gastrointestinal en los casos que toma contacto con las carcasas cuando no se realizan bien las ligaduras, el aire, el agua cuando no es de buena calidad o cuando no se cumplen las exigencias establecidas, los utensilios como sierras, ganchos, cuchillos entre otros si no son lavados, desinfectados y esterilizados correctamente y el propio personal de la planta pueden ser fuentes de contaminación de las carcasas, a través de sus manos o su vestimenta. (Cárdenas y Giannuzzi, 2005).

Los microorganismos la mayor parte del tiempo se encuentran en la superficie de la carne, siendo dos los mecanismos de adhesión que se dan de manera consecutiva: primero las bacterias están en la superficie del tejido y pueden ser removidas por lavado para luego formarse polímeros adherentes y de esta forma las bacterias no son separadas por el agua y perduran en las canales. (Cárdenas y Giannuzzi, 2005)

La carga bacteriana en la profundidad de las canales de animales sanos, es nula o puede llegar a 100 microorganismos por gramo. En superficie al final del proceso de faena, si este se realiza bajo condiciones adecuadas de higiene, es de esperar entre 10^3 y 10^4 microorganismos/cm², pero si no se respetan las buenas practicas, puede llegar a valores de 10^6 . (Bem y Hechemann, 1996)

Se debe minimizar al máximo la contaminación de las canales en las plantas de faena y maximizar las medidas para evitar el desarrollo de microorganismos. Esto es beneficiado por un oreo adecuado, un enfriamiento lo más rápido posible y la correcta maduración de la carne para que descienda su pH en el tiempo necesario.

4.9 Alteración de la carne

Es relativamente corto el periodo en que los alimentos mantienen la frescura y las propiedades propias de su estado natural. La descomposición de la carne se produce por la degradación de proteínas, grasas y carbohidratos llevada a cabo por la acción de bacterias, mohos y levaduras. Los factores enzimáticos propios de alimento o de las bacterias, también colaboran con la alteración produciendo procesos de autólisis.

La conservación de los alimentos en las diversas formas que hoy en día existen evita la alteración, limitando la actividad bacteriana y los procesos enzimáticos y oxidativos que se producen.

Las bacterias, mohos y levaduras pueden ser afectados por factores como la temperatura, la humedad, el oxígeno, los nutrientes y la ausencia o presencia de inhibidores de crecimiento, por lo tanto el control de estos factores disminuye el crecimiento microbiano y prolonga la vida útil comercial de los productos.

Existen factores que prolongan la vida útil de la carne como son: la especie animal, la durabilidad de la carne fresca de vacunos es mayor; el pH, carnes con más acidez (pH 6,0 o menor) retrasan el tiempo de aparición del deterioro por acción bacteriana; y por último tenemos los factores externos del medio ambiente como son la temperatura, humedad y la higiene con la que fue preparada la carne (Jennings, 1981).

Durante muchos años se pensó que los animales sanos al sacrificio eran estériles, pero actualmente se sabe que los microorganismos Gram positivos son la mayor parte de la flora normal de los animales y que los Gram negativos son los microorganismos principales que producen la alteración de la carne. (Gracey, 1989)

Dentro de las bacterias Gram positivas que intervienen en el deterioro de la carne podemos nombrar a los *Micrococcus* alterantes de carnes saladas y refrigeradas que crecen a 25-30°C (temperatura óptima), los *Staphylococcus* que crecen a 37°C y por debajo de esta temperatura, los *Streptococcus* que son aerotolerantes con un crecimiento entre 10 y 45°C y los *Lactobacillus* que son bacterias mesófilas las cuales no se ven afectadas por la disminución de la tensión de oxígeno, entre otros. Dentro de los microorganismos Gram negativos encontramos las *Pseudomonas* productoras de limo o mucosidad, pigmentos y olores, *Flavobacterium* con algunos géneros psicrótrofos que dan lugar a coloraciones anormales y *Escherichia* la cual altera la carne por la fermentación de los carbohidratos. (Gracey, 1989; Cárdenas y Giannuzzi, 2005; Hernández- Macedo et al, 2011).

El deterioro también puede ser aerobio o anaerobio dependiendo de cuales sean las condiciones ideales para el crecimiento de cada microorganismo, ya que la

presencia de oxígeno va a condicionar el crecimiento de unos u otros. Cuando estamos bajo presencia de oxígeno, los microorganismos que crecen (aerobios) pueden alterar la carne modificando su olor, color, apariencia y sabor, debido a la oxidación de las grasas, alteración de los pigmentos o destrucción de vitaminas. Al envasar al vacío generamos un ambiente de anaerobiosis, donde estos microorganismos aerobios no van a crecer y así retardamos estas transformaciones. (Hernández- Macedo et al., 2011)

Los sistemas de refrigeración no inhiben la actividad de los microorganismos alterantes que crecen a 7°C o menos, pero es importante considerar que con temperaturas inferiores a 2°C se retrasa la formación de limo (Gracey, 1989)

Los microorganismos modifican la carne al satisfacer sus necesidades nutritivas. El limo superficial de la carne aparecerá más retardado en el tiempo cuanto menor sea el número de bacterias iniciales que lo producen. Los cambios de coloración de la carne pueden producirse por algunas bacterias que destruyen o alteran los pigmentos. Los olores pútridos se producen generalmente por bacterias anaerobias que descomponen proteínas y aminoácidos. Las razones por las cuales los gérmenes anaerobios producen olores más desagradables que los aerobios son debido a que los procesos de anaerobiosis producen menos energía que los aerobios y a que las sustancias de olor desagradable suelen liberarse especialmente bajo condiciones reductoras (Lawrie, 1977).

Cuando las bacterias se encuentran en su fase de crecimiento logarítmico comenzamos a constatar el deterioro de la carne. Los microorganismos al comienzo utilizan la glucosa, pero cuando este carbohidrato se consume, comienzan a degradar aminoácidos. Este proceso libera amonio y su aumento causa olores desagradables. Las principales bacterias alterantes son *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Enterobacter* y *Brochothrix thermosphacta*. (Cárdenas y Giannuzzi, 2005)

4.9.1 Crecimiento y reproducción de las bacterias

Las bacterias se reproducen de forma asexual, con división en dos del núcleo y citoplasma en donde se produce una separación por una membrana. Suelen reproducirse a un ritmo de una reproducción cada 20-30 minutos. Teniendo en cuenta esto, en algunas horas podemos tener miles de bacterias si están dadas todas las condiciones óptimas para su crecimiento. En la práctica, este ritmo de crecimiento se ve limitado si modificamos los factores como la temperatura, aireación, acidez del medio entre otros. (Forsythe y Hayes, 1999, Madrid, 2013)

Los microorganismos interactúan entre sí y con el medio ambiente, de tal forma que la velocidad de su crecimiento depende de las propiedades del medio que lo rodea y de la interacción con otros géneros bacterianos que crezcan en la superficie de la carne. (Cárdenas y Giannuzzi, 2005)

El crecimiento microbiano estudiado a lo largo del tiempo muestra una típica curva que se divide en diferentes etapas. La primera, es donde las bacterias se aclimatan al medio, luego se produce una fase de crecimiento logarítmico de las mismas, para posteriormente tener una etapa estacionaria en donde se mantienen viables pero la multiplicación es mínima. Por último, cuando se agotan los nutrientes del medio comienza la muerte de las colonias y se produce la fase de extinción de las mismas en donde desciende la curva.

4.9.2 Factores que afectan el crecimiento de los microorganismos

A partir del carbono, nitrógeno, vitaminas y otros componentes de la carne los microorganismos satisfacen sus necesidades básicas para su crecimiento. También son necesarios la temperatura, el agua, el pH, el potencial redox y la composición de la atmósfera. Todos estos factores se hayan relacionados, a pesar de que cada uno de ellos tiene una gran importancia individual, por lo que se divide para un mejor estudio en parámetros extrínsecos e intrínsecos:

Factores extrínsecos:

Temperatura: Es el factor que más afecta, por lo general cuanto más temperatura más velocidad de crecimiento. Los microorganismos que crecen en la carne fresca entre 3°C y 7°C son principalmente *Achromobacter* y *Pseudomonas*, y en la carne envasada a 5°C predomina *B. thermosphactum* produciendo la alteración (Lawrie, 1977).

El almacenamiento de las carnes a bajas temperaturas retrasa el crecimiento microbiano y así extiende su vida útil. Las bacterias se pueden clasificar según su temperatura de crecimiento, las cuales de detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de las bacterias según su temperatura de crecimiento.

Fuente: (Price y Schweigert, 1994)

	Temperatura de crecimiento (°C)		
	Mínimo	Óptimo	Máximo
Termófilos	38-45	55-80	60-90
Mesófilos	5-10	30-40	40-50
Psicrotrofos	-5-+5	25-30	30-35
Psicrófilos	-5-+5	10-15	15-20

Humedad: la superficie de carnes húmedas es muy apta para el desarrollo de cargas microbianas importantes que causan su deterioro. A una temperatura de -1 a 3°C la humedad relativa debe ser de 88-92%. El envasado impide la evaporación, por lo que en el interior del envase la humedad es mayor, dando mayor riesgo de crecimiento bacteriano. De todos modos este inconveniente en los envasados al vacío se compensa con otro factor extrínseco como la ausencia de oxígeno en el interior del envase.

Presencia o ausencia de oxígeno: este factor es importante ya que determina el tipo de microorganismo que crecerá. Estos microorganismos pueden ser: dependientes de oxígeno, llamados aerobios; los que pueden crecer en ausencia de este, anaerobios, y los denominados microorganismos facultativos, que pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno.

Normalmente los microorganismos aerobios como *Pseudomonas* y *Achromobacter*, crecen en la superficie de carnes refrigeradas, pero cuando la carne se envuelve en películas impermeables a gases cambia la composición de la atmósfera y en este caso el crecimiento de estos gérmenes es superado por bacterias que toleran menores tensiones de oxígeno. En estos envases se ve inhibido el crecimiento de microorganismos aerobios y esto se debe a la falta de oxígeno pero también, en parte, a la acumulación de dióxido de carbono, mientras que los lactobacilos y *B. thermosphacta* no se ven inhibidos (Lawrie, 1977)

Factores intrínsecos:

pH: para el crecimiento de los microorganismos se considera que el pH cercano a la neutralidad es el óptimo, mientras que las bacterias no crecen bien a pH superiores a 9 o inferiores a 4. En la carne puede variar entre 5,5 y 7, el que depende como ya se ha expuesto anteriormente, de la cantidad de ácido láctico producido por el glucógeno en la glucólisis anaeróbica.

Es un parámetro con gran importancia en el crecimiento de las bacterias, por lo que el pH final de la carne será uno de los factores principales que determinen la conservación de la misma. (Lawrie, 1977)

El pH es el grado de acidez de la carne, cuando se realiza un manejo correcto del ganado previo al sacrificio y en el momento del mismo, luego que desciende el pH lo normal es que baje en el orden de 5,6 a 5,8. Se considera que si el pH es mayor de 5,9, tiene efectos perjudiciales sobre su calidad y duración. (INAC)

Actividad agua: en las carnes frescas es de aproximadamente 0,99, por lo que se considera cercano al óptimo para el desarrollo bacteriano. Reducir la actividad agua de los alimentos disminuye la velocidad de crecimiento de los microorganismos.

Potencial redox: luego de la muerte del animal, el potencial de óxido reducción baja a consecuencia de que el oxígeno es consumido por los sistemas enzimáticos de los tejidos, entonces predomina la actividad reductora y crecen más las bacterias anaerobias ya que los microorganismos aerobios se ven favorecidos con actividad oxidativa.

4.10 Conservación en refrigeración

La conservación de la carne y sus productos por medio del frío es el procedimiento más importante de conservación para que no pierda su calidad. Se considera que la carne está enfriada, si desde que finalizan las operaciones de faena (post-mortem) es mantenida entre -1,5 y 7°C, hasta su consumo, siendo óptima para el almacenamiento y transporte, cuando más cerca esté de la temperatura de congelación. (Hernández- Macedo et al., 2011)

La importancia de la tecnología de enfriamiento radica principalmente en las exigencias de calidad de los alimentos y el mantenimiento de la misma, así como en la vida útil de los productos. Es necesario que los sistemas de refrigeración en los frigoríficos como en toda la cadena de distribución, venta y los consumidores finales, tenga la importancia que merece, asegurando una adecuada temperatura de los productos para conservar las propiedades de estos alimentos. (Dassatti, 2008)

La refrigeración a bajas temperaturas conserva los alimentos, ya que produce un enlentecimiento sobre el crecimiento microbiano causante del deterioro, frenando también los procesos enzimáticos y químicos. El enfriado junto con el envasado al vacío reducen el crecimiento microbiano de bacterias aerobias y las reacciones de oxidación. (Dassatti, 2008; Hernández- Macedo et al., 2011)

La capacidad de conservación de carne refrigerada depende de las condiciones de temperatura, humedad y movimiento de aire existentes en la cámara frigorífica, pero también del estado higiénico de la carne al iniciarse el almacenamiento. Una baja tasa inicial de microorganismos, es uno de los requisitos previos fundamentales para lograr una mayor conservación del producto.

Regular la temperatura próxima a 0°C y conservar un adecuado envasado del producto es necesario para conservar la carne envasada al vacío. Si la temperatura supera los 2°C, puede traer inconvenientes, (Writh et al, 1981). Dicho autor también consideraba importante para la refrigeración el envasado hermético, la circulación de aire y la humedad que, en este caso son de carácter secundario por las características del envase (impermeable). También es importante determinar la vida útil del alimento, que debe estar establecida en los envases. La asociación de enfriado con el envasado al vacío, logra un marcado incremento de la vida útil.

4.11 Envasado al Vacío

Cuando conservamos un alimento expuesto al aire, el oxígeno que está presente en el mismo puede provocar: oxidaciones de las grasas, reacciones enzimáticas que posteriormente afectan la calidad, pérdida del color típico de los alimentos y aparición de aromas o sabores desagradables. Sumado a esto, también tenemos las impurezas y los microorganismos del aire que colaboran con la alteración de los productos, principalmente desde el punto de vista microbiológico. (Madrid A. et al, 2003)

Para un alimento perecedero como lo es la carne, el desarrollo del envasado al vacío es una de las tecnologías más importantes del siglo pasado. Hace que el producto dure más tiempo en buenas condiciones, para poder ser comercializado a nivel tanto de supermercados locales, como exportado a otros países que se encuentran a grandes distancias. (Price y Schweigert, 1994)

Existen varias presentaciones para comercializar la carne bovina para consumo interno y carne de exportación. Una de estas, es la carne envasada al vacío. Algunos autores la mencionan desde 1970 para la conservación de la carne y productos cárnicos, donde ya mencionaban la utilización de envases con películas impermeables al aire que se les aplicaba vacío.

El objetivo de esta tecnología tiene como finalidad prolongar la vida útil de la carne, o sea, hacer que el tiempo entre que se produce la carne y esta llega al consumidor en buenas condiciones sea mayor, sin tener que recurrir a otros métodos de conservación como es el congelado. (Dey, 2007)

Por otro lado, el envasado al vacío tiene como finalidad que el corte cárnico sea recubierto por un envase (film) que funciona como barrera para el vapor de agua como para el oxígeno.

La función de estos envases es principalmente mantener la calidad a lo largo de toda su vida útil, dependiendo esta del tiempo que se estima entre la producción y el consumo del cliente. (Price y Schweigert, 1994)

Por lo tanto, permite conservar las propiedades sensoriales y la calidad de la carne bovina fresca junto con el refrigerado, siendo uno de los métodos más difundidos para la conservación de los alimentos, ya que retarda el crecimiento microbiano por las bajas temperaturas y los procesos enzimáticos y químicos que causan la alteración.

El envasado de la carne se debe acompañar con su conservación bajo frío a una temperatura de 0-4°C. (Madrid A. et al, 2003)

Es importante mantener constante la temperatura de refrigeración, evitando fluctuaciones que aumenten la misma por encima de 5°C. Si la temperatura

aumentara por un corto periodo por encima de este nivel, rápidamente van a crecer bacterias psicrótrofas, mesófilas y anaerobias facultativas. El crecimiento de estas bacterias va a producir una disminución marcada de la vida útil de los productos. (Hernández- Macedo et al., 2011)

Estos envases impiden la contaminación por los microorganismos del medio ambiente. Además, cambia la humedad, la composición gaseosa y el potencial de óxido reducción del producto, influyendo en el desarrollo de la flora inicial de la carne. Lo protege de daños físicos y químicos, siendo una de las tecnologías utilizadas para conservar la calidad de la carne ya que inhibe el desarrollo de algunos microorganismos alterantes y logra de esta manera aumentar la vida útil del producto.

La carne al ser recubierta por un film que actúa como barrera tanto para el vapor de agua como para el oxígeno, se genera un hábitat no favorable para el desarrollo de microorganismos no deseables que alteren la calidad de la carne, favoreciendo sí el crecimiento de bacterias benéficas como las ácido lácticas. (Dey, 2007)

El envasado al vacío busca dificultar el desarrollo de grupos microbianos que alteran la carne como las bacterias aerobias Gram negativas entre ellos los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, y remplazarlos por microorganismos que se desarrollen más lentamente como los *Lactobacillus* mencionados anteriormente. El envasado al vacío consiste en eliminar el aire del interior del envase, el contenido de CO₂ aumenta durante la conservación hasta 10-20%, pero el oxígeno residual es consumido por la respiración de los tejidos, lo que desfavorece el desarrollo de microorganismos aerobios. Uno de los sistemas más utilizados para envasar al vacío es el Cryovac®.

El oxígeno residual es consumido tanto por las actividades metabólicas de la carne, como por las bacterias. Lo que resulta en una baja de la concentración de oxígeno a 1% y el aumento de la concentración de dióxido de carbono a 20-25%. El dióxido de carbono inhibe el crecimiento de aerobios. Así, el empaque al vacío es un microsistema anaerobio-microaerófilo que retrasa el crecimiento de bacterias aerobias como las *Pseudomonas* y promueve el crecimiento de bacterias ácido lácticas, que tienen un menor potencial para el deterioro y un limitado crecimiento a bajas temperaturas. (Hernández- Macedo et al., 2011)

Se describirán los principales conceptos que tienen relación con el envasado al vacío, el cual se lleva a cabo por la extracción del aire del interior del envase que contiene el producto quedando con una presión atmosférica menor a 10 mbar lo que representa casi el 100% del vacío, en esta tecnología el aire no es remplazado por otro gas. El principal objetivo es conservar el alimento en anaerobiosis, sin presencia de oxígeno. (Bossio y Terra et al., 2003)

4.11.1 El empaque

Se utilizan bolsas de un material especial de tamaño acorde al corte a envasar, para el caso del bife angosto las medidas de la bolsa son de 250 de ancho x 800 de largo aproximadamente. El material de la bolsa debe ser impermeable al oxígeno y al vapor de agua. Tanto las bolsas como las etiquetas que se utilizaran y que entraran en contacto directo con la carne deben poseer la correspondiente garantía del proveedor para ser usadas en el envasado de alimentos y rangos de tratamientos térmicos para los cuales está aprobada, entre otros. Luego de la máquina de vacío pasa a una posterior termo-contracción de la bolsa con agua caliente. Se deben utilizar siempre bolsas en buenas condiciones y antes de su fecha de vencimiento, chequeando que estas no estén perforadas y una vez realizado el envasado al vacío, manipularlas con cuidado de manera que no se dañe la superficie del envase y se pierda el vacío. (Dey, 2007)

En el presente estudio en ambas plantas se utilizaron bolsas marca Cryovac, incolora, de capa barrera, copolímero de policloruro de vinilideno (PVDC) y capa de barrera, copolímero de etileno-acetato de vinilo.

Se utilizan para los envases bolsas de barrera las cuales poseen una baja permeabilidad a los gases, vapores y aromas y bolsas termo contraíbles a las cuales se les aplica vacío y calor para lograr la termocontracción de las mismas. (Bossio y Terra et al., 2003)

Si no usáramos envases con baja permeabilidad la diferencia de las presiones parciales de oxígeno entre la atmosfera y el que queda residual en el envase seria un problema ya que el ingreso de oxígeno al interior del envase destruiría el beneficio de haberlo envasado al vacío. La permeabilidad a oxígeno depende de varios factores, uno de los más destacados es la estructura química de la bolsa, las diferencias están dadas por la presencia o no de polímeros de alta barrera a el gas, los más usados son el Policloruro de Vinilideno y el Copolímero de Etileno – Vinil alcohol. La permeabilidad también depende de la temperatura de almacenamiento, a mayor temperatura la permeabilidad de los gases aumenta. (Bossio y Terra et al., 2003)

4.11.2 El vacío

El objetivo de la aplicación de vacío es que a través de este proceso se logre reducir al mínimo el aire entre el corte y el film. Para ello se utiliza una bomba de vacío que extrae el aire de una campana en un determinado tiempo. El vacío ideal es aquel que logra la extracción total del aire, aunque la presencia de una pequeña cantidad de aire o burbujas entre la carne y la unión de la bolsa no es perjudicial para la conservación de la carne ya que esta pequeña cantidad de oxígeno será absorbido. (Dey 2007)

La máquina a nivel de la planta realiza el vacío y sellado hermético de la bolsa por calor y presión (en el momento de mayor vacío). Se debe controlar la temperatura del sellado de manera que no queme la bolsa si está demasiado caliente y que no falle el sellado si no tienen el calor suficiente, al igual que la presión que también debe ser la correcta para que suelde. Por lo tanto es importante para un correcto sellado que exista una combinación correcta de los tres: temperatura, tiempo y presión. (Dey, 2007)

Este procedimiento deja una delgada atmósfera alrededor de la carne que va a ir sufriendo cambios a medida que pasa el tiempo. El oxígeno remanente pasa a dióxido de carbono y se genera un microclima con temperatura y pH que beneficia el crecimiento de bacterias lácticas que ayudarán a que la carne se mantenga conservada por más tiempo. Esta preservación de la carne gracias al dióxido de carbono va de la mano del tamaño del corte, siendo los cortes más pequeños más difíciles de conservar ya que producen menos CO₂ y los grandes (como el bife angosto) sin embargo reabsorberán rápidamente todo el oxígeno residual. La carne envasada al vacío hace que cambie el color rojo de la carne a un color más violáceo por el aumento del dióxido de carbono. Este cambio de coloración no es permanente ya que la carne volverá a su color normal una vez que se rompa el vacío y tome contacto con el oxígeno del aire. (Dey, 2007)

4.11.3 Termocontracción

El proceso de termocontracción que se realiza luego que la carne es envasada al vacío con el film, consiste en pasar a la misma por agua caliente logrando con esto que el film se contraiga sobre el corte. También se puede realizar la termocontracción con un tubo de aire caliente pero no es la que se realizó en este estudio y es la menos usada hoy en día. Al momento de realizar la termocontracción es importante que la temperatura no sea excesivamente alta y el tiempo de contacto sea el suficiente para que se encoja la bolsa pero no surjan inconvenientes como la cocción de la carne. Cuando se produce la coagulación de las proteínas por calor la carne queda con un color amarronado o grisáceo en la superficie. (Dey, 2007)

La temperatura del agua donde se produce la termocontracción en el caso de las carnes frescas tiene un rango de 81°C – 85°C, dependiendo del tipo de corte, el tiempo de aplicación no debe superar los 3 segundos. Esta técnica permite una excelente adherencia de la bolsa al producto y en las carnes frescas evita la acumulación de “jugos”, mejorando el aspecto y logrando una mayor vida útil del producto. (Bossio y Terra et al., 2003)

Una vez envasados los cortes, deben permanecer a bajas temperaturas. Si la carne envasada al vacío se somete a aumentos de temperatura van a proliferar bacterias que producen gas y vamos a ver que dentro del envase se forman burbujas. Esto puede confundirse con una falla en el envasado o con una pérdida de vacío si no se

tiene un registro o seguimiento de la temperatura de conservación, transporte o de la temperatura de las góndolas donde se vende la carne al consumidor final. (Dey, 2007)

Por ultimo creemos importante señalar las ventajas que ofrece esta técnica entre las que se destacan como ya hemos mencionado: limitar el crecimiento microbiano ayudando así a obtener un producto más estable, producir menor pérdida de peso del producto, lograr la menor alteración del sabor y el olor de la carne, aumenta el periodo de conservación y darle al producto una mejor presentación. (Madrid A. et al, 2003)

4.12 Vida útil de cortes envasados al vacío.

La vida útil es el tiempo máximo que los alimentos mantienen sus cualidades sensoriales, microbiológicas, nutritivas y de inocuidad alimentaria, por encima de un nivel considerado aceptable por los consumidores. Hoy en día crece la tendencia de preferir aquellos alimentos que los consumidores perciben como frescos. (Price y Schweigert, 1994; Dey, 2007)

En este caso depende de la permeabilidad del envase y de características intrínsecas del alimento como: actividad agua, pH, susceptibilidad al deterioro enzimático y microbiano, sensibilidad al oxígeno, a la luz, humedad y anhídrido carbónico. (Fellows, 1994) y de la velocidad de deterioro de los alimentos. (Forsythe y Hayes, 1999)

Los cortes de carnes vacunas frescas proporcionan un microambiente ideal para el crecimiento de los microorganismos, y presentan pocas barreras naturales para que estos no se desarrollen, como se expresaba anteriormente el rechazo de los consumidores se produce cuando los cortes tienen una carga microbiana en el entorno de 10^7 ufc/cm². Por lo que se entiende que la carga bacteriana inicial es de suma importancia junto con las medidas de manejo que se realicen como GMP y HACCP, tanto en la playa de faena como en el desosado que pueden minimizarla.

La vida útil de carne envasada con films de alta permeabilidad al oxígeno es de aproximadamente de una semana, mientras que la envasada al vacío su vida útil es de alrededor de 3 a 12 semanas si es almacenada a 0°C. (Hernández- Macedo et al., 2011)

4.13 Descripción de los microorganismos a estudio

- **Microorganismos aerobios mesófilos**

En este grupo se incluyen microorganismos que crecen en aerobiosis, a una temperatura de entre 30 y 40° C como óptima. (Price y Schweigert, 1994)

El número de estos microorganismos presente en los alimentos es uno de los indicadores microbiológicos de calidad de los alimentos. En carne es de mucha utilidad su estudio ya que indica si la limpieza, desinfección, y el control de temperatura durante el proceso y tratamiento industrial, transporte y almacenamiento se ha realizado de forma adecuada. Brinda también información sobre la alteración de los alimentos y su probable vida útil.

- **Coliformes totales**

El grupo de los coliformes comprende a *Escherichia coli* y otras especies bacterianas de la familia *Enterobacteriaceae*, como lo son *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Son bacterias aerobias o anaerobias facultativas, Gram negativos, que fermentan la lactosa con formación de gas en 48 hrs a 45°C.

Altos recuentos de bacterias coliformes pueden indicar contaminación de la carne por materia fecal o manipulación no higiénica del alimento como también un mal almacenamiento del mismo.

- ***Brochothrix thermosphacta***

Mycobacterium thermosphactum fue descrita hace muchos años, aislada por primera vez de embutido fresco de carne de cerdo conservado a 5-8°C (Noskowa, 1972).

Desde ese entonces bacterias de este tipo han sido aisladas de una amplia gama de carnes y productos cárnicos principalmente envasados. Esta bacteria fue reclasificada en un nuevo género y de ahí comienza a llamarse *Brochothrix thermosphacta* (Sneath y Jones, 1976)

B. thermosphacta es un anaerobio facultativo, con crecimiento en pH (5,5 – 6,5) y puede crecer en refrigeración temperaturas de 4 ° C por lo que crece fácilmente en carne refrigerada. No es una bacteria patógena y a temperatura de 30°C o por encima de esta generalmente no crecen. Cuando se estudia en productos envasados su crecimiento depende de la cantidad de oxígeno disponible en el paquete, por lo que son importantes los niveles de oxígeno del envase, la permeabilidad del mismo y el gas residual. (Gribble y Brightwell, 2013)

Es un bacilo pequeño, Gram positivo, inmóvil, aerobio y anaerobio facultativo. Constituye una parte importante de la flora alterante de la carne envasada al vacío a temperatura de refrigeración. Crece en carnes con baja actividad agua y su

temperatura óptima de crecimiento está entre 20 y 25°C. Requiere de un pH igual o superior a 5,8 para crecer. (Schöbitz et al., 1990).

4.14 Límites microbiológicos

Son los límites considerados en diferentes legislaciones o recomendaciones nacionales e internacionales, por los cuales no se puede producir, importar o exportar carnes que superen estos parámetros microbiológicos.

Tabla 5. *Límites microbiológicos nacionales e internacionales.*

Alimento	Referencia	Bacterias Aerobias mesófilas totales	Enterobacterias Coliformes
Carne fresca y refrigerada	IMM (1996) Ordenanza Bromatológica de la IMM	m= 5 x 10 ⁵ ufc/g M= 1 x 10 ⁷ ufc/g	
Carnes bovinas, ovinas y caprinas	Reglamento Comunidad Europea (C.E.) 2073/2005 modificado por el reglamento C.E 1441/2007 (para canales después de su faenado pero antes del enfriamiento)	m= 3,5 log ufc/cm ² media logarítmica diaria M=5,0 log ufc/cm ² media logarítmica diaria	m= 1,5 log ufc/cm ² media logarítmica diaria M= 2,5 log ufc/cm ² media logarítmica diaria
Carne refrigerada y congelada	CENAN (1982)	10 ⁶ ufc/g	10 ² ufc/g
Carne	ICMSF(2000)	7 log	

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar el crecimiento bacteriano de microorganismos indicadores de calidad higiénico-sanitaria y microorganismos alterantes en carne bovina refrigerada (0-4°C) y envasada al vacío de dos plantas de faena considerando los principales parámetros intrínsecos y extrínsecos que influyen en el crecimiento de los microorganismos en un periodo de 120 días.

5.2 Objetivos específicos

- Detectar y cuantificar la evolución de: *Aerobios mesófilos totales*, *Coliformes totales* y *Brochothrix thermosphacta* durante un periodo de 120 días.
- Describir a que tiempo las cargas microbianas superan los límites de recuentos microbiológicos nacionales e internacionales.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Materia prima: La carne utilizada para la realización del experimento proviene de animales bovinos, utilizando de estos uno de los músculos más importantes del dorso: *Longissimus dorsi*, denominado bife angosto. A estos se les aplico un proceso de envasado y conservación: envasado al vacío y refrigerado.

Según el Manual de Carne Bovina y Ovina de INAC (2015). El bife angosto (*Longissimus dorsi*) es un corte cárnico sin hueso, ubicado en la región dorso lumbar, con base ósea en las vértebras lumbares y las 3 o 4 últimas dorsales según especificaciones del corte; en este corte los principales planos musculares involucrados son largo costal, largo dorsal y serrato posterior.

El *Longissimus dorsi* se extiende posteriormente desde la región costal, va por toda la región lumbar y termina sobre la cara anterior del ilion. Corre sobre las apófisis transversales de las vértebras lumbares y en la región torácica sobre las costillas (Swatland, 1991).

Materiales de laboratorio: placas de Petri, pipetas, bolsas de stomacher, stomacher, diluyente, balanza analítica, autoclave, estufas, medios de cultivo, termómetros, pH-metro, heladera y equipamiento básico de laboratorio de microbiología de alimentos.

6.2 Obtención de las muestras/Plan de muestreo

Las muestras de carne fueron tomadas en dos plantas de faena habilitadas para la exportación de nuestro país. Dichas muestras luego de la faena y desosado, se maduraron por 36 horas en cámaras de pre-frio entre 4 – 7°C.

Se estudió un total de diez bifos angostos (*Longissimus dorsi*), cinco de cada uno de los frigoríficos, elegidos de forma aleatoria. Cada uno de los bifos pesó aproximadamente cinco kilogramos. Los 5 bifos angostos del frigorífico “A” fueron de novillos y Cuota Hilton, mientras que los otros 5 bifos angostos corresponden al frigorífico “B” y fueron tomados de vacas. Una vez obtenidos los bifos angostos en las plantas de faena, se siguió con el mismo procedimiento de toma de muestras para ambos.

A nivel de la planta frigorífica se procedió a fraccionar cada uno de los bifos angostos en 9 muestras de aproximadamente 400 gramos respetando las normas de buenas prácticas de manejo y las medidas higiénicas necesarias para evitar la contaminación de las mismas, utilizando ropa limpia, tapabocas, guantes estériles y

esterilizando los cuchillos que se utilizaron para realizar los cortes. Una vez obtenidas las muestras, estas fueron etiquetadas y envasadas al vacío individualmente.

Etiquetado: se identificó cada una de las muestras con un número según el bife correspondiente del 1 al 5 para la planta A y del 6 al 10 para la planta B.

La máquina de vacío utilizada en ambas plantas fue una Supervac de origen Austriaco. Para la planta "A" Modelo GK 842B del año 2006 y para la planta "B", Modelo GK 852 del año 2010.

Se le realizó la toma de pH, con los pH-metros de cada establecimiento, para conocer el valor inicial de pH de las muestras utilizadas para nuestro estudio.

Se obtuvo un número de 90 muestras en total, 45 de la primer planta y a la semana siguiente las 45 restantes. Se tomaron con una semana de diferencia con el fin de facilitar la manipulación y evitar la posible contaminación cruzada en el momento del análisis de las mismas. La razón para hacer dos grupos fue tener información sobre dos frigoríficos distintos y ver si existen diferencias o el conteo es similar, enriqueciendo así el resultado del estudio.

Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UdelaR en cajas térmicas refrigeradas. Allí, se conservaron a temperatura de refrigeración de 0-4°C durante todo el periodo experimental (120 días).

Los análisis de las muestras fueron realizados el día 0 y cada 15 días, hasta el día 120, en los que se evaluó la evolución de los microorganismos citados previamente, la temperatura de cada una de las muestras, el mantenimiento o la pérdida del vacío y la presencia o no de olor al abrir la bolsa de cada una de las muestras.

6.3 Procesamiento de las muestras

Cada día de análisis se prepararon las muestras de manera que los estudios se realicen lo más pronto posible luego de retiradas las muestras de la heladera.

Luego de abrir la bolsa, evaluamos el olor y la temperatura de la muestra en el centro térmico de la misma, registrando los datos en una planilla.

Posteriormente se comenzó con el procesamiento de la muestra pesando 10 gramos de la misma. El corte se realizó desde la superficie y en profundidad intentando tener todo el espesor de la muestra, se añadieron 90 ml de diluyente estéril a la bolsa de Stomacher que contenía la muestra obteniendo así la dilución 10^{-1} . Durante dos minutos se homogeneizó la muestra en Stomacher 400, con el objetivo de obtener una suspensión líquida para luego realizar las diluciones correspondientes pipeteando una alícuota de 1ml y colocándola en tubos estériles

que contenían 9 ml de diluyente obteniendo la dilución 10^{-2} . Se repitió la operación para obtener las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , etc., necesarias para realizar el análisis y recuento de Bacterias Aerobias mesófilas totales, Coliformes y *B. thermosphacta*.

6.4 Técnicas microbiológicas

Tabla 6. Bacterias estudiadas, medios de cultivo y sus utilidades.

Microorganismo	Medio de cultivo	Objetivo de estudio
Bacterias Aerobias mesófilas totales	Plate Count Agar (PCA)	Indicador de vida útil
Coliformes	Violet Red Bile Lactose Agar (VRBA)	Indicador de higiene
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Streptomycin Thallium Acetate Actidione Agar (STAA)	Indicador de alteración

Se utilizaron las siguientes técnicas para el análisis de los diferentes microorganismos a evaluar:

- **Recuento estándar en placa de microorganismos Aerobios mesófilos**, técnica según ICMSF (2000), en la cual se pipeteaba por duplicado 1 ml de cada una de las diluciones en placas de Petri. El medio utilizado es Plate Count Agar (PCA) templado a 44-46°C colocando luego en cada placa 10 a 15 ml. Las placas fueron incubadas a 35°C durante 48 ± 3 hrs para luego proceder al recuento de aquellas placas que contenían entre 30 y 300 colonias.

Plate Count Agar (PCA): Es un medio de cultivo utilizado para el examen bacteriológico de carne, agua, leche y otros productos lácteos, de los cuales se puede realizar el recuento de microorganismo totales viables en placa.

Está compuesto por glucosa, un hidrolizado enzimático de caseína que proporciona aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas complejas. El extracto de levadura provee vitaminas del complejo B. (APHA, 2001)

Los nutrientes en este medio son suministrados por la triptona, el extracto de levadura y la glucosa. Estos son utilizados como fuente de energía que favorece el crecimiento de las bacterias.

- **Recuento directo de Coliformes en placa**, según APHA (2001), la siembra se realizó en profundidad por duplicado de las diluciones utilizadas, se agregaron los mililitros correspondientes del medio de cultivo VRBA – Agar Bilis Rojo Neutro Cristal Violeta y una vez que solidificaba se añadían 3-4 ml del mismo medio de cultivo con el objetivo de que se forme una sobre capa en la superficie del medio

evitando de este modo el crecimiento de colonias superficiales. La incubación se realizó a 35°C durante 24 - 48 hrs. Se contaron las colonias de un color rojo purpura con precipitado biliar, con un tamaño superior a 0,5 mm de diámetro y se procedió al cálculo correspondiente.

Violet Red Bile Lactose Agar (VRBA): Es un medio de cultivo selectivo y diferencial, usado para la identificación y enumeración de coliformes. Está compuesto por lactosa buena fuente de carbono, extracto de levadura fuente de vitaminas de complejo B y peptona la cual proporciona principalmente nitrógeno, estos son los componentes que favorecen el crecimiento de las bacterias. La selectividad del medio está dada por las sales biliares y cristal violeta, los cuales inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas. El elemento diferencial del medio es el rojo neutro que es un indicador de pH, entonces cuando los coliformes fermentan la lactosa del medio reducen el pH y el indicador rojo neutro cambia a color rojo o rosa intenso y es así que diferenciamos a los coliformes del resto de las bacterias Gram negativas que pueden haber crecido en la placa.

- **Recuento en placa de *Brochothrix thermosphacta***, como lo indica el Manual OXOID (2006), se agregó a cada placa 10-15 ml de STAA Agar Base sembrando luego en superficie 0,1 ml del homogeneizado de la muestra y se esparció con un rastrillo de vidrio (asa de Drigalsky) sobre la superficie del medio. Se incubó a 22° C durante 48 hrs. Luego de este tiempo se realizó el recuento de las típicas colonias *B. thermosphacta* con un diámetro de 0,5 a 1 mm, de color paja.

STAA (Agar Base CM0881 posee sulfato de estreptomina, acetato de talio y ciclohexamida): es utilizado para aislamiento de *Brochothrix thermosphacta* presente en los alimentos. Es un medio selectivo gracias al sulfato de estreptomina que inhibe algunos microorganismos Gram positivos y Gram negativos, pero *B. thermosphacta* sigue siendo resistente, el acetato de talio que inhibe la mayoría de las levaduras y la ciclohexamida que inhibe aun mas las levaduras y hongos filamentosos (Oxoid, 2006)



Figura 2: Técnicas de siembra en placa
Fuente: Moreno, (2006)

6.5 Medición de pH

Las medidas de pH se realizaron en dos tiempos, al día 0 (inicial) en cada una de las plantas con pH-metros pertenecientes a cada frigorífico y posteriormente al día 120 para conocer el valor final de pH en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Veterinaria con un pH-metro con electrodo de penetración (ambos marca Milwaukee), previamente calibrado, utilizando buffer a pH=7 y pH=4. El procedimiento de toma de pH se realizó cada vez que se abría el envase que contenía la muestra y se realizaba el registro de los resultados.

6.6 Análisis Estadístico

Se realizó transformación logarítmica decimal de los recuentos obtenidos, por lo tanto los resultados están expresados en el orden del logaritmo decimal (\log_{10}).

Para cada fecha se calcularon las medias y el error estándar del logaritmo decimal de los recuentos bacterianos, para cada planta y en forma conjunta.

En dicho análisis realizamos primero una estadística descriptiva la cual se presenta en tablas, gráficos y figuras que describen la dinámica de las tres diferentes poblaciones bacterianas estudiadas.

Se compararon las cargas iniciales para testear diferencias de Aerobios mesófilos totales y Coliformes en ambas plantas al día cero mediante un análisis de varianza

(Anova). Finalmente para ver la evolución de Aerobios mesófilos totales a lo largo de los 120 días de análisis en ambos frigoríficos, se realizó la regresión lineal del recuento bacteriano en función del tiempo expresado en logaritmo decimal.

El análisis estadístico se realizó con el Software STATA 14.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que el objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento bacteriano a lo largo de los 120 días, es importante destacar la carga inicial (día 0) de microorganismos ya que esta va a condicionar según la bibliografía citada la evolución de los mismos, reflejando la calidad higiénico-sanitaria de la planta, las buenas practicas utilizadas en la obtención de las muestras y el deterioro que va sufriendo la carne por las bacterias alterantes en el correr del tiempo.

En la siguiente figura 3, utilizamos un gráfico de cajas en el que se muestra la carga inicial (día 0) de Aerobios mesófilos totales con la que provienen las muestras de las plantas de faena.

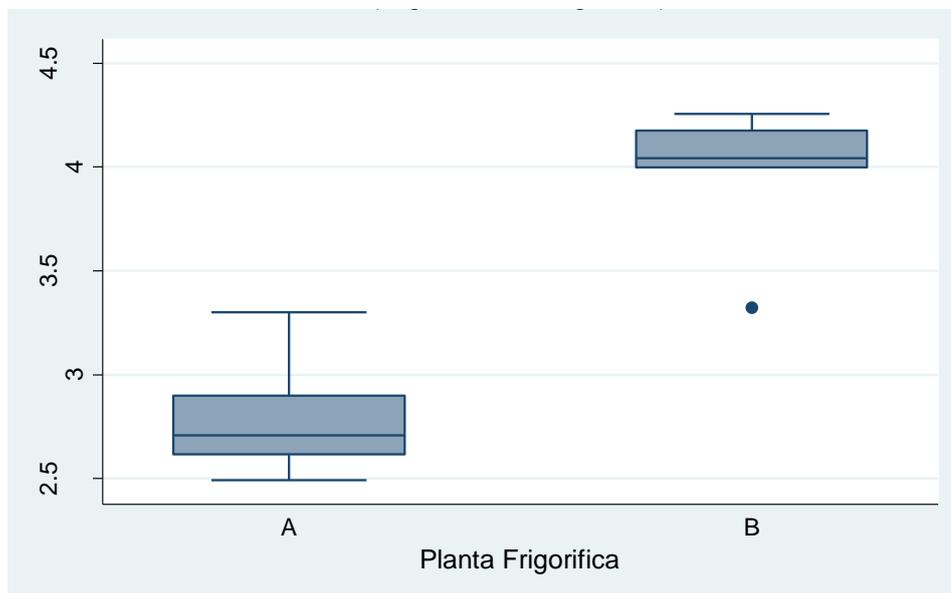


Figura 3: Recuento bacteriano de Aerobios mesófilos totales al día 0 (según Planta Frigorífica).

Como podemos ver, existe diferencia significativa ($P < 0,05$) en las cargas iniciales de ambas plantas, las mismas se evaluaron por medio del análisis de varianza (Anova) obteniendo un resultado de $P < 0,01$. La media para la planta "A" es de 2.80 log ufc/g y para la planta "B" de 3.96 log ufc/g.

Según Dainty y Mackey, 1992, luego del dressing las canales suelen tener entre 2 log y 4 log de bacterias/cm², los cuales proviene de piel, contenido de vísceras, manos y utensilios. Por otra parte Forsyth y Hayes, 1999 consideran entre 3 log y 5 log dependiendo de las condiciones higiénicas de la planta.

Un recuento de 2,23 log promedio de ufc/g al día 0, fue lo que obtuvieron Delgado y Quartino, 2013, en un estudio realizado en una sola planta en similares condiciones.

En un estudio realizado por Mateauda en 2013 en el que se evaluó entre otras cosas la dinámica poblacional bacteriana de cortes de bife angosto envasados al vacío y almacenados durante 142 días a 0°C y se analizaron las muestras los días 0, 14, 91 y 142 para Aerobios mesófilos totales, *B. thermosphacta* y Coliformes en Petrifilm entre otros. En este estudio al día 0 se obtuvo una media de 2,54 log ufc/g para el recuento de Aerobios mesófilos totales.

Según el Reglamento C.E 2073/2005 modificado por el reglamento C.E 1441/2007 en el que especifica los límites microbiológicos para Aerobios mesófilos totales en las canales después de su faenado pero antes del enfriamiento, nuestras muestras cumplirían con dichas especificaciones, encontrándose dentro de los límites aceptables.

Continuando con el mismo planteamiento la planta "A" cumple con el límite inicial de Aerobios mesófilos totales propio, cuya carga bacteriana debe ser menor de 5×10^5 ufc/g y en el caso de la Planta "B" el recuento inicial también cumple los requisitos (4 log ufc/g) que la propia empresa pone como límites microbiológicos a la salida del desosado.

Considerando los datos mencionados anteriormente nuestros resultados en ambas plantas concuerdan con la experiencia de dichos autores e indican que las condiciones de faena y toma de muestras descrita en materiales y métodos, fueron las correctas, respetándose las buenas prácticas de manufactura.

Con respecto a los Coliformes son microorganismos indicadores de higiene. Para estos microorganismos no existe diferencia significativa $P=0,347$ ($P>0,05$) en las cargas iniciales. Se hizo la evaluación por medio del análisis de varianza (Anova). Los resultados obtenidos al día 0 para la planta "A" son de 0,14 log ufc/g no existiendo crecimiento para la planta "B". Los resultados obtenidos son satisfactorios ya que se encuentran por debajo del $m=1,5$ log que plantea el Reglamento (CE) N° 2073/2005.

Nuestro estudio mostró valores iniciales menores que los siguientes:

Delgado y Quartino, 2013 en estudio similar obtuvieron un recuento de 1,80 log ufc/g al día 0.

Según los resultados del estudio de Mateauda 2013, en el que evaluó Coliformes en Petrifilm, al día 0 de su análisis obtuvo una carga inicial promedio de 1,82 log ufc/g.

Para este microorganismo nuevamente ambas plantas cumplieron con los estándares de las empresas. Los cuales son de 3 log ufc/g para la planta "A" y 2 log ufc/g para la planta "B" a la salida del desosado. Estos límites corresponden al día 0 en nuestro estudio.

El crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* es indicador de que la carne esta alterándose. Debido a esto, su recuento inicial fue nulo para ambas plantas ya que dicho producto al comienzo del análisis, está fresco, no esta alterado y conserva las características sensoriales aptas para el consumo. Coincidiendo con Delgado y Quartino 2013, los que también obtuvieron una carga inicial de cero.

En cambio otros estudios sí obtuvieron recuentos iniciales bajos de 1,8 log ufc/g para Schöbitz et al, 1990 y de 1,36 log ufc/g en el estudio de Mateauda 2013.

A continuación se detallara la evolución de los microorganismos estudiados a lo largo de todo el periodo de análisis (120 días).

En base a los datos obtenidos los recuentos de Aerobios mesófilos totales en la carne envasada al vacío, valorada en ambos frigoríficos en los 120 días del estudio, se detalla en la Tabla 7, en la que se describen para cada una de las plantas la media y el error estándar en cada día de análisis. Observándose un aumento paulatino de estos microorganismos indicadores de vida útil a lo largo del periodo de estudio.

Tabla 7: Media (*) y error estándar (**) del Log ufc/g de Aerobios mesófilos totales

Día	0	15	30	45	60	75	90	105	120
Frig. "A"	2.80	2.44	2.81	4.31	6.22	6.62	6.48	6.73	7.71 (*)
	0.14	0.16	0.43	0.53	0.51	0.21	0.40	0.28	0.28 (**)
Frig. "B"	3.96	3.57	4.07	4.74	6.29	6.36	6.44	5.82	6.68 (*)
	0.17	0.34	0.46	0.36	0.18	0.12	0.11	0.19	0.27 (**)
Ambos	3.38	3.00	3.44	4.53	6.25	6.49	6.46	6.27	7.19 (*)
	0.22	0.26	0.36	0.31	0.25	0.12	0.20	0.22	0.25 (**)

La siguiente gráfica (Figura 4), nos muestra el comportamiento de Aerobios mesófilos totales en todas las muestras analizadas. Se utilizó un modelo de regresión lineal simple sobre el log₁₀ de las ufc/g en función del tiempo (días) utilizando los recuentos obtenidos para ambos frigoríficos.

La línea negra que se observa en dicha figura corresponde a la línea de regresión. Esta es la media esperada para cada día, o sea, no es la media real, sino que es el recuento bacteriano promedio que se esperaría encontrar en cada uno de los días

de análisis. Esta línea tiene pendiente positiva, las cargas bacterianas van aumentando con el tiempo. El coeficiente de correlación es de 0,83 ($p < 0,01$) por lo tanto la asociación lineal es significativa. El coeficiente de regresión de 0,03675, esto nos aporta más datos sobre dicha pendiente, ya que el coeficiente de regresión nos dice cuanto debería aumentar por día el logaritmo decimal del recuento bacteriano.

Como en nuestro estudio, la variable tiempo es cada 15 días, un coeficiente de regresión de 0,03675 por día, equivale a decir que cada 15 días aumentaría 0,55 log, o que cada un mes aumenta en el orden de 1 log.

Las bandas corresponden al intervalo de confianza del 95% para los valores esperados. Se delimita con la línea roja el límite microbiológico aceptable para estas bacterias, tanto la Ordenanza Bromatológica de la I.M.M como ICMSF (2000), concuerdan en que este debe ser de 7 log ufc/g.

Según ICMSF (2000) cuando la población microbiana supera 10^7 ufc/g se detecta la presencia de limo característico de la alteración de la carne.

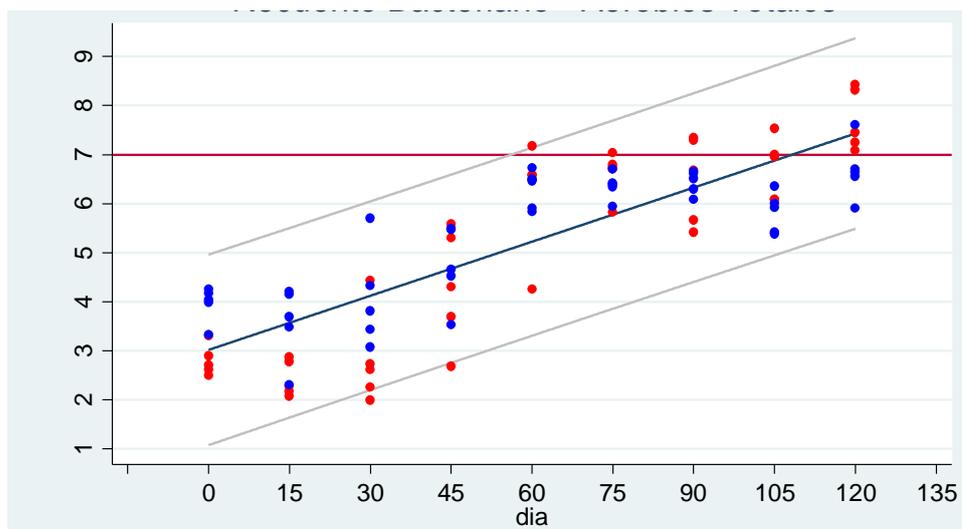


Figura 4: Recuento bacteriano de Aerobios mesófilos totales, en los 120 días, expresado en logaritmo decimal. Muestras del frigorífico “A” (puntos rojos), muestras del frigorífico “B” (puntos azules), regresión lineal (línea negra), intervalo de confianza 95% (líneas grises) y límite microbiológico (línea roja).

Al comienzo del estudio (día 0) se observan que los recuentos de Aerobios mesófilos totales oscilan entre 2,49 log ufc/g y 4,25 log ufc/g, correspondiendo los valores mas bajos al frigorífico “A” y los mas altos al frigorífico “B”. En los días siguientes de análisis notamos un crecimiento gradual de estos microorganismos y al día 60 donde

la media del frigorífico "A" se ubica en un recuento de 6,22 log ufc/g una de las muestras de este frigorífico obtuvo el primer recuento que superó levemente el límite establecido, siendo este valor de 7,17 log ufc/g, luego esta muestra en las siguientes lecturas vuelve a estar dentro de los valores aceptables.

A partir del día 75 en adelante la muestra que supera el límite de 7 log ufc/g, pertenece al frigorífico "A" (muestra 3), siendo esta la única muestra que a partir del día 60 hasta el final del estudio, presentó olor desagradable el cual se percibió al abrir la bolsa de vacío en el momento del procesamiento de las muestras en cada día de análisis. Coincidiendo con el estudio realizado por Lee y Yoon en 2001, los cuales describen la aparición de mal olor al abrir el envase de sus muestras al día 66 haciéndose menos perceptible días después.

Al final del estudio al día 120 tomando todas las muestras en conjunto, la media supera por primera vez el límite aceptable siendo esta de 7,19 log ufc/g correspondiendo el valor máximo de 8,43 log ufc/g (el cual pertenece a una de las muestras de la planta "A") y el valor mínimo de 5,90 log ufc/g (perteneciente a la planta "B").

Por otro lado si hacemos un estudio por separado de los resultados de las muestras de cada frigorífico, la media del frigorífico "B" continúa estando por debajo del límite establecido con un valor de 6,68 log ufc/g, y el frigorífico "A" si supera dicho límite teniendo una media de 7,71 log ufc/g en este día de análisis.

Venugopal et al., quienes en 1993 estudiaron el crecimiento bacteriano en carne fresca envasada al vacío a temperaturas de 0°C, 2°C y 4°C realizando el análisis en muestras semanales durante 9 semanas, obtuvieron recuentos en placa de Aerobios mesófilos totales que llegan a los 7 log ufc/g en la semana 7 (49 días) en la carne conservada a 0°C y 2°C. Mientras que en la carne conservada a 4°C llega a ese mismo recuento de Aerobios mesófilos totales en la semana 5 (35 días) los cuales continúan aumentando en las siguientes semanas en el ensayo a esa temperatura.

En un estudio realizado por Lee y Yoon en 2001 en el que se investigó las características de calidad y vida útil evaluando veinticuatro cortes de carne envasado al vacío para luego ser transportadas en barcos refrigerados a Corea y luego de su llegada se realizaron los análisis a los días 38, 45, 52, 66 y 76, tomando como día 0 la fecha de envasado, el día 38 tuvo un recuento de 4,79 log ufc/cm² y después del día 52 de almacenamiento el recuento de Aerobios mesófilos totales excedió los 7 log ufc/cm² y se mantuvo por encima de este valor hasta el final. Notamos diferencias con los resultados obtenidos en nuestro estudio y creemos que puede deberse a que Lee y Yoon utilizaron para sus muestras carne que fue transportada en condiciones reales mientras que nuestras muestras fueron manejadas en condiciones de laboratorio, siendo nuestros resultados mas acordes a los obtenidos en el trabajo de Mateauda el cual fue realizado bajo las mismas condiciones.

Masana et al., en el año 2002 comprobó en los laboratorios del INTA (Instituto de Tecnología de los Alimentos) en Castelar – Buenos Aires que cortes de *Longgisimus dorsi* con un pH 5,5, envasados al vacío y conservados a 1°C tiene una vida útil de 90 días según su estudio, en el que ese día tiene un recuento de Aerobios mesófilos totales de 6,98 log ufc/cm².

Evaluando el recuento de Aerobios mesófilos totales en el trabajo de Mateuda 2013, un tanto desigual al estudio anterior pero similar a nuestros resultados podemos ver que se obtuvieron valores del orden de 7,08 log ufc/g al día 142.

Como podemos observar en la figura 5 la media para bacterias aerobias tiene un comportamiento similar en ambos frigoríficos, siguiendo con la curva normal de crecimiento bacteriano donde encontramos una fase de adaptación al medio por parte de los microorganismos (en este caso del día 0 al 30), luego una fase de crecimiento exponencial (del día 30 al 60), para finalmente agotarse los recursos o nutrientes para seguir multiplicándose y a partir de aquí se mantienen los recuentos constantes, coincidiendo con la fase estacionaria (del día 60 al 120).

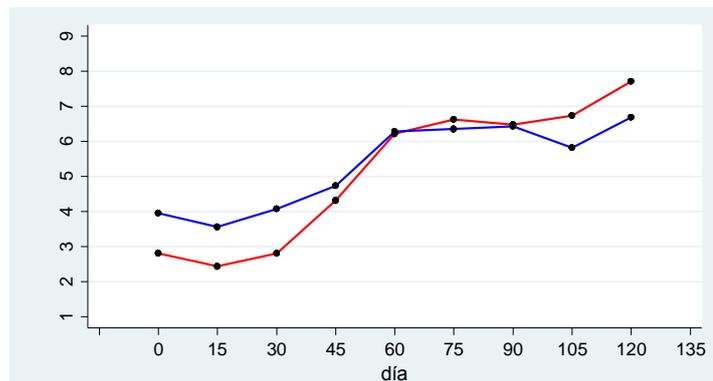


Figura 5: Evolución del recuento bacteriano de Aerobios mesófilos totales, en los 120 días de estudio expresados en logaritmo decimal. Media del frigorífico "A" (línea roja), media del frigorífico "B" (línea azul).

Se detalla en la Tabla 8, el recuento de Coliformes en la carne envasada al vacío, valorada en ambos frigoríficos en los 120 días del estudio, se describen para cada uno de ellos la media y el error estándar en cada día de análisis y la media de ambos frigoríficos juntos.

Tabla 8: *Media (*) y error estándar (**) del Log ufc/g de Coliformes totales*

Día	0	15	30	45	60	75	90	105	120
Frig. "A"	0.14	0.14	0.00	1.68	0.90	1.22	1.94	2.00	0.85 (*)
	0.14	0.14	0.00	0.56	0.59	0.53	0.63	0.57	0.60 (**)
Frig. "B"	0.00	0.00	0.66	1.17	0.58	0.40	0.47	0.76	1.40 (*)
	0.00	0.00	0.29	0.48	0.42	0.26	0.47	0.60	0.74 (**)
Ambos	0.07	0.07	0.33	1.42	0.74	0.81	1.20	1.38	1.13 (*)
	0.07	0.07	0.18	0.36	0.35	0.31	0.44	0.44	0.46 (**)

Los recuentos de Coliformes observados en la Figura 6, no mostraron crecimiento en 9 de las 10 muestras analizadas en los primeros 15 días, si lo hizo en una de las muestras con un valor muy bajo de 0,69 log ufc/g. Al día 30 comienzan a aumentar los recuentos en la planta "B". Mientras que la planta "A" para este día no se obtuvo crecimiento para Coliformes, teniendo ambas plantas un crecimiento exponencial posteriormente en el día 45. Notamos en este mismo día de análisis que los resultados oscilan entre 0 y 2,86 log ufc/g.

La dispersión de los resultados se comienza a observar a partir del día 45 tanto para la planta "A" como para la "B". En esta dispersión se observan que hay varias muestras con recuentos de 0 log ufc/g y otras que sobrepasan el límite, por lo que consideraremos los valores promedios de los mismos para proceder con su análisis.

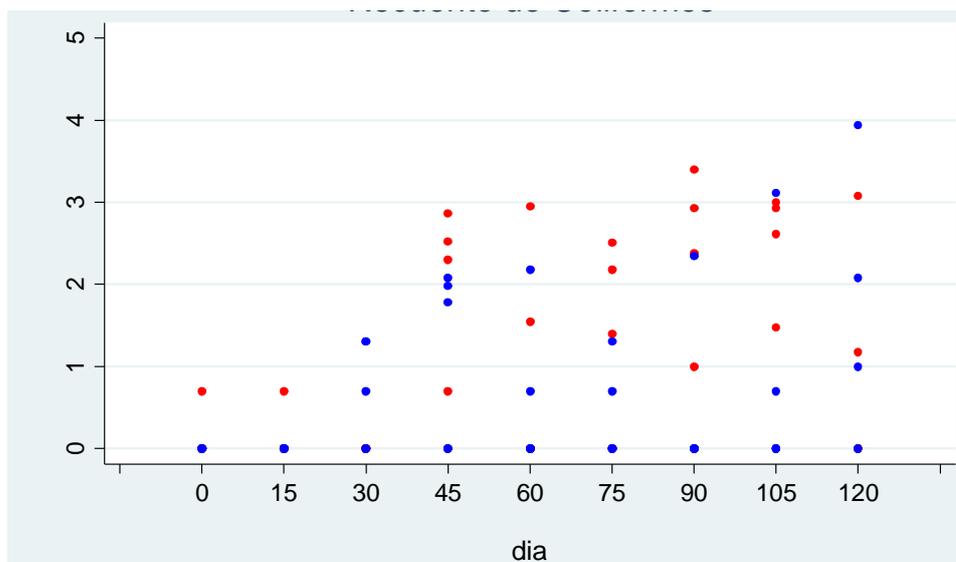


Figura 6: Recuento de Coliformes expresado en logaritmo decimal en los 120 días de análisis. Muestras del frigorífico “A” (puntos rojos), muestras del frigorífico “B” (puntos azules).

Tomando como límite los datos aportados por el CENAN (1982) el cual establece para Enterobacterias el límite de 10^2 ufc/g para carne refrigerada y congelada. Podemos decir que las medias de ambos frigoríficos se encuentran por debajo de este límite, considerando que existen algunas muestras que superaron dicho límite.

En el caso del Frigorífico “A” la media del recuento para el día 105 fue de 2 log ufc/g, alcanzando el límite establecido en el CENAN.

En el estudio de Lee y Yoon (2001), que evaluaron entre otras cosas Enterobacterias (Coliformes), obtuvieron recuentos ampliamente superiores a los obtenidos en nuestro estudio. Al día 38 de su análisis el recuento para estas bacterias fue de 4,62 log ufc/g, superando el límite que tomamos como referencia en este estudio. Los recuentos de Coliformes en el estudio de Lee y Yoon, se mantuvieron constantes a partir del día 52 de análisis en el entorno de los 5,5 log ufc/g, hasta el final del mismo.

Según estudio en el INTA realizado por Massana et al., en 2002, las Enterobacterias al día 0, registraron una carga inicial de 1,02 log ufc/cm², la cual se duplico al día 30, a 2,15 log ufc/ cm² y se mantuvo en los siguientes días de análisis (día 60 y 90) con recuentos en el entorno de 2,5 log ufc/ cm². En este estudio también notamos recuentos superiores a los que obtuvimos.

Valores entre 1,40 log ufc/g y 1,80 log ufc/g se obtuvieron para Coliformes hasta el día 90 en el estudio Delgado y Quartino, 2013. Luego de este día, hasta el final del

estudio se registro un aumento constante de dicha carga, llegando al día 120 con un recuento de 3,20 log ufc/g.

En cuanto a Coliformes; Mateauda (2013), evaluó los mismo en Petrifilm y obtuvo recuentos superiores al presente estudio, comenzando su análisis con una carga de 1,82 log ufc/g y al día 14 supero los limites del CENAN con un recuento de 2,68 log ufc/g. Legando al final de su estudio al día 142 con un recuento de 5,87 log ufc/g.

Todos los estudios nacionales e internacionales consultados muestran recuentos superiores en la carga inicial y en todo el periodo de estudio, a los obtenidos en la presente investigación.

En la Figura 7 de evolución de Coliformes como podemos ver no sigue un crecimiento bacteriano normal, con sus cuatro fases características, sino que esta presenta si un periodo de latencia bien marcado entre el día 0 y 15, observándose después un crecimiento exponencial hacia el día 45 para ambos frigoríficos, con una posterior declinación del crecimiento de las bacterias. El recuento vuelve a ser máximos al día 105 para el frigorífico "A" y 120 para el "B".

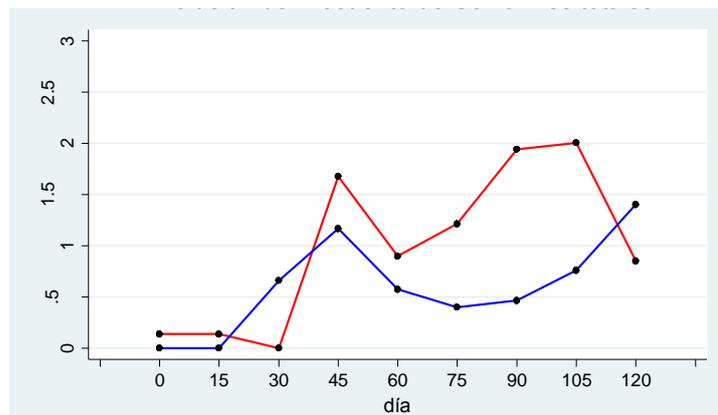


Figura 7: Evolución del recuento bacteriano de Coliformes, en los 120 días de estudio expresados en logaritmo decimal. Media del frigorífico "A" (línea roja), media del frigorífico "B" (línea azul).

Tomando en cuenta que en esta figura se describen las medias de cada frigorífico y se nota que el crecimiento de estas bacterias no presenta un comportamiento esperado, es importante destacar que para ambos frigoríficos los promedios de las muestras analizadas no superan los límites establecidos que tomamos como referencia.

La temperatura mínima para el crecimiento de Coliformes en carne según un estudio realizado por Smith en 1985, puede tomarse en 8°C. Por otro lado Hernández-Macedo et al., 2011 mencionan que en el envasado al vacío estas bacterias se ven limitadas, pero cuando aumenta la temperatura por encima de 6°C es más probable que comiencen su crecimiento. Lo que es un indicador de que las temperaturas utilizadas en nuestro estudio (0-4°C) retrasan el crecimiento de estas bacterias.

El recuento de *Brochothrix thermosphacta* se detalla en la tabla 9, en la cual se describen para cada uno de los frigoríficos la media y el error estándar en cada día de análisis y la media de ambos frigoríficos juntos, que se obtuvieron en el presente estudio en el que se evaluó carne envasada al vacío y refrigerada en 120 días de análisis.

Tabla 9: Media (*) y error estándar (**) del Log ufc/g de *Brochothrix thermosphacta*

Día	0	15	30	45	60	75	90	105	120
Frig. "A"	0.00	0.00	0.00	2.15	1.97	1.54	1.87	2.10	1.65 (*)
	0.00	0.00	0.00	0.62	0.88	0.65	0.50	0.53	0.68 (**)
Frig. "B"	0.00	0.00	0.63	1.14	1.42	2.13	2.81	2.88	3.00 (*)
	0.00	0.00	0.63	0.48	0.36	0.16	0.04	0.02	0.07 (**)
Ambos	0.00	0.00	0.31	1.64	1.70	1.84	2.34	2.49	2.32 (*)
	0.00	0.00	0.31	0.41	0.46	0.33	0.28	0.28	0.39 (**)

La Figura 8, nos muestra el comportamiento de *Brochothrix thermosphacta* en todas las muestras analizadas en los 120 días del estudio. Se puede observar que esta bacteria no creció hasta el día 45 con excepción del dato de la muestra 7 del frigorífico "B" la cual al día 30 mostró un crecimiento de 3,15 log ufc/g. Mientras que la muestra 5 perteneciente al frigorífico "A" no presentó crecimiento a lo largo de todo el periodo de estudio.

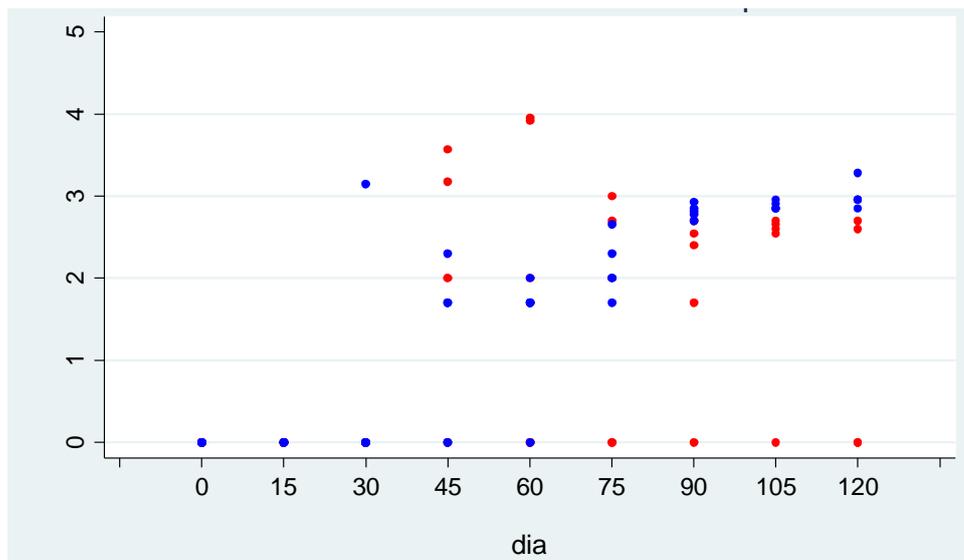


Figura 8: Recuento de *Brochothrix thermosphacta* expresado en logaritmo decimal en los 120 días de análisis. Muestras del frigorífico “A” (puntos rojos), muestras del frigorífico “B” (puntos azules).

Campbell et al, en 1979 en Australia estudiaron el crecimiento de *Microbacterium thermosphactum* en carne envasada al vacío refrigerada a diferente pH y tampoco observaron crecimiento de dicho microorganismo durante los primeros 35 días, por lo tanto concluyeron que esto se debe a que esta bacterias no crecen en carne en anaerobiosis con pH 5,8 o menor durante el periodo de estudio y que su crecimiento depende de la permeabilidad al oxígeno que presente el empaque del envasado al vacío.

A partir del día 45 en adelante se observa el crecimiento de *B. thermosphacta* para ambos frigoríficos hasta el final del análisis. Este día (45) dicha bacteria creció en 8 de las 10 muestras, obteniendo una media del frigorífico “A” de 1,94 log ufc/g (siendo la muestra 3 y la 4, los valores mas altos) y la media del frigorífico “B” de 1,13 log ufc/g.

Al día 60 las muestras 3 y 4 del frigorífico “A” presentan los recuentos más altos de todo el estudio, teniendo como observación la presencia de mal olor en la muestra 3 a partir de este día de análisis. Luego estas muestras disminuyen su crecimiento. Lo mismo le sucedió a Masana, 2002 en su estudio en donde se registraron valores máximos de crecimiento al día 60 siendo estos de 3,43 log ufc/cm² y descienden al día 90 a valores de 1,97 log ufc/cm².

El común denominador de nuestras muestras creció de manera exponencial entre el día 30 y el 45, luego se observó una fase de meseta con un crecimiento lento que se mantuvo hasta el día 120 con valores entorno a 3 log ufc/g.

Para Schöbitz et al, en 1990 que realizaron un estudio similar en carne envasada al vacío refrigerada estudiando este microorganismo, obtuvieron recuentos de 1,80 log ufc/g constantes hasta el día 45 y a los 60 días aumentó a 3 log ufc/g.

En el estudio de Lee y Yoon, 2001 *B. thermosphacta* no mostró valores superiores a 2 log ufc/cm² en los 76 días del estudio.

La experiencia de Mateauda en el 2013 registra desde el inicio de su experimento crecimiento de *B. thermosphacta* como se mencionó anteriormente aumentando al día 91 por encima de los 3 log ufc/g (3,53) y llegando al final de su estudio (día 142) con una carga de microorganismo de 4,91 log ufc/g; la autora adjudica estos recuentos altos de este microorganismo al pH inicial elevado de las muestras de carne utilizadas (pH 6,25) o a la acumulación de pequeñas concentraciones de oxígeno que puedan haber quedado dentro del envase.

La evolución de *Brochothrix thermosphacta* se muestra en la figura 9, en donde se puede ver que ambos frigoríficos muestran una fase de latencia la cual es diferente siendo menor para el frigorífico "B". Luego este microorganismo crece de forma continua para este frigorífico hasta el final del estudio, mientras que para el frigorífico "A" tiene un crecimiento exponencial que se ubica entre el día 30 y 45 y posteriormente se mantiene dentro de los mismos valores hasta el día 120. Era de esperar que los recuentos de *Brochothrix thermosphacta* crecieran, ya que se trata de un microorganismo alterante capaz de crecer en envases impermeables al oxígeno y a bajas temperaturas, responsable de producir el olor pútrido característico de la alteración el cual se noto recién al final del estudio en la amplia mayoría de las muestras.

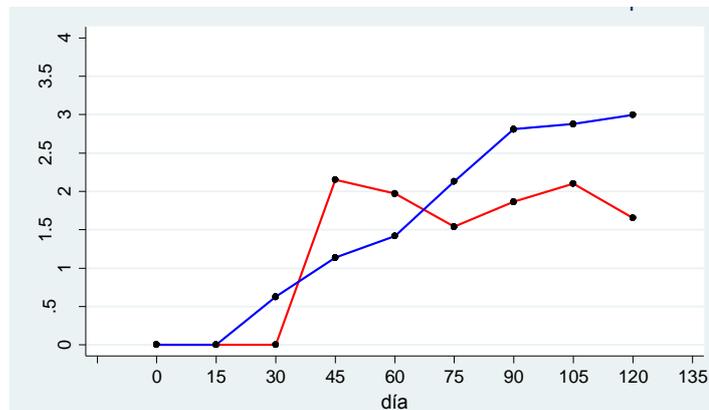


Figura 9: Evolución del recuento bacteriano de *Brochothrix thermosphacta*, en los 120 días de estudio expresados en logaritmo decimal. Media del frigorífico "A" (línea roja), media del frigorífico "B" (línea azul).

Siguiendo con el objetivo de estudiar el crecimiento bacteriano en carne refrigerada entre 0 y 4 °C (factor extrínseco imprescindible para inhibir o reducir el crecimiento bacteriano). En este estudio se controló regularmente la temperatura de la carne en el centro térmico y las mediciones se representan en la figura 10. Los límites establecidos de temperatura se delimitan con las líneas rojas y podemos observar que todas las muestras se encuentran dentro de estos valores.

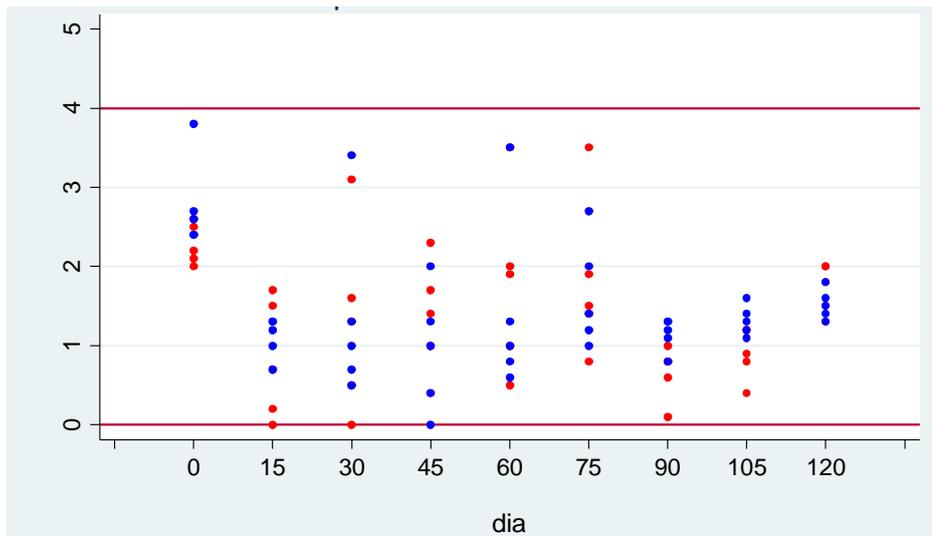


Figura 10: *Temperaturas tomadas en el centro térmico de las muestras en cada uno de los días de análisis. Muestras del frigorífico "A" (puntos rojos), muestras del frigorífico "B" (puntos azules) límite inferior, 0°C y límite superior, 4°C (líneas rojas).*

Como se puede ver en la figura 10, las temperaturas tiene una amplia distribución dentro del rango establecido en cada uno de los días de análisis, esto se lo adjudicamos a que las muestras de carne dentro de la heladera donde eran conservadas, se sometían a leves diferencias de temperatura según el estante en el que se ubicaban dentro de la misma, ya que habían lugares donde la temperatura era menor que en otros.

Con respecto a los valores de pH obtenidos al día 0 y al día 120, para el frigorífico "A" se obtuvo un valor inicial promedio de las cinco muestras de 5,6 y un valor final de 5,5. En la medición realizada para el frigorífico "B" en el día 0 se obtuvo un valor de pH promedio fue de 5,7 y en el día 120 de 5,6. Lo que demuestra que en ambas plantas de faena el pH se mantuvo con un mínimo descenso en el periodo de estudio, el cual pudo ser provocado por las bacterias ácido lácticas que pueden haber crecido en las muestras de carne envasada al vacío gracias a su comportamiento anaeróbico. Estas bacterias producen ácido láctico como producto

principal del metabolismo fermentativo, el cual hace que el pH se mantenga o disminuya.

La caída del pH no es muy marcada, debido a que estas bacterias utilizan los carbohidratos para su metabolismo, los cuales se vuelven escasos a medida que comienzan a crecer los microorganismos. Como consecuencia de esto la producción de ácido láctico es mínima, lo que lleva a que el pH tenga un descenso leve.

8 CONCLUSIONES

Todos los microorganismos estudiados obtuvieron recuentos iniciales dentro de los límites aceptados a nivel nacional e internacional para el día cero; reflejando así, las correctas medidas higiénico-sanitarias en los procesos realizados en la industria.

Según los resultados obtenidos, tomando el intervalo de confianza del 95% de los Aerobios mesófilos totales, podemos decir que al día 60 todas las muestras se encuentran por debajo del límites microbiológicos establecidos por el ICMSF 2000 y la Ordenanza Bromatológica de la IMM 1996, de 7 log ufc/g y que a partir de ese día algunas muestras comenzaron a superar dicho límite.

En cuanto a Aerobios mesófilos totales, la media del recuento de ambos frigoríficos superó al día 120 el límite de 7 log ufc/g establecido por ICMSF 2000 y la Ordenanza Bromatológica de la IMM 1996.

La media de los Coliformes llegó al límite al día 105 solo en el frigorífico "A", pero tomando en conjunto ambos frigoríficos, no se llegó al límite de 2 log ufc/g como establece el CENAN 1982 en los 120 días de estudio.

El crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* en los primeros días de estudio se vio afectado por la temperatura y el pH cercano a 5.6 de las muestras. La carga de este microorganismo aumentó hacia el final del estudio como era de esperar ya que es una bacteria alterante de la carne.

Estos resultados creemos que se produjeron en el presente estudio gracias a las buenas condiciones de almacenamiento, la baja carga inicial de los microorganismos, el pH adecuado luego de la maduración y el correcto envasado al vacío. Por lo que se debe tener mucho cuidado en dichos aspectos ya que son variables imprescindibles para la vida útil en los productos.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. American Public Health Association (APHA). (2001) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4° ed. Washington, American Public Health Association, 676p.
2. Bell R., Garout A. (1994) The Effective Product Life of Vacuum-Packaged Beef Imported into Saudi Arabia by Sea, as Assessed by Chemical, Microbiological and Organoleptic Criteria. *Meat Science* 36:381-396.
3. Bem, Z., Hechemann, H. (1996) Refrigeración y almacenamiento de la carne refrigerada, *Procesos microbiológicos. Fleischwirtschaft (español)*, 76(1): 33-40.
4. Bielli A. (2010) Estructura del músculo. En: Bianchi G., Feed O. *Introducción a la ciencia de la carne*. Montevideo, Hemisferio sur, pp 51-74.
5. Bossio A., Terra J. P. (2003) Bolsas termo contraíbles de barrera para el envasado al vacío. *Carnes y Alimentos* 4 (9):44-46.
6. Bridson E. Y. (2006) *The Oxoid Manual*. 9ª ed. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/221093215/Oxoid-Manual-9th-Edition>. Fecha de consulta: 27 de enero del 2016.
7. Bureau G., Multon J. L. (1995) *Embalaje de los alimentos de gran consumo*. Zaragoza, Acribia, 748p.
8. Campbell R., Egan A., Grau F., Shay B. (1979) The Growth of *Microbacterium thermosphactum* on Beef. *Journal of Applied Bacteriology*. 47: 505-509.
9. Cárdenas F., Giannuzzi L. (2005) Influencia del envasado en la flora cárnica. *La Industria Cárnica Latinoamericana*. 137: 40-45.
10. Casp A., Abril J. (1999) *Procesos de conservación de alimentos*. Madrid, Artes gráficas, 494p.
11. Castro L. E. (2002) La carne y su Calidad. En: Montossi, F. *Investigación aplicada a la cadena cárnica: avances obtenidos, carne ovina de calidad*. INIA Serie Técnica N° 126, p. 47-49.
12. Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (CENAN). (1982) *Recopilación normas microbiológicas de los alimentos y asimilados (superficies, aguas diferentes de consumo, aire, subproductos) otros parámetros físico-químicos de interés sanitario*. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/119171261/Actualizacion-normas-microbiologicas-enero-2012#scribd>. Fecha de consulta: 11 de enero del 2016.
13. Dainty R., Mackey B. (1992) The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology Symposium (Suppl 73)*: 103-114.
14. Dassatti G. (2008) Acondicionamiento térmico de la industria alimentaria. *Carnes y Alimentos* 9 (25):42-51.
15. Delgado V., Quartino L. (2013) *Evaluación de la calidad microbiológica de cortes bovinos envasados al vacío y mantenidos a temperatura de refrigeración*. Tesis, Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad de la República, Facultad de Veterinaria. Montevideo, 40p.

16. Dey J. (2007) Carne bovina enfriada al vacío -44.000 toneladas-. Buenos Aires, Akian, 64p.
17. DIFCO. (1984) Manual DIFCO. 10ª ed. Detroit, DIFCO, 1155 p.
18. Effenberger G., Schotte K. (1972) Empaquetado de la carne y productos cárnicos. Zaragoza, Acribia, 186 p.
19. Ercolini D., Russo F., Torrieri E., Masi P., Villani F. (2006) Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7): 4663-4671.
20. FAO, WHO. (2001) Codex Alimentarius General Requirements (food hygiene). 2º Ed. Roma, FAO, 248 p.
21. FAO, WHO. (2003) Codex Alimentarius Food hygiene Basic texts. 3º Ed. Roma, FAO, 68 p.
22. FAO. (1992) Manual para el control de la calidad de alimentos 12. La garantía de la calidad en el laboratorio microbiológico de control de los alimentos. Disponible en: www.fao.org/3/a-t0451s.pdf. Fecha de consulta: 10 de Diciembre del 2015.
23. Fellows P. (1994) Tecnología del procesado de los alimentos: principios y prácticas, Zaragoza, Acribia, 549 p.
24. Forrest A. (1979) Fundamentos de ciencia de la carne. Zaragoza, Acribia, 364 p.
25. Forsythe S. J., Hayes P. R. (1999) Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP. 2º ed. Zaragoza, Acribia, 489 p.
26. Gracey J. E. (1989) Infecciones e intoxicaciones alimentarias y microbiología de la carne. En: Gracey J.E. (Ed.) Higiene de la carne. Madrid, Interamericana, pp 209-238.
27. Gribble A., Brightwell G. (2013) Spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and *campestris* in chilled vacuum packaged lamb, and their detection and identification by real time PCR. *Meat Science* 94: 361–368.
28. Grompone M. (2010) Composición química de los tejidos: lípidos. En: Bianchi G., Feed O., (Coord.) Introducción a la ciencia de la carne. Montevideo, Hemisferio sur, pp 76-113.
29. Hernández- Macedo M. L., Barancelli G. V., Contreras- Castillo C. J. (2011) Microbial deterioration of vacuum-packaged chilled beef cuts and techniques for microbiota detection and characterization: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 1-11.
30. ICMSF. (1980) Ecología microbiana de los alimentos 1 – Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Zaragoza, Acribia, 332 p.
31. ICMSF. (2000) Microorganismos de los alimentos 1. Su significado y métodos de enumeración. 2º Ed. Zaragoza, Acribia, 439p.
32. IMM (1996) Decreto 27.235 Ordenanza Bromatológica de la IMM. Diario Oficial, 157p.
33. INAC (2014-2015) Informe Estadístico. Año Agrícola. 83 p.

34. INAC. (2009) Manual de control de calidad. Disponible en: <http://www.inac.gub.uy/innovaportal/v/9878/2/innova.front/manuales>. Fecha de consulta: 2 de Febrero del 2016.
35. INAC. (2015) Manual de carne Bovina y Ovina. Disponible en: <http://www.inac.gub.uy/innovaportal/v/1852/17/innova.front/manual-de-carnes-bovina-y-ovina>. Fecha de consulta: 10 de enero del 2016.
36. Jasper W., Placzek R. (1980) Conservación de la carne por el frío. Zaragoza, Acribia, 131p.
37. Jennings William E. (1981) Cambios deteriorantes en la carne. En: Libby J. A. (Ed.) Higiene de la carne. México, Continental, pp 257-273.
38. Lagerstedt A., Ahnström M., Lundström K. (2011) Vacuum skin pack of beef. A consumer friendly alternative. Meat Science 88: 391–396.
39. Lambert A., Smith J., Dodds K. (1991) Life extension and microbiological safety of fresh meat - a review. Food Microbiology 8: 267-297.
40. Lawrie R. A. (1977) Ciencia de la carne. Zaragoza, Acribia, 456 p.
41. Lee K., Yoon C. (2001) Quality changes and shelf life of imported vacuum-packaged beef chuck during storage at 0°C. Meat Science 59: 71–77.
42. Madrid A. (2013) Microbiología de los alimentos En: Madrid A. Esteire E. Cenzano J. M. Ciencia y tecnología de los alimentos. Madrid, AMV, V 1, pp 140-159.
43. Madrid A., Gómez-Pastrana J. M., Santiago F., Madrid J. M., Cenzano J. M. (2003) Refrigeración, congelación y envasado de los alimentos. Madrid, AMV, 303p.
44. Masana M., Meichtri L., Rodriguez R. (2002) Determinación de la vida útil en cortes bovinos. Idia 21(2): 157-162.
45. Mateuda J. (2013) Estudio de la microflora bacteriana y cambios fisicoquímicos en carne bovina envasada al vacío y almacenada en frío. Tesis, Licenciatura en Bioquímica. Universidad de la República, Facultad de Ciencias. Montevideo, 61p.
46. Meinert L., Christensen H. (2014) Calculation helps meat processors. FleischWirtschaft (international), 29:42-44.
47. MGAP. (1983) Reglamento oficial de inspección veterinaria de productos de origen animal Decreto 369/983 Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,MGAP,mgap-buscador,O,es,0,SRC;89;0;34641;A;SRC;>. Fecha de consulta: 25 de enero del 2016.
48. Miller R. (2010) Atributos sensoriales y de calidad. En: Van Overbeke D L. (Ed.) Manual de Seguridad y Calidad de la carne de vacuno. Zaragoza, Acribia. pp 139-174.
49. Moreno B. (2006) Análisis microbiológicos obligatorios para evaluar la contaminación superficial de carnes, instalaciones, equipos y utensilios en los mataderos. En: Moreno B. (Ed.) Higiene e Inspección de las carnes I. Madrid, Díaz de Santos. pp 324-337.

50. MSP (1994) Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto N° 315/994. 5° Ed 2012. Montevideo, Impo, 459p.
51. Niinivaara F., Antila P. (1973) El valor nutritivo de la carne. Zaragoza, Acribia, 184p.
52. Noskova G. L. (1972) Microbiología de las carnes conservadas en el frío. Zaragoza, Acribia, 111 p.
53. Ockerman Herbert W. (1981) Química del músculo y de los órganos mayores. En: James A. Libby. (Ed.) Higiene de la carne. México, Continental, pp 245-246.
54. Price J. F., Schweigert B. (1994) Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Zaragoza, Acribia, 581 p.
55. Reglamento (CE) N° 2073/2005 Disponible en: <https://www.um.es/casan/documentos/legislacion/ALIMENTARIA/CRITERIOS%20MICROBIOLOGICOS/reglamento-2073-2005.pdf>. Fecha de consulta: 11 de Enero del 2016.
56. Rey A. M., Silvestre A. (2011) Comer sin riesgo 1. 3° Ed. Buenos Aires, Hemisferio Sur, 334 p.
57. Schöbitz R., De la Vega J., Tamayo R. (1990). Calidad microbiológica y sensorial de carne de vacuno envasada al vacío almacenada a diferentes temperaturas. Fleischwirtschaft (Español) 2: 31–36.
58. Signorini M. (2007) Microbiología de carnes envasadas al vacío y la biopreservación como medio para prolongar la vida útil de anaquel. Nacameh, 1(1): 26-40.
59. Smith M. (1985) The generation time, lag time, and minimum temperature of growth of coliform organisms on meat, and the implications for codes of practice in abattoirs. The Journal of Hygiene 94: 289-300.
60. Sneath P., Jones D. (1976) Brochothrix, a new genus tentatively placed in the family Lactobacillaceae. Intercontinental Journal of Systematic Bacteriology 26(2): 102-104.
61. StataCorp (2015). Stata: Release 14. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LP.
62. Swatland H. J. (1991) Estructura y desarrollo de los animales de abasto. Zaragoza, Acribia, 443p.
63. Varnam A., Sutherland J. (1998) Carne y productos cárnicos Tecnología, química y microbiología. Zaragoza, Acribia, 423 p.
64. Venugopal R., Ingham S., McCurdy A., Jones G. (1993) Anaerobic Microbiology of Fresh Beef Packaged Under Modified Atmosphere or Vacuum. Journal of Food Science. 58(5): 935-938.
65. Warriss P. D. (2003) Ciencia de la carne. Zaragoza, Acribia, 309 p.
66. Weinling H. (1973) Tecnología práctica de la carne. Zaragoza, Acribia, 392 p.
67. Wirth F., Leistner L., Rodel W. (1981) Valores orientativos para carne y para los productos- Carne fresca. En: Wirth F., Leistner L., Rodel W. Valores nutritivos de la tecnología cárnica. Zaragoza, Acribia, pp 42-48.