

**DESARROLLO DE MODELOS MATEMATICOS PREDICTIVOS, PARA LA
ESTIMACION DE VIDA UTIL EN DERIVADOS CARNICOS PROCESADOS DE
LA COOPERATIVA COLANTA.**

**Trabajo de Grado para optar al título de
Microbiólogo**

LIZETH MARCELA CAICEDO MOGOLLÓN



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PAMPLONA
2016**

DESARROLLO DE MODELOS MATEMATICOS PREDICTIVOS, PARA LA ESTIMACION DE VIDA UTIL EN DERIVADOS CARNICOS PROCESADOS DE LA COOPERATIVA COLANTA.



Trabajo de Grado:

LIZETH MARCELA CAICEDO MOGOLLÓN

Práctica – Microbiología Planta Derivados Cárnicos

Asesor

ENRIQUE ALFONSO CABEZA HERRERA, Ph.D.



**FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PAMPLONA**

2016

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma Presidente Del Jurado

Firma 1° Jurado

Firma 2° Jurado

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	3
1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. MARCO REFERENCIAL	5
3.1 MARCO LEGAL	5
3.1.1 Decreto 1500 de 2007.Ministerio de la Protección Social, Colombia.	5
3.1.2 NTC 1325:2008. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC.	5
3.1.3 NTC 5034:2002. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC.	5
3.1.4 Norma ISO 17410:2001. International Organization for Standarization (Organización Internacional de Normalización).	5
3.2 ANTECEDENTES	6
3.3 MARCO TEORICO	7
3.3.1 Microbiología de los alimentos	7
3.3.2 Clasificación general de los modelos predictivos	7
3.3.2.1 Modelos cinéticos.	7
3.3.2.2 Modelos Probabilísticos.	7
3.3.2.3 Modelos Empíricos.	8
3.3.2.4 Modelos mecanicistas.	8
3.3.3 Clasificación de Whiting y Buchanan.	8
3.3.3.1 Modelos primarios.	8
3.3.3.2 Modelos secundarios.	12
3.3.3.3 Modelos Terciarios.	14
3.3.4 Desarrollo de modelos predictivos	15
3.3.4.1 Diseño y planteamiento de los modelos	15
3.3.4.2 Acumulación de Datos	16
3.3.4.3 Ajuste de los Datos	16
3.3.4.4 Modelamiento secundario	16
3.3.4.5 Validación de los modelos	16
3.3.5 Índices para la evaluación de desempeño (comparación estadística) de los modelos predictivos.	17
3.3.5.1 Coeficiente de determinación o regresión (R^2)	18
3.3.5.2 Coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj})	18
3.3.5.3 Raíz del error cuadrático medio (RMSE)	18
3.3.5.4 Factor de sesgo (Bias factor- B_f)	19
3.3.5.5 Factor de precisión (Accuracy Factor - A_f)	19
3.3.6 Vida útil de los alimentos	20
3.3.6.1 Variables que afectan la vida útil de los derivados cárnicos	21
3.3.6.2 Métodos para la estimación de vida útil	21
3.3.7 Alteración de los productos cárnicos cocidos	24
3.3.8 Microbiología de los productos cárnicos cocidos y sus alteraciones	26

3.3.8.1	Bacterias ácido lácticas	28
3.3.8.2	Microorganismos Psicrótrofos	29
4.	MATERIALES Y METODOS	31
4.1	MATERIAL	31
4.2	MÉTODOS	31
4.2.1	Evaluación microbiológica de productos cárnicos procesados empacados al vacío	32
4.2.2	Preparación de la muestra y diluciones iniciales	32
4.2.3	Recuento de Bacterias ácido lácticas (BAL)	32
4.2.4	Recuento de microorganismos aerobios psicrotrofos (MAP)	33
4.2.5	Análisis estadístico	33
4.2.6	Otras actividades desarrolladas durante la práctica	33
4.2.6.1	Alérgenos	33
4.2.6.2	Análisis microbiológico de ambiente	33
4.2.6.3	Análisis microbiológico de manipuladores, superficies y equipos	34
4.2.6.4	Análisis microbiológico de aguas	34
4.2.6.5	Controles positivos y negativos en agar y en petrifilm	34
4.2.6.6	Análisis microbiológico a producto terminado	34
4.2.6.7	Toma de muestras ambientales	35
5.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	36
6.	RESULTADOS Y DISCUSION	37
6.1	RECUESTO DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS EN TOCINETA, MORCILLA, SALCHICHA Y JAMÓN	37
6.2	RECUESTO DE BACTERIAS PSICRÓTROFAS VIABLES (BPV) EN TOCINETA, MORCILLA, SALCHICHA XL Y JAMÓN	42
6.3	DESARROLLO DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS PARA BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS CRECIDAS EN TOCINETA, MORCILLA Y SALCHICHA XL	47
6.3.1	Modelo matemático para el crecimiento de BAL en Tocineta.	48
6.3.2	Modelo matemático para el crecimiento de BAL en morcilla.	49
6.3.3	Modelo matemático para el crecimiento de BAL en salchicha XL.	50
6.4	VALIDACIÓN DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS PARA EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS EN TOCINETA, MORCILLA Y SALCHICHA XL	51
6.4.1	Validación interna de los modelos matemáticos para el crecimiento de BAL en tocineta, morcilla y salchicha.	51
6.4.2	Validación externa de los modelos matemáticos para el crecimiento de BAL en tocineta, morcilla y salchicha.	55
6.4.3	Estimación de la vida útil de la tocineta, morcilla y salchicha usando los modelos matemáticos predictivos.	58
7.	CONCLUSIONES	61
8.	RECOMENDACIONES	63
	BIBLIOGRAFIA	64
	ANEXOS	73

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Ubicación de los productos terminados en las diferentes cavas de almacenamiento ajustadas a temperaturas entre 4°C y 14°C.	31
Tabla 2. Parámetros cinéticos de BAL en tocineta, obtenidos con el software DMFit.	41
Tabla 3. Parámetros cinéticos de BAL en morcilla, obtenidos con el software DMFit.	41
Tabla 4. Parámetros cinéticos de BAL en salchicha XL, obtenidos con el software DMFit.	41
Tabla 5. Parámetros cinéticos de BPV en tocineta, obtenidos con el software DMFit.	46
Tabla 6. Parámetros cinéticos de BPV en morcilla, obtenidos con el software DMFit	47
Tabla 7. Parámetros cinéticos de BPV en salchicha XL, obtenidos con el software DMFit	47
Tabla 8. Índices estadísticos de calidad del ajuste obtenidos para los modelos de crecimiento de BAL en tocineta, morcilla y salchicha	51
Tabla 9. Comparación de las velocidades de crecimiento observadas y predichas para el crecimiento de BAL en tocineta almacenada en refrigeración, a una confianza del 95%.	55
Tabla 10. Comparación de las velocidades de crecimiento observadas y predichas para el crecimiento de BAL en morcilla almacenada en refrigeración, a una confianza del 95%.	55
Tabla 11. Comparación de las velocidades de crecimiento observadas y predichas para el crecimiento de BAL en salchicha almacenada en refrigeración, a una confianza del 95%.	56
Tabla 12. Índices de Ross y Mataragas <i>et al.</i> , usados para validar los modelos que describen el efecto de la temperatura de refrigeración en el crecimiento de BAL en tocineta, morcilla y salchicha.	56
Tabla 13. Tasas máximas de crecimiento estimadas, tiempo de generación y tiempo de vida útil (TVU) calculado para cada producto a temperaturas entre 4°C y 14°C.	59

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación gráfica del modelo lineal en tres fases y sus parámetros cinéticos.	12
Figura 2. Curvas de crecimiento de BAL en tocineta almacenada en refrigeración.	37
Figura 3. Curvas de crecimiento de BAL en tocineta almacenada en refrigeración ajustadas con el modelo primario de Baranyi y Roberts.	37
Figura 4. Curvas de crecimiento de BAL en morcilla almacenada en refrigeración.	38
Figura 5. Curvas de crecimiento de BAL en morcilla almacenada en refrigeración ajustadas con el modelo primario de Baranyi y Roberts.	38
Figura 6. Curvas de crecimiento de BAL en salchicha XL almacenada en refrigeración.	39
Figura 7. Curvas de crecimiento de BAL en salchicha XL almacenada en refrigeración ajustadas con el modelo primario de Baranyi y Roberts.	39
Figura 8. Curvas de crecimiento de BAL en jamón almacenada en refrigeración.	40
Figura 9. Curvas de crecimiento de BPV en tocineta almacenada en refrigeración.	42
Figura 10. Curvas de crecimiento de BPV en tocineta almacenada en refrigeración ajustadas con el modelo primario de Baranyi y Roberts.	43
Figura 11. Curvas de crecimiento de BPV en morcilla almacenada en refrigeración.	43
Figura 12. Curvas de crecimiento de BPV en morcilla almacenada en refrigeración ajustadas con el modelo primario de Baranyi y Roberts.	44
Figura 13. Curvas de crecimiento de BPV en salchicha XL almacenada en refrigeración.	44
Figura 14. Curvas de crecimiento de BPV en salchicha XL almacenada en refrigeración ajustadas con el modelo primario de Baranyi y Roberts.	45
Figura 15. Curvas de crecimiento de BPV en jamón almacenada en refrigeración.	46
Figura 16. Gráfico del modelo ajustado para crecimiento de BAL en tocineta almacenada en refrigeración.	49
Figura 17. Gráfico del modelo ajustado para crecimiento de BAL en morcilla almacenada en refrigeración.	50
Figura 18. Gráfico del modelo ajustado para crecimiento de BAL en salchicha XL almacenada en refrigeración.	51
Figura 19. Gráfico de equivalencia entre los valores observados y los estimados por el modelo de crecimiento de BAL en tocineta.	53
Figura 20. Gráfico de equivalencia entre los valores observados y los estimados por el modelo de crecimiento de BAL en tocineta	53
Figura 21. Gráfico de equivalencia entre los valores observados y los estimados por el modelo de crecimiento de BAL en salchicha XL.	54

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Comparación de modelos alternos para el crecimiento de BAL en tocineta.	73
Anexo 2. Análisis estadístico del modelo de crecimiento de BAL en tocineta.	74
Anexo 3. Comparación de modelos alternos para el crecimiento de BAL en morcilla.	75
Anexo 4. Análisis estadístico del modelo de crecimiento de BAL en morcilla.	76
Anexo 5. Comparación de modelos alternos para el crecimiento de BAL en salchicha XL.	77
Anexo 6. Análisis estadístico del modelo de crecimiento de BAL en salchicha XL.	78

INTRODUCCIÓN

El deterioro de los alimentos provocado por agentes biológicos es un problema de gran importancia económica para las industrias del sector alimentario y para los consumidores. Concretamente, en el caso de los derivados cárnicos, su composición (alto contenido de proteínas y elevado contenido de agua); lo convierte en un medio ideal y atractivo para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos.

Su alto contenido nutricional y sus características sensoriales, lo hace uno de los productos de mayor consumo y a su vez de mayor riesgo para la salud de los consumidores por su susceptibilidad a ser contaminado fácilmente.

Según el Decreto 1500 de 2007 del Ministerio de la Protección Social define los derivados cárnicos como *“los productos que utilizan en su preparación carne, sangre, vísceras u otros productos comestibles de origen animal, que hayan sido autorizados para el consumo humano, adicionando o no aditivos, especies aprobadas y otros ingredientes”*.

Partiendo de esta base, la carne y sus derivados necesitan unas condiciones especiales para preservar su vida útil, que permitan asegurar la calidad de estos alimentos por largos periodos de tiempo sin que se altere las condiciones fisicoquímicas y organolépticas del producto. La temperatura por ejemplo, juega un papel crucial en el manejo y procesamiento de materias primas, distribución y almacenamiento de producto terminado. Un buen control de temperatura es imprescindible para alcanzar la vida útil que permita una adecuada comercialización del alimento. (Simpson *et al.*, 1989).

No obstante, la condición mencionada anteriormente no es la única que acorta el periodo de vida útil de los derivados cárnicos, la permeabilidad al oxígeno de los empaques, el pH y la actividad acuosa de estos alimentos se convierten en un medio ideal para el crecimiento de microorganismos.

Infelizmente, la cadena de frío que debe conservar el alimento en ocasiones es interrumpida durante las fases de transporte y distribución acortando el periodo de vida útil de los mismos, confiriendo un medio propicio para la aparición y desarrollo de microorganismos.

La aplicación de la Microbiología predictiva en los sectores industriales es de gran importancia ya que permite estimar, describir y evaluar el crecimiento de los microorganismos bajo condiciones ambientales específicas a través de diferentes disciplinas como la microbiología, la matemática y la estadística.

Los análisis microbiológicos están basados en técnicas de laboratorio que requieren de tiempo asociado al crecimiento de los microorganismos, por tal motivo, se han desarrollado nuevos métodos que permitan monitorizar de manera rápida el crecimiento microbiano mediante el uso de ecuaciones matemáticas.

Entre los microorganismos implicados en los procesos de descomposición y/o alteración de los embutidos, encontramos las bacterias ácido lácticas (BAL), las

bacterias psicrótrofas y *Brochotrix thermosphacta* entre otras (Cabeza *et al.*, 2006; Mateo *et al.*, 2006). Así pues, es importante conocer la capacidad de crecimiento de estos microorganismos para multiplicarse en el alimento bajo condiciones asociadas a su procesado, conservación, almacenamiento y distribución.

1.

OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Validar modelos matemáticos predictivos, para la estimación de la vida útil biológica en los derivados cárnicos procesados de la Cooperativa Colanta.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el crecimiento cinético de microorganismos responsables de la alteración de algunos productos cárnicos procesados (jamón, salchicha, tocineta y morcilla) empacados al vacío.
- Estudiar el efecto de la temperatura, como factor físico determinante en el crecimiento de microorganismos alterantes en derivados cárnicos procesados.
- Desarrollar modelos predictivos empleando datos experimentales del crecimiento cinético de microorganismos alterantes de productos cárnicos cocidos, obtenidos mediante el recuento en placa.

2. JUSTIFICACIÓN

La microbiología predictiva se ha convertido en una disciplina fundamental para las grandes industrias del sector alimentario, gracias a la implementación de esta herramienta se ha podido describir el comportamiento de los microorganismos en los alimentos bajo factores físicos específicos, que pueden afectarlos experimentando en ellos cambios en sus propiedades sensoriales.

Los procedimientos que se llevan a cabo actualmente por la Cooperativa Colanta para la determinación de vida útil en productos cárnicos procesados, se realizan mediante la técnica tradicional en placa, los resultados obtenidos por esta técnica son estudiados a través de herramientas estadísticas, lo que conlleva de tiempos prolongados de análisis asociado al crecimiento de los microorganismos, verificación periódica de la vida útil de los productos, gran cantidad de materiales y personal capacitado para su ejecución.

Evaluar periódicamente el tiempo en que tarda un alimento antes de ser declarado no apto para consumo, le permite a una empresa evaluar la efectividad de los procesos en la trazabilidad de un producto, además de evitar devoluciones por pérdida de calidad desde el punto de vista fisicoquímico, microbiológico y sensorial.

Por ello, los modelos predictivos, en comparación con los métodos tradicionales han sido de gran relevancia ya que se trata de un método relativamente económico, el cual permite obtener resultados en menor tiempo para la determinación objetiva de la calidad de los alimentos.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. MARCO LEGAL

La siguiente normatividad proporciona los requerimientos mínimos que debe cumplir un producto cárnico para mantener su calidad, así como los métodos de análisis microbiológicos aplicados en el desarrollo del presente trabajo.

3.1.1. Decreto 1500 de 2007. Ministerio de la Protección Social, Colombia.

Mediante este decreto, se estableció un reglamento técnico por el cual se crea el Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la Carne, Productos Cárnicos Comestibles y Derivados Cárnicos Destinados para el Consumo Humano y los requisitos sanitarios y de inocuidad que se deben cumplir en su producción primaria, beneficio, desposte, desprese, procesamiento, almacenamiento, transporte, comercialización, expendio, importación o exportación.

3.1.2. NTC 1325:2008. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC.

La NTC 1325 de 2008 establece los requisitos que deben cumplir los productos cárnicos procesados no enlatados.

3.1.3. NTC 5034:2002. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC.

La Norma Técnica Colombiana - NTC 5034 (Microbiología de alimentos y alimentos para animales) establece el método horizontal para el recuento de bacterias mesofílicas de ácido láctico, mediante la técnica de recuento de colonias en placa profunda incubadas a 30°C.

3.1.4. Norma ISO 17410:2001. International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización).

La Norma ISO 17410:2001 (Microbiología de alimentos y alimentos para animales) especifica el método para la enumeración de microorganismos psicrotróficos por medio de la técnica de recuento de colonias en placa profunda incubadas a 6,5°C. Este método es aplicable a los productos alimenticios para consumo humano o animal.

3.2. ANTECEDENTES

Se debe considerar que este trabajo aporta uno de los primeros modelos predictivos para bacterias acidolácticas en productos cárnicos cocidos o semicocidos, ya que solo se han encontrado dos referentes bibliográficos en publicaciones indexadas, y otro más en proceso de publicación que tratan sobre el modelamiento de bacterias acidolácticas en este tipo de productos.

En un primer trabajo, Cayré *et al.* (2005) evaluaron el efecto de la temperatura de almacenamiento y la permeabilidad a los gases de los empaques usados sobre el crecimiento de bacterias ácido lácticas y *Brochothrix thermosphacta* en emulsiones cárnicas cocidas. Los autores usaron temperaturas de 0°C, 8°C y 15 °C, y estimaron los parámetros cinéticos empleando el modelo primario de Gompertz. En ese trabajo encontraron que el crecimiento de BAL fue significativamente mayor que el de *B. thermosphacta* en todas las combinaciones evaluadas. La influencia de las dos fuentes de variabilidad (permeabilidad al oxígeno y del empaque y la temperatura) fue analizada, encontrando que la temperatura tiene un efecto significativo a un $p < 0,01$ para los dos grupos, mientras que la permeabilidad del empaque solo fue significativo para el crecimiento *B. thermosphacta*, inhibiendo su crecimiento en condiciones de vacío. Así mismo, tampoco encontraron que el pH afectara el crecimiento de los grupos evaluados. Finalmente, concluyen que a pesar de que la temperatura presenta efecto significativo, en general no se encontró un aumento en la alteración por BAL cuando la temperatura aumentó hasta 15°C.

Cayré *et al.* en 2007 presentaron un artículo titulado “Selección de un modelo primario para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas. En este artículo compararon tres modelos primarios para ajustar la curva de crecimiento de BAL y *B. thermosphacta* en emulsiones cárnicas cocidas y al mismo tiempo poder estimar los parámetros cinéticos de crecimiento tales como tiempo de latencia (), máxima velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) y máxima densidad bacteriana ($Y_{\text{máx}}$). Los modelos evaluados fueron el Logístico, modificado de Gompertz y Baranyi y Roberts, comparando la bondad de ajuste de los modelos, la incertidumbre y precisión de las estimaciones. Los autores encontraron que los modelos de Gompertz y Baranyi produjeron los mejores ajustes en la mayoría de los casos presentados, sin encontrar diferencias significativas entre ellos para $\mu_{\text{máx}}$ y $Y_{\text{máx}}$. Sin embargo, las estimaciones de $Y_{\text{máx}}$ dadas por el modelo de Baranyi fueron menos exactas, concluyendo que los resultados mostraron que el modelo de Gompertz presentó un mejor comportamiento.

Finalmente, Laguado *et al.*, sometieron un artículo en 2016, donde desarrollaron 24 modelos matemáticos para predecir el crecimiento de bacterias acidolácticas en chorizo cocido empacado al vacío y almacenado a temperaturas de refrigeración (2°C hasta 12°C), validando los siete mejores modelos con respecto a sus índices de calidad de ajuste. En ese trabajo los autores usaron el modelo de Baranyi y Roberts para el ajuste de los datos y obtención de los parámetros

cinéticos, y posteriormente desarrollaron los modelos secundarios usando un procedimiento de regresión simple con transformación de variables. Al finalizar el proceso de validación y como todos los modelos mostraron unos porcentajes bajos de error de predicción (menor al 6% en todos los casos), concluyen que en esos casos se recomienda utilizar el modelo más simple, el cual correspondió a un modelo lineal.

3.3. MARCO TEÓRICO

3.3.1. Microbiología predictiva de alimentos.

La microbiología predictiva de alimentos es una disciplina de la microbiología que combina elementos de matemáticas, estadística, informática y microbiología, y que permiten estimar a través de modelos matemáticos y técnicas computacionales, el comportamiento de los microorganismos en los alimentos bajo un conjunto de factores extrínsecos e intrínsecos específicos como: Temperatura (T), pH, actividad de agua (a_w), entre otros (Ross y McMeekin, 1994). El concepto de Microbiología predictiva es que un conocimiento detallado de las respuestas de los microorganismos frente a las condiciones ambientales permite evaluar objetivamente el efecto del procesamiento, la distribución y almacenamiento en la seguridad microbiológica y la calidad de los alimentos (McMeekin *et al.*, 2002).

3.3.2. Clasificación general de los modelos predictivos.

Los modelos usados en microbiología predictiva se pueden clasificar en diversas formas. Los modelos se clasifican según su finalidad en modelos cinéticos o probabilísticos; según su base matemática o aproximación estadística en modelos empíricos o mecanicistas. Desde el punto de vista de la respuesta de los microorganismos, los modelos pueden clasificarse como modelos de crecimiento o modelos de supervivencia (McMeekin *et al.*, 2002; Datta y Sablani, 2007).

3.3.2.1. Modelos cinéticos

Los modelos cinéticos estudian la velocidad de crecimiento o muerte de los microorganismos con respecto a diferentes variables ambientales como temperatura, pH ó a_w . Además, pueden ser incluidos otros factores como la concentración gaseosa, el potencial de óxido reducción, humedad relativa, el contenido de nutrientes y las propiedades antimicrobianas.

3.3.2.2. Modelos probabilísticos

Los modelos probabilísticos tal y como lo señala su nombre se relacionan con la posibilidad de predecir o estimar los límites de crecimiento de un microorganismo cuya sola presencia constituye un riesgo, por ejemplo esporas de *Clostridium spp.*, para un periodo de tiempo determinado. Este tipo de modelos también permiten estimar la probabilidad de que un microorganismo pueda o no producir un metabolito en un periodo de tiempo.

3.3.2.3. Modelos empíricos

Son el resultado de modelaciones de ensayo y error, es decir; que son de interés en situaciones prácticas y simplemente describen los datos de crecimiento bajo condiciones experimentales. Entre los modelos más representativos de este grupo se encuentra el modelo modificado de Gompertz, el modelo logístico, el modelo de la raíz cuadrada de Ratkowsky, las ecuaciones polinómicas y los modelos de redes neuronales artificiales.

3.3.2.4. Modelos mecanicistas

Los modelos mecanicistas, parten de una base teórica biológica, buscando comparar a través de experimentos el comportamiento de los microorganismos frente a ciertos factores. El modelo más representativo de este grupo es el modelo primario de Baranyi y Roberts (Yarce 2013).

3.3.3. Clasificación de Whiting y Buchanan

Ante la falta de uniformidad y posible confusión entre los sistemas de clasificación esbozados anteriormente, Whiting y Buchanan plantearon en 1993 un nuevo sistema de clasificación de modelos matemáticos en microbiología predictiva, de acuerdo a la cantidad y tipo de variables que explican, las cuales comprenden desde ecuaciones simples, de primer orden; hasta ecuaciones y expresiones matemáticas complejas y uso de software. El sistema propuesto clasifica los modelos en tres categorías: primarios, secundarios y terciarios.

3.3.3.1. Modelos primarios

Los modelos primarios describen cambios en la respuesta microbiana con respecto al tiempo. Dicha respuesta puede ser evaluada a través de medidas directas cuando permite cuantificarlas unidades formadoras de colonias por mililitro o gramo de alimento (ufc/ml ó g), la formación de toxinas y los niveles de sustrato o productos del metabolismo; y medidas indirectas por medición de la densidad óptica o impedancia que se pueden identificar con instrumental especializado. Los datos obtenidos a través de las técnicas nombradas anteriormente generan información acerca de los parámetros cinéticos primarios tales como el tiempo de generación (T_G), duración de la fase de adaptación (), velocidad o tasa de crecimiento específico máximo ($\mu_{m\acute{a}x}$) y densidad máxima y mínima de población ($Y_{m\acute{a}x} - Y_0$).

La representación de la evolución microbiana se suele hacer en logaritmos decimales ($\text{Log}_{10}\text{ufc/ml}$) o natural (Ln ufc/ml) dada la naturaleza exponencial del crecimiento bacteriano. Los modelos primarios son usados generalmente para llevar a cabo el ajuste de datos de crecimiento o muerte, es decir, para hacer que las curvas de crecimiento y/o muerte irregulares se normalicen y obtener los

parámetros cinéticos primarios. De acuerdo con Tirado et al.(2005), ejemplos de modelos primarios son la función modificada de Gompertz y la función logística, y otros modelos mecanicistas desarrollados por Whiting y Cygnarowicz-Provosten 1992, o Baranyi y Roberts en 1994.

- Ecuación modificada de Gompertz. Esta ecuación representa un modelo no lineal de tipo sigmoidal, la cual es una adaptación de la ecuación de Gompertz introducida por Gibson *et al.* (1987), y que ha sido ampliamente usada para el ajuste de curvas de crecimiento (McKellar y Lu, 2004). Se expresa de la siguiente manera:

$$Y_t = Y_0 + ce^{\left\{-e^{-B(t-M)}\right\}}$$

Donde Y_t es el logaritmo de ufc/ml en el tiempo t , Y_0 es el logaritmo del inóculo inicial, C es el cambio en el número de células entre el inóculo inicial y la fase estacionaria, B es la velocidad o tasa de crecimiento relativa, y M es el tiempo al que se alcanza la velocidad máxima de crecimiento.

La fase de adaptación o latencia y la velocidad de crecimiento exponencial se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Fase de adaptación} = M - 1/B$$

$$\text{Velocidad de crecimiento exponencial} = B \cdot C/e$$

La velocidad máxima de crecimiento simula la pendiente de la curva de crecimiento cuando el microorganismo crece exponencialmente. Este parámetro es estimado decidiendo cuál es la parte de la curva que es aproximadamente lineal y posteriormente determinando la pendiente de ésta por regresión lineal. La pendiente de la parte de la curva propuesta a ser lineal es una relación de primer orden.

- Ecuación reparametrizada de Gompertz. La ecuación propuesta por Gibson *et al.* (1987) fue reparametrizada, estableciendo en ella tres parámetros cinéticos de interés biológico. la velocidad de crecimiento (μ_m) que dependerá del microorganismo, fase de adaptación (λ), que se basa en la fase Log y máxima densidad de población (A) que está relacionada con la cantidad de nutrientes, tal y como se evidencia en la siguiente ecuación:

$$y = A \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_m e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

donde A es la asíntota del recuento decimal cuando el tiempo desciende indefinidamente (u_{fc}^{-1}) y corresponde al logaritmo del tamaño de la

población; (μ_m) es la tasa máxima específica de crecimiento (s^{-1}); t_0 es la duración de la fase de adaptación (s), t es el tiempo (s). La ecuación modificada de Gompertz, ha sido ampliamente utilizada en microbiología predictiva para modelar el crecimiento de microorganismos causantes de deterioro en carnes cocidas empacadas al vacío; además, se ha aplicado para describir la vida útil de productos cárnicos, considerándose una fórmula fácil y efectiva en la determinación de los parámetros nombrados anteriormente.

A pesar de su simplicidad, la ecuación modificada de Gompertz no es perfecta y presenta algunos inconvenientes (Li *et al.*, 2007):

- La curva sigmoideal producida por el modelo tiene un punto de inflexión, es decir, se curva de manera continua y no existe un período de incremento lineal durante la fase de crecimiento, en consecuencia, el modelo tiene una falta sistemática en la descripción de la fase exponencial.
- El modelo sobreestima los valores de los parámetros cinéticos.
- Ecuación de Baranyi y Roberts. A diferencia de la ecuación modificada de Gompertz, el modelo de Baranyi y Roberts incluye una fase de crecimiento exponencial lineal, $\mu(x)$, y una fase de latencia que se calcula mediante una función de ajuste. Inicialmente la función de ajuste es 0, ya que las células no están creciendo. Con el tiempo, las células se adaptan a la nueva situación, el factor de ajuste se aumenta a 1, y las células están en su velocidad de crecimiento máxima para una combinación de condiciones ambientales dada. La velocidad de crecimiento exponencial se calcula mediante la función de ajuste de la siguiente manera:

$$\frac{dx}{dt} = \alpha(t)\mu(x)x$$

La población celular máxima es incluida en:

$$\mu(x) = \mu_{\max} \left[1 - \left(\frac{x}{x_{\max}} \right) \right]$$

Adoptando estas ecuaciones, ordenando y convirtiendo a \log_{10} ufc/ml, tenemos:

$$Y_T = Y_0 + \mu_{\max} A(t) - \ln \left(1 + \left\{ \frac{[e^{\mu_{\max} \alpha(t)} - 1]}{e^{(Y_{\max} - Y_0)}} \right\} \right)$$

Donde $\mu_{m\acute{a}x}$ es la tasa máxima exponencial de crecimiento, $A(t)$ es la integral de la funci3n de ajuste $\alpha(t)$, $Y_{m\acute{a}x}$ es la densidad celular máxima (\log_{10} ufc/ml o g) en la fase estacionaria, y Y_0 es la mínima densidad celular (\log_{10} ufc/ml o g).

La fase de latencia determinada a través del modelo de Baranyi y Robert representa una combinaci3n del estado fisiol3gico de la célula (q_0) y la adaptaci3n al nuevo ambiente (U). Una expresi3n de la funci3n de ajuste es:

$$\alpha(t) = \frac{q_0}{[q_0 + e^{(-Ut)}]}$$

La duraci3n de la fase de latencia se calcula como sigue:

$$\lambda = \ln\left(1 + \frac{1}{q_0}\right)U$$

La fase de latencia representa un periodo de transici3n para los microorganismos, donde la célula se adapta a nuevas condiciones; si las células no están preparadas para crecer (q_0 reducido), o la adaptaci3n es lenta (U reducida), la fase de latencia será duradera. Mediante este modelo se puede evidenciar las cuatro partes de la curva del crecimiento microbiano: fase de latencia, fase de crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase de muerte 3 inactivaci3n microbiana. Este modelo permite además, predecir el crecimiento microbiol3gico bajo fluctuaciones de temperatura, lo cual le confiere una ventaja con respecto a otros modelos primarios.

- Modelo lineal en tres fases de Buchanan. El modelo lineal en tres fases, descrito por Buchanan *et al.* (1997), se caracteriza por su simplicidad con respecto a los dos modelos primarios descritos anteriormente. Se trata de un modelo en el cual la curva de crecimiento microbiano es dividida en tres fases: fase de adaptaci3n, fase exponencial y estacionaria. Durante la fase de adaptaci3n el crecimiento microbiano no suele comenzar de inmediato, puesto que las células se están adaptando al nuevo entorno. Por tal motivo la tasa específica de crecimiento es igual a cero ($\mu=0$); una vez adaptadas, las células crecen exponencialmente en un ambiente determinado experimentando una velocidad que es máxima para el microorganismo; en esta etapa la tasa específica de crecimiento es una constante ($\mu=k$), es decir; el logaritmo de la poblaci3n celular aumenta linealmente con el tiempo. Una vez alcanzada la fase estacionaria, ocurre una limitaci3n del crecimiento celular por agotamiento de nutrientes, en este caso la tasa específica de crecimiento vuelve a ser cero ($\mu=0$). Las tres fases del modelo se describen a continuaci3n:

Fase de adaptaci3n:

Para $t < t_{LAG}$, $N_f = N_0$.

Fase exponencial de crecimiento:

Para $t_{LAG} < t < t_{MAX}$, $N_f = N_0 + \mu(t - t_{LAG})$

Fase estacionaria:

Para $t \geq t_{MAX}$, $N_f = N_{MAX}$

Donde, N_f , logaritmo de la densidad de población a tiempo t ($\text{Log}_{10}\text{ufc/ml}$); N_0 , logaritmo de la densidad de población inicial ($\text{Log}_{10}\text{ufc/ml}$); N_{MAX} , logaritmo de la densidad de población máxima mantenido por el ambiente ($\text{Log}_{10}\text{ufc/ml}$); t , tiempo transcurrido (h); t_{LAG} , tiempo en que finaliza la fase de adaptación (h); t_{MAX} , tiempo en el que se alcanza la máxima densidad de población (h); μ , tasa específica de crecimiento ($\text{Log}_{10}\text{ufc/ml h}^{-1}$).

Una representación gráfica del modelo se puede observar en la figura 1.

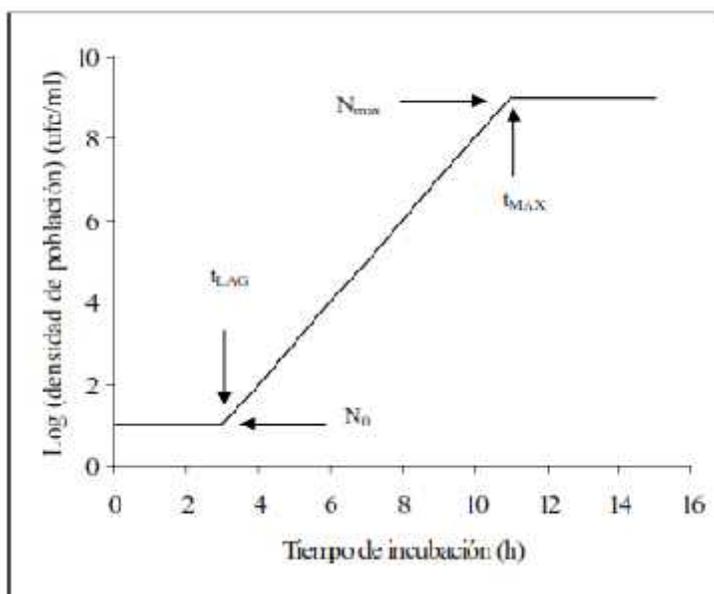


Figura 1. Representación gráfica del modelo lineal en tres fases y sus parámetros cinéticos.

3.3.3.2. Modelos secundarios

Los modelos secundarios relacionan los parámetros del modelo primario (tasa de crecimiento específico, tiempo de adaptación, densidad máxima de la población) y los factores ambientales (temperatura, pH, a_w , atmósfera gaseosa) para describir si el crecimiento microbiano se ve afectado y están correlacionados con algunas condiciones intrínsecas y extrínsecas a los que se someten los alimentos.

La mayoría de los modelos secundarios son de tipo cinético, el modelo de Arrhenius por ejemplo, es el más empleado cuando de temperatura se trata; aunque se conocen otros modelos entre los que se destacan, el modelo de Sharpe y Michele, el modelo de Davey, el modelo de Ratkowsky, el modelo gamma y el modelo de respuesta en superficie (Rodríguez, 2003).

Los factores ambientales que afectan al crecimiento pueden ser fijados en un alimento en particular. De entre todos ellos, la temperatura es considerada normalmente como el más importante, la cual afecta en gran medida a la velocidad de crecimiento (McMeekin *et al.*, 2013). Este efecto se observa en alimentos tales como el pescado, la carne, o leche, los cuales poseen valores de a_w y pH cercanos a la neutralidad.

- Ecuación de Arrhenius. La expresión matemática propuesta por Arrhenius fue derivada empíricamente basándose en consideraciones termodinámicas, para describir la velocidad con que una reacción cambia cuando se emplean diferentes temperaturas conocidas. El enunciado se encuentra planteado por la siguiente ecuación:

$$k = k_0 e^{\frac{-E_A}{RT}}$$

Donde, k representa la constante de velocidad de crecimiento (s^{-1}); k_0 constante de la ecuación de Arrhenius; E_A la energía de activación ($J mol^{-1}$); R constante universal de los gases ($8.314 J mol^{-1} K^{-1}$); T temperatura (K).

- Ecuación de Sharpe y Michele. La ecuación de Sharpe y Michele fue modificada por School field *et al.* en 1981, incluyendo seis parámetros tal y como se muestra a continuación.

$$k(T) = \frac{\rho(25^\circ C) \frac{T}{298} \exp\left\{\frac{\Delta H_A}{R} \left(\frac{1}{298} - \frac{1}{T}\right)\right\}}{1 + \exp\left[\frac{\Delta H_L}{R} \left(\frac{1}{T_L} - \frac{1}{T}\right)\right] + \exp\left[\frac{\Delta H_H}{R} \left(\frac{1}{T_H} - \frac{1}{T}\right)\right]}$$

Donde = k , velocidad de crecimiento a una temperatura T (s^{-1}); $\rho(25^\circ C)$, velocidad de crecimiento a $25^\circ C$ en ausencia de inactivación enzimática (s^{-1}); T , temperatura (K); H_A , entalpía de activación de la reacción catalizada por la enzima ($J mol^{-1}$), H_L ; cambio en la entalpía asociado a la inactivación enzimática a baja temperatura ($J mol^{-1}$), H_H , cambio en la entalpía asociado a la inactivación enzimática a alta temperatura ($J mol^{-1}$); $T_H/2L$, temperatura

a la cual la enzima está al 50% inactiva debido a la baja temperatura (K); $T_{1/2\mu}$, temperatura a la cual la enzima está 50% inactiva debido a la alta temperatura(K); R , constante universal de los gases ($8.314 \text{ J mol}^{-1}\text{k}^{-1}$).

- Ecuación de Ratkowsky. La ecuación de Ratkowsky *et al.* (1982), también conocida como modelo de raíz cuadrada; permite modelar la velocidad de crecimiento microbiano en función de la temperatura; representada de la siguiente manera:

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min})$$

Donde; k , velocidad de crecimiento (s^{-1}); T , temperatura (K); T_{\min} , temperatura mínima de crecimiento (K); b , coeficiente de regresión para temperaturas por debajo de la óptima (K^{-1}). Sin embargo, bajo fluctuaciones continuas de temperatura no existe consistencia en el crecimiento microbiano que predice.

3.3.3.3. Modelos terciarios

Los modelos terciarios, son aplicaciones de uno o más modelos primarios y secundarios que con ayuda de un software predictivo, permiten describir el efecto de las distintas condiciones ambientales, de procesamiento y almacenamiento de alimentos en el crecimiento microbiano. En la actualidad existe gran variedad de programas informáticos para modelización microbiana, algunos de los cuales estas disponibles en línea y varían en complejidad, desde una sencilla ecuación en una hoja de cálculo, a sistemas expertos o programas de simulación de estimación del riesgo.

Entre los más representativos se encuentran el [Pathogen Modeling Program](#) (PMP) desarrollado por la Agricultural Research Center and Eastern Regional Research Center (USA), Microfit propuesto por Food Standards Agency and Institute of Research (UK), Combase propuesto por UK, USDA, and Food Safety Centre – Tasmania University (Australia).

- Pathogen Modeling Program (PMP). El PMP es un software que tiene como propósito estimar la velocidad de crecimiento de microorganismos patógenos en los alimentos, utilizando múltiples variables en combinación con modelos primarios, uno de los modelos afines con este programa es el modelo modificado de Gompertz. Las variables del modelo incluyen atmosfera (aeróbica, anaeróbica), temperatura, pH, actividad del agua, y en algunos casos nitrito y otros aditivos. El software se encuentra disponible en: <http://pmp.errc.ars.usda.gov/pmponline.aspx>.
- ComBase. La base de datos Combase (Combined Data base of Microbial Response to Food Environments) fue desarrollado y administrado por un consorcio internacional formado por el USDA – Agricultural Research Service (USA) y el Food Safety Centre de la Universidad de Tasmania

(Australia). Es una herramienta que permite obtener información mediante la simulación de curvas microbianas de crecimiento sobre cómo responden los microorganismos a diferentes ambientes (cambios de temperatura, pH, actividad acuosa y otros factores). La información en ComBase es referida como datos "microbiológicos cuantitativos", ya que describe de qué forma los niveles de los microorganismos, tanto los alterantes como los patógenos, cambian en el transcurso del tiempo. Este software dispone de varias herramientas: ComBase Predictor, Perfringens Predictor, Salmonella in egg y DMFit. Se encuentra disponible en: <http://www.combase.cc/index.php/en/>.

- Otras herramientas de microbiología predictiva (Modelos terciarios):
 - Sea Food Spoilage Predictor: Es un paquete para predecir el desarrollo de diversas bacterias en alimentos de origen marino frescos o mínimamente procesados. Disponible en: <http://fssp.food.dtu.dk/>.
 - *E. coli* fermented meat model: Es modelo para predecir la inactivación de *Escherichia coli* en carnes fermentadas. Disponible en: <http://www.foodsafetycentre.com.au/fermenter.php>.
 - *E. coli* Safe Ferment: es un modelo de *Escherichia coli* en carnes fermentadas. Disponible en: <http://www.ifr.ac.uk/safety/ecolisafeferment>.
 - GlnAFit: es una aplicación que funciona como complemento de Excel (add-in) para ajustar curvas de inactivación a varios modelos. Disponible en: <http://cit.kuleuven.be/biotec/downloads.php>.
 - Microbial Responses Viewer (MRV): es una nueva base de datos consistente en datos de crecimiento/no-crecimiento microbiano procedente de ComBase. Disponible en: <http://mrviewer.info/>.
 - MicroHibro: Aplicación on-line de Evaluación del Riesgo Microbiano en vegetales desarrollada por la Universidad de Córdoba (España). Disponible en: <http://www.foodsafetycentre.com.au/fermenter.php>.
 - RiskRanger: software para análisis de riesgo en seguridad alimentaria. Disponible en: <http://www.foodsafetycentre.com.au/riskranger.php>.
 - Salmonella Predictions: modelos para predecir la concentración de *Salmonella* spp. Disponible en: <http://www.ifr.ac.uk/safety/SalmonellaPredictions/>.

3.3.4. Desarrollo de modelos predictivos

De acuerdo con Dalgaard (2004), una gran cantidad de datos experimentales son requeridos para predecir el efecto de factores controlables sobre el crecimiento, probabilidad de crecimiento, supervivencia o inactivación de microorganismos. Así mismo, la metodología general para el desarrollo de modelos predictivos requiere de cinco etapas: diseño y planteamiento previos que permitan identificar los factores claves que afectan el crecimiento microbiano en la matriz de estudio, generación o acumulación de datos, modelamiento primario, modelamiento secundario y validación *in-situ* y *ex-situ* de los modelos.

3.3.4.1. Diseño y planteamiento de los modelos.

El diseño y la planificación son la primera fase o etapa para el desarrollo de modelos predictivos, los cuales tienen como propósito determinar las variables (factores y respuestas) para el cumplimiento del objetivo, establecer el alcance del experimento (objetivo práctico), fijar las características del inóculo (estado fisiológico, tamaño, forma de inoculación) y del sustrato, así como el método a emplear para la toma de los datos experimentales, recuento de unidades formadoras de colonias viables entre otras.

3.3.4.2. Acumulación de Datos

Luego del diseño y la planificación de los modelos, se establece la segunda etapa: acumulación de datos experimentales. El objetivo de esta etapa es generar las curvas de crecimiento para cada combinación de factores controlables (Temperatura, atmósfera, pH, a_w , etc.), por lo que se deben recolectar a lo largo de la totalidad de la curva de crecimiento. Esta fase dependiendo de la combinación y efecto de los factores, puede emplear varios meses de trabajo para obtener las curvas, en especial si se estudian los niveles mínimos de crecimiento microbiano. Los métodos utilizados para la acumulación de datos son variados, el recuento en placa, por ejemplo; es un método directo que permite, además de evidenciar el crecimiento microbiano, la enumeración de células; es decir, señalar la magnitud de la población total microbiana, también se han planteado otros métodos sencillos y rápidos para la obtención de resultados, esos son: medidas de densidad óptica e impedancia, radiometría, determinación de ATP, flujo citométrico, etc., que a diferencia del recuento en placa permiten contar células no viables.

3.3.4.3. Ajuste de los datos

Esta fase conocida como modelamiento matemático primario o descripción matemática, permite crear curvas de crecimiento microbiano utilizando los recuentos obtenidos por cualquiera de las técnicas mencionadas anteriormente, ajustando estos datos con alguno de los modelos primarios, con el fin de explicar el incremento de la población celular en función del tiempo, y estimar los parámetros cinéticos: tiempo de latencia, máxima velocidad específica de crecimiento, mínima y máxima densidad de población, tiempo final de crecimiento, entre otros.

3.3.4.4. Modelamiento secundario

En esta fase, usando técnicas de regresión simple y múltiple, lineal o no lineal, se busca generar el modelo matemático más adecuado que relacione como el o los factores estudiados afectan la respuesta microbiana (crecimiento, supervivencia o inhibición).

3.3.4.5. Validación de los modelos

La quinta fase es quizá la más importante en el desarrollo y aplicación de modelos predictivos matemáticos. Mediante esta fase se establece una comparación entre los parámetros cinéticos (tasa de crecimiento, tiempo de generación, etc.) estimados por los modelos y los observados en los experimentos para un mismo microorganismo usando diversos índices de ajuste, los cuales serán descritos en el próximo apartado.

El proceso de validación se clasifica en validación interna y externa; en el primer caso la validación se realiza con los mismos datos que se usaron para desarrollar el modelo, y se compara la respuesta observada frente a la respuesta estimada por el modelo. Por ejemplo, si se evaluó el efecto de la temperatura de 2°C, 4°C, 6°C, 8°C y 10°C sobre la velocidad de crecimiento microbiano, las respuesta estimada de velocidad de crecimiento generada por el modelo para estas temperaturas se compara con la velocidad de crecimiento obtenida en las curvas de crecimiento a las mismas temperaturas, y que fueron usadas para construir el modelo. Por otro lado, la validación externa utiliza un conjunto de datos nuevos, es decir; parámetros cinéticos obtenidos en condiciones experimentales diferentes a las usadas para construir el modelo, o datos reportados por otras investigaciones. Siguiendo con el ejemplo del caso anterior, para validar externamente el modelo, por ejemplo se obtendrían experimentalmente curvas de crecimiento a temperaturas de 3°C, 5°C, 7°C y 9°C y la velocidad de crecimiento para estas temperaturas se compararían con las velocidades de crecimiento estimadas por el modelo para estas nuevas temperaturas. La validación externa de los modelos también implica comparar las respuestas observadas en matrices alimentarias reales frente a las respuestas obtenidas en matrices de laboratorio (por ejemplo, usando medios de cultivo líquido modificados).

3.3.5. Índices para la evaluación del desempeño (comparación estadística) de los modelos predictivos.

En general, los métodos usados en microbiología predictiva o microbiología clásica de alimentos para comparar la bondad de ajuste de los modelos a los datos utilizados para generarlos, o para determinar si un modelo ajustado es estadísticamente aceptable en relación con el error de medición inherente a los datos, han sido métodos estadísticos que se describen en los textos clásicos de estadística (Ross, 1996). Estos métodos incluyen índices de ajuste de curvas tales como los coeficientes de regresión y correlación, error estándar de estimación, media del error absoluto y el análisis gráfico de residuos (Gutiérrez y De la Vara, 2012). Así mismo, una diversidad de autores emplea la raíz del error cuadrado medio como índice de confiabilidad de los modelos (Zwietering *et al.*, 1990; Valík y Piecková, 2001; Dantigny *et al.*, 2007; Lahlali *et al.*, 2007; García *et al.*, 2011).

Sin embargo, antes de que los modelos puedan ser usados en la práctica, los modelos predictivos deben demostrar que estiman con precisión el comportamiento de los microorganismos en los alimentos durante el

procesamiento, almacenamiento y distribución. La demostración de esta capacidad, generalmente se le llama "validación", la cual sigue siendo un aspecto poco definido en la microbiología predictiva, ya que debe involucrar no solo la comparación de las respuestas predichas frente a las observaciones usadas para generar los modelos (índices de ajuste del modelo), sino que, deben además comparar las respuestas estimadas con las observadas en los productos alimentarios distintos de los utilizados para generar el modelo. En este sentido Roosen 1996, propuso unos índices adicionales que permiten medir no el ajuste del modelo a los datos, sino la precisión y seguridad con la que el modelo predice nuevas respuestas, dichos índices son denominados factor de sesgo (B_f) y factor de exactitud (A_f).

A continuación se describirán brevemente algunos de los índices usados en microbiología predictiva.

3.3.5.1. Coeficiente de determinación o regresión (R^2).

Este coeficiente es usado como un primer criterio para evaluar la calidad total del ajuste conseguido, el cual mide la proporción de la variabilidad en los datos (Y) que es explicada por el modelo de regresión, es decir, mide el porcentaje de la variabilidad de la respuesta que es explicada por el modelo sobre la variabilidad total de los resultados (Gutiérrez y De la Vara, 2012). El valor más cercano a 1 o 100% significa una mejor predicción del modelo.

$$R^2 = \frac{SC_R}{S_{YY}}$$

Donde, SC_R corresponde a la suma de cuadrados de la regresión y S_{YY} a la suma de cuadrados total.

3.3.5.2. Coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}).

Cuando un modelo involucra tres o más variables (factores y respuesta), es preferible recurrir al coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}) en lugar del R^2 , puesto que este último es engañoso al incrementarse en forma artificial con cada término que se agrega al modelo, aunque sea un término que no contribuya en nada a la explicación de la respuesta (Gutiérrez y De la Vara, 2012). El valor más cercano a 1 o 100% significa una mejor predicción del modelo.

$$R^2_{aj} = \frac{CM_T - CM_E}{CM_T}$$

Donde, CM_T corresponde al cuadrado medio total del análisis de varianza de la regresión y CM_E al cuadrado medio del error o residual.

3.3.5.3. Raíz del error cuadrático medio (RMSE).

Este parámetro estadístico mide la desviación media entre los valores observados y predichos. Cuanto menor sea el valor de este índice mejor es el ajuste del modelo a los datos experimentales (García *et al.*, 2011). Se expresa como la raíz cuadrada de la sumatoria de las diferencias cuadráticas de los valores predichos (μ_e) y los valores observados (μ_o) dividido entre los grados de libertad (df) que corresponden al número total de datos (n) menos el número de parámetros a ser estimados (p), tal y como se expresa en la siguiente ecuación:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(\mu_e - \mu_o)^2}{n - p}}$$

3.3.5.4. Factor de sesgo (Bias factor $-B_f$).

De acuerdo con Ross (1996), el factor de sesgo es un índice que evalúa la seguridad de los modelos matemáticos. El factor de sesgo responde a la pregunta de si, en promedio, los valores observados se encuentran por encima o por debajo de la línea de equivalencia y, en caso afirmativo, en qué medida (García *et al.*, 2011). Una relación perfecta entre las respuestas estimadas y las respuestas observadas dará lugar a un factor de sesgo de 1. Por otro lado, cuando B_f es menor a uno, los valores estimados por el modelo son menores a los valores observados, y en caso contrario, cuando B_f es mayor a uno, los valores estimados son mayores que los observados.

El modelo puede considerarse seguro dependiendo del valor de B_f que adopte. Por ejemplo, para modelos que predicen la velocidad de crecimiento es seguro cuando el sesgo ≥ 1 , ya que en este sentido la velocidad estimada por el modelo es igual o mayor que la real y por lo tanto el modelo proporciona un margen de seguridad. Cuando el valor de sesgo es < 1 , el modelo no es seguro para estimar la velocidad de crecimiento, pero si el modelo se ha desarrollado para estimar la fase de adaptación, un valor de sesgo < 1 proporciona un modelo seguro para la predicción de la fase de adaptación, puesto que la fase de adaptación observada es mayor que la predictiva. El factor de sesgo, se expresa matemáticamente como se observa a continuación:

$$B_f = 10^{\left(\frac{\sum \log \frac{\mu_e}{\mu_o}}{n}\right)}$$

Donde: μ_e es el valor de la tasa máxima específica de crecimiento predictiva (h^{-1}), μ_o es el valor de la tasa máxima específica de crecimiento observada (h^{-1}); n es el número de datos o valores usados para construir el modelo.

3.3.5.5. Factor de precisión (Accuracy factor $-A_f$).

El factor de precisión mide en promedio, la “distancia” mínimo entre cada punto y la línea de equivalencia, como una medida de qué tan cerca, en promedio, se encuentran los valores predichos y los valores observados. La A_f es, por lo tanto, una medida de la desviación media del modelo y puede ser usado como una

simple medida del nivel de confianza que uno puede tener en las predicciones del modelo. Cuanto más grande sea el valor, menos precisa es la estimación promedio (Ross, 1996; García *et al.*, 2011). El A_f se encuentra definido por la siguiente ecuación, expresada en valor absoluto.

$$A_f = 10^{\left(\frac{\sum \left| \log \left[\frac{U_e}{U_0} \right] \right|}{n}\right)}$$

Donde los parámetros de la ecuación son los mismos definidos para el B_f .

3.3.6. Vida útil de los alimentos

Es necesario definir el concepto de vida útil en los alimentos. Según la comisión del *Codex Alimentarius* (1998), la vida útil “es una medida de control que, en muchos casos, resulta decisiva para la inocuidad e idoneidad del producto”. De la misma manera Labuza (1994) y Man (2004), definen la vida útil como “el periodo de tiempo, después de elaborado y envasado el alimento y almacenado en las condiciones recomendadas, en que el producto sigue siendo seguro y apropiado para el consumo”, es decir, que durante ese tiempo debe conservar tanto sus características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales, así como sus características nutricionales y funcionales.

En palabras de Man (2004) “*todos los alimentos poseen una caducidad microbiológica, una caducidad química y/o físico-química y una caducidad sensorial; la cual depende de las condiciones de formulación, procesamiento, empaçado, almacenamiento y manipulación*”. Así mismo Xiong y Hernández (2002) afirman que la vida útil está íntimamente relacionada con la calidad del alimento y de esto son conscientes tanto los productores como los consumidores, por lo que la FDA (Food and drug administration) exige declarar la vida útil del producto indicando claramente la fecha de expiración en los empaques bajo condiciones de almacenamiento recomendadas.

Los alimentos son sustancias expuestas a cambios en sus propiedades sensoriales por la acción de microorganismos alterantes, de acuerdo a lo antes expuesto, los alimentos se clasifican en *perecederos* con vida útil muy corta, “*semiperecederos*” con una vida útil corta o media y los “*poco perecederos*” con una vida útil de media a muy larga. Con las nuevas tecnologías de empaque en atmósfera modificada/controlada (CAP/MAP) en condiciones asépticas, los alimentos perecederos pueden durar hasta 90 días (3 meses). Un alimento semi-perecedero tiene una vida útil media de alrededor de 6 meses, tales como algunos quesos, mientras que los alimentos poco perecederos tienen una vida útil superior a 6 meses y con una duración de hasta 3 años cuando son mantenidas bajo condiciones apropiadas de almacenamiento, p.ej., la mayoría de las conservas (Cabeza, 2013).

La carne y los productos derivados de esta matriz tienen una elevada actividad acuosa, que proporcionan un medio ideal para la propagación de microorganismos, por ello están clasificados en el grupo de los alimentos perecederos pues son las reacciones microbiológicas y enzimáticas los principales causantes de la pérdida de calidad de este tipo de productos.

3.3.6.1. Variables que afectan la vida útil de los derivados cárnicos.

Esencialmente, la vida útil de un alimento depende de cuatro factores principales a saber: la formulación, procesado, empaque y condiciones del almacenamiento. Sin embargo, si las condiciones posteriores de manipulación no son las correctas, entonces la vida útil de los mismos puede limitarse a un periodo menor que del cual haya sido establecido. Todos los cuatro factores son críticos pero su importancia relativa depende de cuán perecedero es el alimento. Generalmente, un alimento perecedero (almacenado en condiciones apropiadas) tiene una vida útil media de 14 días siendo limitado en la mayoría de los casos por el decaimiento bioquímico (enzimático/senescencia) o el decaimiento microbiano (Cabeza, 2013).

Numerosos factores extrínsecos e intrínsecos de los alimentos entre ellos la temperatura, la actividad acuosa, el pH, la concentración de oxígeno y los nutrientes están estrechamente relacionados con la estabilidad de un producto. Otras variables involucradas como por ejemplo; el tipo de materia prima, la formulación del producto, el proceso aplicado, las condiciones sanitarias del proceso, envasado, almacenamiento, distribución y las prácticas de los consumidores también afectan la calidad del producto ya que potencializan la interacción entre las reacciones fisicoquímicas, microbiológicas y enzimáticas. (Buelvas, 2013).

3.3.6.2. Métodos para la estimación de la vida útil

La estimación de la vida útil de un alimento es un requisito fundamental, y esta debe figurar, salvo ciertas excepciones, en la etiqueta de los mismos. Es variada la metodología empleada para estimar la vida útil, algunos de estos métodos pueden parecer un tanto ortodoxos pero de acuerdo con Labuza (1994) suelen ser válidos. Algunos de estos métodos serán expuestos de forma breve, mientras nos centraremos en los métodos de determinación de la vida útil a tiempo real y determinación rápida de la caducidad "Test de vida útil acelerado" (Accelerated Shelf Life Determination, ASLD) por ser los más empleados (Man, 2004; Labuza, 1994).

- Empleo de valores de referencia. La vida útil de un nuevo producto puede estimarse basándose en los datos publicados en diferentes bases de datos tales como las del ejército de los EE.UU. o por Labuza en: Shelf-lifedating of foods (1982), pero el problema en este caso es que estos datos son muy limitados, por lo que no tienen información adicional salvo para productos similares, además, la mayoría de estos datos tienen derecho de autor y no

pueden ser usados para la predicción de la vida útil, salvo dentro de la misma empresa para líneas similares sin necesidad de realizar pruebas experimentales.

- Estimación mediante asignación de “Turn Over” o retorno de la distribución. Una segunda aproximación para estimar la vida útil es el uso de tiempos de distribución conocidos para productos similares, mediante el análisis de la información de las etiquetas de los mismos. En este caso tampoco se requiere de comprobación previa si se está seguro de tomar este riesgo. Si se está empezando a desarrollar un nuevo producto, puede necesitarse en este caso datos para determinar el tiempo de almacenamiento en condiciones reales para conseguir una buena estimación de la vida útil. Si no existe ningún producto similar en el mercado, este método no puede usarse.
- Pruebas de abuso de distribuciones. Este método puede emplearse en el caso de estar seguros de la vida útil de un producto o si este ya se encuentra en el mercado. En este caso, el producto es recogido del punto de venta y se mantiene en el laboratorio simulando las condiciones caseras. Este método ha sido usado por varios investigadores, sobre todo en aquellos casos cuando algunos estados o países cambian la legislación, pero a pesar de esto, no ha sido ampliamente reportado encontrándose según Labuza (1994), un solo estudio en la literatura reportado por Gacula y Kubala, en 1975. Este método reproduce la vida útil basado en la distribución y condiciones de almacenamiento caseras.
- Empleo de quejas o reclamos de los compradores. Otro acercamiento para evaluar la vida útil que no requiere ningún estudio inicial es usar las quejas o reclamos de los consumidores como una base para determinar cuál es el problema que está ocurriendo. A partir de estos datos, la empresa puede obtener una idea sobre el problema que está ocurriendo y el modo en que se presenta, así como calcular los costos en ingredientes, proceso, empackado o si los cambios de la distribución serían económicamente factibles para mejorar la vida útil. Este acercamiento global puede usarse en conjunto con cualquiera de los tres métodos descritos anteriormente.
- Pruebas de vida útil a tiempo real. Este tipo de pruebas evalúa el efecto de las condiciones “normales” de conservación sobre las propiedades microbiológicas, físico-químicas y sensoriales de un alimento durante un periodo de tiempo. El factor relevante es la temperatura, entendiéndose como temperatura normal aquella que será empleada durante la conservación comercial del producto, p.ej., en la evaluación de la vida útil de un cárnico cocido se emplearía una temperatura de 4°C, la cual es la temperatura a la que se conservará el producto comercialmente. Para la determinación de la vida útil de un alimento deberán considerarse las

variables microbiológicas, físico-químicas y sensoriales que mayor influencia tendrán sobre la calidad del producto.

- Pruebas de aceleración de la vida útil (ASLT). Las pruebas de aceleración de la vida útil es quizá la metodología más empleada hoy día para calcular la vida útil de un alimento no perecedero o estable (alimentos esterilizados como por ejemplo los enlatados). En esta técnica, se pretende estudiar varias combinaciones de producto/empaque acabados bajo diferentes condiciones de abuso de temperatura, examinando el producto periódicamente hasta el fin de la vida útil; los resultados obtenidos se usan para proyectar la vida útil del producto bajo las verdaderas condiciones de almacenamiento. Algunas empresas manejan base de datos de multiplicación microbiana obtenidos del trabajo y la experiencia previa, los cuales emplean para obtener la vida útil real a partir de los resultados encontrados en estas condiciones de abuso de temperatura. Esta técnica se basa en la aplicación de la cinética de la velocidad de Arrhenius, el cual establece que la velocidad de las reacciones químicas se duplica aproximadamente por cada 10°C de aumento de la temperatura. Sin embargo, antes de establecer una sentencia final sobre la validez o exactitud de predicción para una aplicación particular, es necesario examinar una serie general de factores que influyen sobre la vida útil del producto, como lo son las propiedades estructurales / mecánicas de los alimentos, las propiedades extrínsecas tales como la temperatura, Humedad relativa, atmósfera gaseosa, etc., las características intrínsecas como el pH, a_w , disponibilidad de nutrientes, potencial redox (Eh), presencia de antimicrobianos, etc., las interacciones microbianas y factores relativos al proceso de elaboración, mantenimiento y manipulación final.
- Estimación de la vida útil microbiológica mediante el uso de herramientas predictivas. La microbiología predictiva de alimentos se constituye hoy por hoy en una herramienta valiosa para el sector agroindustrial, ya que permite obtener resultados en menor tiempo minimizando el uso de materiales de laboratorio, mano de obra, y reduciendo por tanto costos económicos. Sin embargo, la microbiología tradicional aún sirve de apoyo a la microbiología predictiva. El modelamiento predictivo que integra el comportamiento microbiano con otras variables del proceso ha empezado a ganar interés en la industria agroalimentaria para predecir la vida útil. Sin embargo, la determinación de la vida útil es un tema complejo como es difícil predecir los efectos de las variables de almacenamiento y las condiciones de abuso que un producto puede experimentar (Williams, 1992).

La gran variedad y número de microorganismos alterantes encontrados en los productos alimenticios significa que los modelos de predicción de alteración son menos fáciles de desarrollar que los modelos de microorganismos patógenos y su aplicación es mucho más limitada (Pin y Baranyi, 1998). Al igual que ocurre con el análisis de riesgos y el HACCP, la predicción de la vida útil debe considerar todas las etapas en la producción

de un alimento. Deben obtenerse datos exactos acerca de las materias primas utilizadas, la formulación de productos, montaje de productos, técnicas de procesamiento, condiciones de higiene, tipo de empaque empleado, almacenamiento y procesos de distribución y el manejo final del consumidor. Sólo cuando todas estas áreas están representadas puede hacerse posible una predicción fiable de la vida útil (McMeekin y Ross, 1996b; Dalgaard, 1995). El realizar un estudio de vida útil puede implicar una amplia utilización tanto de recursos tecnológicos como financieros. Sin embargo, el desarrollo de modelos de predicción podrían en un plazo prudencial reducir el uso de estos recursos y mejorar el tiempo de utilización (Neumeyer *et al.*, 1997a). Los estudios se han llevado a cabo sobre una gran variedad de alimentos para determinar la vida útil (por ejemplo en productos cárnicos: Devlieghere *et al.*, 1999; Kant-Muermans *et al.*, 1997; Neumeyer *et al.*, 1997a, 1997b; Vankerschaver *et al.*, 1996). Sin embargo, estos estudios no han utilizado un modelo capaz de incorporar todas las variables que puedan tener un impacto sobre el crecimiento microbiano. Los principales factores que influyen en la estabilidad microbiana en los alimentos son la temperatura, pH y actividad de agua. La temperatura en particular puede variar significativamente a través de la producción y distribución (Geeraerd *et al.*, 1998).

La mayoría de los estudios han utilizado modelos dependientes de la temperatura, tales como el modelo de la raíz cuadrada (Ratwkosky *et al.*, 1983) o el modelo de Arrhenius, y si bien es cierto que con la mayoría de los alimentos la temperatura es el principal factor que afecta la vida útil, no es la única variable (Einarsson, 1994; Gill y Jones, 1992a; Gill *et al.*, 1988; Einarsson y Ericksson, 1986). La mayoría de los modelos dinámicos propuestos (Baranyi *et al.*, 1993a, 1996b; Van Impe *et al.*, 1995, 1992) es necesario el empleo de más de una variable fluctuante para predecir con precisión la vida útil de los productos alimenticios. Los métodos prácticos utilizados en la elaboración de modelos predictivos de vida útil necesitan avanzar más (McDonald y Sun, 1999).

Ninguno de los métodos descritos anteriormente está exento de problemas. Debe tenerse cautela en la interpretación de los resultados obtenidos y su extrapolación a otras condiciones. Por ejemplo cuando se prueba una relación producto/empaque, este empaque también tiene influencia sobre la vida útil y por tanto si se modifica el empaque con permeabilidades diferentes al oxígeno, agua, anhídrido carbónico durante el almacenamiento verdadero (almacenamiento comercial), la vida útil del producto se tornara desconocida; y los resultados anteriores no pueden ser aplicables.

3.3.7. Alteración de los productos cárnicos cocidos

En torno a la evaluación microbiológica se ha planteado toda una discusión sobre qué grupo de microorganismos deberían considerarse para la determinación de la vida útil, por un lado encontramos el empleo de los recuentos viables totales

(aerobios o anaerobios mesófilos, psicrótrofos o psicrófilos) ya que este grupo se considera en microbiología de alimentos como un indicador del nivel de contaminación de un producto, sin embargo surge el planteamiento de la diversidad de especies que podrían en un momento puntual integrar este grupo y de cómo podrían cambiar de lote a lote, de un periodo de tiempo a otro, o dentro de un mismo proceso. Entonces, ¿es seguro emplear este grupo como indicador de vida útil? Si se emplea este recuento, se puede establecer que el valor máximo permitido oscilaría en torno a 10^6 ufc/g o ml, es decir, que la vida útil microbiológica caducaría en cuanto se alcance este nivel de crecimiento en el producto final.

Desde la perspectiva particular de Cabeza (2013), resulta más conveniente establecer la vida útil microbiológica de un alimento cuantificando el crecimiento de microorganismos alterantes, y dentro de este grupo determinar cuál de las especies es la que mayor incidencia va a tener sobre la calidad final del producto. Por ejemplo, en el caso de los productos cárnicos cocidos empacados al vacío, la vida útil podría evaluarse empleando el recuento de bacterias acidolácticas (BAL) (Mateo *et al.*, 2006).

Según el *Codex Alimentarius*, se define como alimento alterado, aquel, que durante su elaboración, manipulación, transporte, almacenamiento, sufre modificación no provocada en las características organolépticas, valor nutricional, disminuyendo o anulando el grado de aceptación del producto por parte del consumidor, aunque este permanezca inocuo.

La mayoría de los alimentos están constituidos por sustancias complejas procedentes de animales y vegetales denominadas habitualmente “nutrientes”, entendiéndose como tales a las sustancias útiles para el metabolismo orgánico, que corresponden a los grupos denominados genéricamente como proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas, minerales, agua y compuestos derivados de los anteriores (Alais y Linden, 1990). Durante la manipulación, procesado y conservación de los alimentos se producen modificaciones en estas sustancias, que en algunos casos producen alteración en la calidad (Casp y Abril, 1999; Saghir *et al.*, 2005), entendida como una disminución parcial o total de la aceptabilidad de un alimento para su consumo. En este sentido, las alteraciones de los productos cárnicos se pueden dar por acción de agentes físicos, químicos o microbiológicos que conducen a pérdidas económicas elevadas (Huisin't Veld, 1996).

La mayoría de los mecanismos conducentes al deterioro de los productos cárnicos cocidos son de tipo químico, principalmente por oxidación no enzimática y/o microbiana (Sebranek *et al.*, 2005). Desde el punto de vista microbiológico, el deterioro en productos cárnicos cocidos almacenados en refrigeración es causado principalmente por el desarrollo de microorganismos alterantes psicrófilos y psicrótrofos que producen cambios bioquímicos que terminan siendo evidentes organolépticamente; como variaciones de color sabor, textura entre otros. Las actividades metabólicas llevadas a cabo por los microorganismos traen como consecuencias la degradación de y/o transformación de los componentes del

alimento. Estos microorganismos utilizan los compuestos de bajo peso molecular del alimento que puedan metabolizar como la glucosa, nitrógeno no proteico, ácidos orgánicos, etc. Dichas reacciones y rutas metabólicas dependen del género o especie implicada.

Las alteraciones bioquímicas que se dan en los alimentos son causadas por consorcios de microorganismos. (Huis in'tVeld, 1996), la carne fresca, cocida y los productos cárnicos se ven comúnmente afectados por BAL con la generación de metabolitos degradadores, los altos recuentos los metabolitos generados por BAL, no están asociados directamente a defectos de calidad ya que estos sirven como bio-protectores a los productos cárnicos frente al daño que puedan sufrir con la presencia de otras cepas. (Huis in'tVeld, 1996).

Finalmente, las alteraciones de tipo microbiano dependen de una serie de condiciones relativas a la materia prima, los factores de producción, tipo de empaque y condiciones de envasado, almacenamiento, etc. Los principales responsables de alteraciones sensoriales y cambios en la apariencia física de los productos cárnicos cocidos y precocidos envasados al vacío, se le atribuye a las bacterias acidolácticas. Dicha alteración se puede manifestar por agriado, presencia de limo o viscosidad en la superficie y acumulación de gas. Estos microorganismos a pesar de haber sido utilizados como cultivos iniciadores para inducir procesos de fermentación en algunos alimentos, pueden ocasionar deterioro en otros casos. Algunas especies como *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus curvatus* son considerados como los principales microorganismos responsables de los procesos de alteración de productos cárnicos cocidos envasados en atmósfera anaeróbica (Laguado *et al.*, 2016; Cabeza *et al.*, 2006; Mateo *et al.*, 2006). Este aspecto se considera en el siguiente apartado.

3.3.8. Microbiología de los productos cárnicos cocidos y sus alteraciones.

Los productos cárnicos cocidos son considerados un buen sustrato para diversos grupos microbianos alterantes debido a sus características entre las que se encuentran a_w alto (0.97 -0.99), pH cercano a la neutralidad (generalmente mayor a 6) y alto contenido de nutrientes asimilables. En productos cárnicos cocidos envasados al vacío que contienen sustancias antimicrobianas como los nitritos, componentes de las especias, ácidos orgánicos o compuestos derivados del humo es muy común encontrar alterantes como las BAL, Enterobacterias, Clostridios y *Brochothrix thermosphacta*, la glucosa es la primera fuente de carbono en utilizarse por la mayoría de bacterias alterantes, de igual manera se metabolizan otros sustratos como lactato, piruvato, acetato, etanol, aminoácidos libres y otras moléculas de nitrógeno no proteico dando lugar a reacciones hidrolíticas de proteínas, lípidos y carbohidratos y formando pequeñas moléculas de aminoácidos, ácidos grasos glicerol, oligosacáridos y azúcares.

Las principales alteraciones en estos productos suelen ser la producción de dióxido de carbono, un exceso de acidificación debido a la producción de ácido láctico, la producción de exopolisacáridos que originan mucosidad, formación de

limosidad superficial viscosidad o filamentosidad o la síntesis de sustancias indeseables, como las aminos biógenas, exudados lechosos, desarrollo de colonias visibles y producción de gas, decoloración de los pigmentos cárnicos o enverdecimiento y presencia de olores y sabores atípicos. Las BAL y su metabolismo está asociado a la contaminación inicial del producto el cual a su vez depende de la microbiota específica de cada industria cárnica y de la higiene en la manipulación, condiciones del alimento como sustrato, disponibilidad de sustratos (Borch *et al.*, 1996; Ellis y Goodacre, 2001). Esta microbiota inicial requiere de condiciones favorables de crecimiento adecuados y la disponibilidad de sustrato estableciéndose en los microclimas para prosperar y finalmente llegara a producir el deterioro, no obstante, esta flora puede proceder de una gran cantidad de entornos dentro de las actividades de procesamiento, transporte y distribución, estas pueden llegar a la carne y a sus productos siendo residentes contaminantes de utensilios, superficies de la planta de elaboración (Gram *et al.*, 2002).

El procesamiento puede también involucrar el uso de ingredientes no cárnicos que pueden servir como nutrientes o inhibidores para el crecimiento microorganismos (Sofos, 1994). El curado en embutidos permite la supervivencia del microorganismo halotolerante como; *Streptococcus faecium* y bacterias ácido lácticas quienes causan la putrefacción ácida. Las latas de carne o productos elaborados sometidos al tratamiento de esterilización comercial, pueden deteriorarse debido a procesamiento insuficiente o a fallas en la integridad de la lata e ingreso de microorganismos dentro de la ella (Sofos, 1994).

En términos generales, la población microbiana necesaria para que se pueda generar alteración en los productos cárnicos cocidos debe estar entre los intervalos de 10^6 y 10^8 ufc/g o cm^2 ; cuando se produce alteración y la población está por debajo de este recuento, se puede presumir que el origen de la misma no es de origen bacteriano. Es importante resaltar que un producto en estado avanzado de alteración muy rara vez superará un recuento de 10^{10} ufc/g o cm^2 (Gram *et al.*, 2002). Esta biota final dependerá del tipo de procesamiento; composición e ingredientes no cárnicos, temperatura de procesamiento, ahumado, tajado, empaque y, por último, condiciones de almacenamiento. (Sofos, 1994).

En la conservación de productos cárnicos, el envasado al vacío, favorece el crecimiento de bacterias ácido lácticas heterofermentativas y levaduras anaerobias facultativas; las levaduras producen limo superficial y los lactobacilos dan origen a bolsas gaseosas por formación de CO_2 . Es muy usual encontrar coloraciones verdosas, consecuencia de tratamientos térmicos inadecuados o de recontaminaciones después del procesado; el microorganismo responsable del enverdecimiento es *Lactobacillus viridescens*, que crece bien a pH y tensión de oxígeno ligeramente reducidos (Sofos, 1994). Microorganismos resistentes a estos tratamientos térmicos son los responsables del denominado “blown pack” visualmente conocidos, los microorganismos presentes allí, son capaces de replicarse a grandes velocidades en condiciones de refrigeración presentando el abombamiento o distensión del empaque acompañado de sinéresis bacteriana. En estudios realizados en jamones cocidos se han encontrado durante toda la cadena

de elaboración; *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp, *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp., Enterobacterias, levaduras, *Bacillus* spp., *Brochothrix thermosphacta*, BAL diferentes a *Lactobacillus* spp., *Streptomyces* spp. (Mateo *et al.*, 2006).

3.3.8.1. Bacterias ácido lácticas

El término *Bacterium acidilactici* fue propuesto por Weimann con el fin de definir las bacterias que a partir del azúcar de la leche formaban leche ácida (Jay, 2000), el uso de cultivos lácticos se remonta al siglo XVIII, cuando de manera accidental los agricultores de Asia, África y Europa observando el cambio de la leche en meses donde las temperaturas eran elevadas, esta se tornaba espesa y su sabor era diferente, agradable en algunas ocasiones (Guilliland, 1990). En 1857, Louis Pasteur mientras realizaba estudio en vinos encontró que la acidificación y el deterioro estaba dado por la presencia de ácido láctico, producida por estos microorganismos (Jay, 2000).

Este grupo comprende un sin número de microorganismos de los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*; los cuales comparten características metabólicas y fisiológicas similares; pertenecen al conjunto de bacterias gram positivas, catalasa negativas, no esporuladas, normalmente inmóviles, microaerófilos y en forma de cocos, coco-bacilos o bacilos, y pertenecen a la rama clostridial (Von Wright y Axelsson, 2012). Dichos géneros están clasificados en dos subgrupos las homofermentativas (ruta de Embden – Meyerhof), las cuales producen como principal metabolito el ácido láctico, y las heterofermentativas (ruta oxidativa de pentosas fosfato), las cuales producen ácido láctico, dióxido de carbono y etanol (Cabeza, 2006). Este último subgrupo puede dividirse en dos: las heterofermentativas obligadas (degradan las hexosas a ácido láctico y productos adicionales tales como ácido acético, etanol, CO₂ y pentosas a ácido láctico y ácido acético) y heterofermentativas facultativas (fermentan las hexosas en ácido láctico y puede producir CO₂ de gluconato pero no de glucosa). También fermentan pentosas para producir ácido láctico y ácido acético. (Axelsson, 1998). Las BAL se encuentran ampliamente en suelo, piel de animales y epitelios, son sólo una pequeña parte de la microbiota inicial de la carne fresca, (Chaillou *et al.*, 2014). Pueden crecer a temperaturas desde 5°C – 45°C y suelen ser la biota predominante en productos cárnicos cocidos envasados al vacío y en atmósferas modificadas, mientras que bajo condiciones aerobias son normalmente desplazadas por las *Pseudomonas* spp. (Borch *et al.*, 1996).

De manera general las BAL, excepto los enterococos, no son muy resistentes al calor y desinfección, su supervivencia permite cuestionar las prácticas de limpieza y desinfección de la planta de procesamiento, ya que tienen la capacidad de adherirse en las superficies y formar biopelículas. Se adaptan a instalaciones de procesamiento prosperan a temperaturas bajas y posteriormente alteran grandes lotes de producción (Björkroth, 2005; Björkroth y Korkeala, 1997). Incluso se han

encontrado en instalaciones automatizadas donde las condiciones les favorecen presentándose poblaciones muy altas de especies de BAL psicotolerantes (Welch y Mitchell, 2000). Las BAL son un grupo con una enorme capacidad de degradar carbohidratos y compuestos similares generalmente, el producto final de su metabolismo es el ácido láctico, sin embargo las BAL se adaptan a condiciones diversas de crecimiento cambiando su metabolismo, lo cual conlleva a que produzcan diferentes productos finales: lactato, acetato, etanol, formiato, succinato, diacetilo, acetoina y peróxido de hidrógeno (Axelsson, 1998).

Las BAL, pueden expresar cierta actividad lipolítica y proteolítica contribuyendo directamente a la formación de compuestos aromáticos y por tanto al desarrollo del aroma y flavor característicos, aunque suelen presentar más peptidasas que proteasas (Nychas y Arkaudelos, 1990). Son frecuentemente utilizadas en la producción comercial de alimentos como: bebidas alcohólicas, levaduras para cerveza, ensilados, vinos, fermentaciones en vegetales y cárnicos, salchichas, yogurt, cereales y pan (Arribas y Polo, 2008). Adicionalmente forman parte natural de la microbiota de muchos alimentos y no existen reportes que presenten riesgo a la salud del consumidor (Hugas y Monford 1997).

La alteración por BAL es sensorialmente menos apreciable que la producida por *Pseudomonas* spp. (Patsias *et al.*, 2006) y se detecta una vez transcurrido cierto tiempo desde que se alcanzan los recuentos máximos (ICMSF, 2001). En el interior de los productos cárnicos o en la superficie de los envasados al vacío o en atmósferas modificadas, la alteración cursa con acidificación, aromas de diverso tipo, enverdecimiento, formación de gas (CO), limosidad superficial y exudados lechosos (Borch *et al.*, 1996; Samelis *et al.*, 2000; Vermeiren *et al.*, 2005). La producción de ácido láctico, acético, fórmico, diacetilo y acetoina, así como la posible formación de H₂S por la flora láctica dominante presente en los productos cárnicos cocidos envasados al vacío o en atmósferas modificadas es la responsable de los aromas atípicos, que han sido descritos como aroma a ácido, mantequilla, fermentación o a queso (Borch *et al.*, 1996), causadas por géneros de *Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., y *Weissella* spp., (Björkroth *et al.*, 1998). En caso de que puedan llegar a alterar la superficie de los productos cárnicos cocidos almacenados en condiciones aerobias, se ha podido observar una textura pegajosa, olor avinagrado y/o enverdecimiento (Samelis *et al.*, 2000).

Especies de lactobacilos y *Leuconostoc* productoras de gas principalmente CO₂ generan hinchazón de paquete, decoloración, enverdecimiento, formación de limo, especialmente en productos cárnicos cocidos. De manera muy similar, sub especies de *L. gelidumy* *L. aenigmaticum* son productoras de dextrano (limo), abultamiento o hinchazón de paquetes debido a la formación de CO₂, ácidos o malos olores y coloraciones verdes en carne crudas, procesadas y productos, ocasionando presencia de color amarillo y decoloraciones (Rahkila *et al.*, 2012). Con frecuencia diversas especies de lactobacilos como *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. algidus*, *L. fuchuensis*, y *L. oligofermentans*, están asociadas a acidificación muy fuerte, emisión de compuestos de mal olor y baba viscosa en el caso de la carne

de aves de corral marinada, carne de cerdo almacenada y empacada al vacío y condiciones de atmosferas modificadas. En los productos cárnicos cocidos encontramos a *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *Pediococcus acidilactici* y *P. pentasaceus* (Geisen *et al.*, 1992). El género *Lactococcus*, (*L. piscium*, *L. raffinolactis*) está asociado muy frecuentemente con procesos de fermentación de leche, causa alteraciones en carne de vacuno y sus productos empacados en condiciones de atmosferas modificadas y empacados al vacío (Rahkila *et al.*, 2012; Sakala *et al.*, 2002).

3.3.8.2. Microorganismos Psicrotrofos

Los microorganismos pertenecientes a este grupo en su mayoría son bacterias psicotrópicas, capaces de crecer lentamente entre los 0 y 4°C; sin embargo su crecimiento se acelera cuando se presenta un incremento de temperatura en algún punto de la cadena de frío.

Dichos microorganismos producen sabores, olores y apariencia desagradable en los productos cárnicos procesados debido a modificaciones de los lípidos superficiales.

El almacenamiento de los derivados cárnicos a bajas temperaturas en las cámaras frigoríficas selecciona a los organismos psicrotrofos, pues no crecen los mesófilos.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. MATERIAL

- Agar Plate Count (PCA, Merck)
- Agar Man Rogosa Sharpe (MRS, Merck)
- Agua de peptona tamponada (APT, Merck)
- Anaerotest.(Merck)
- Anaerogen (Oxoid, Thermo scientific)
- Alcohol industrial
- Balanza analítica *Mettler Toledo*, mezclador vortex.
- Bolsa de polipropileno para envasado de alimentos.
- Baño serológico (55°C)
- Incubadoras 6°C y 30°C.
- Jarras de anaerobiosis
- Kit nitrate test (Merck)
- Material de vidrio diverso, cajas de Petri desechables, mechero Bunsen, pinzas y tijeras estériles.
- pH metro *Mettler Toledo*.
- Pipeta electrónica
- Stomacher
- Termómetro

4.2. METODOS

Cuatro productos cárnicos cocidos de la Cooperativa Colanta de la planta Derivados Cárnicos, marca Montefrío (San Pedro, Antioquía) han sido seleccionados para la realización del presente trabajo. Estos productos fueron: Salchicha XL, jamón, tocineta y morcilla; elegidos por que al momento de su elaboración el procesamiento difiere uno del otro, abarcando así todos los procesos que hasta el momento se realizan en la planta.

Todas las muestra correspondientes a un mismo lote; fueron distribuidas en cavas con registros de temperatura diferente en un periodo de tiempo máximo de 36 días, tal y como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Ubicación de los productos terminados en las diferentes cavas de almacenamiento ajustadas a temperaturas entre 4°C y 14°C.

UBICACIÓN	TEMPERATURA TEORICA
CAVA PRODUCTO TERMINADO	4°C
CAVA DE BARRAS	5°C
NEVERA LAB	6°C
CAVA TRANSITO 2	8°C

CAVA TRANSITO 1	10°C
CAVA EMPAQUE	14°C

El crecimiento microbiano se evaluó en función de la temperatura, las cuales fueron: 4°C (refrigeración adecuada), 6°C, 8°C y 10°C (abuso moderado de temperatura) y 14°C (grave abuso de temperatura).

Los productos fueron proporcionados por la Cooperativa Colanta para determinar mediante Microbiología predictiva de los alimentos, la vida útil, de estos alimentos.

4.2.1. Evaluación microbiológica de productos cárnicos procesados envasados al vacío.

Gran variedad de microorganismos pueden estar implicados en la calidad de los derivados cárnicos, sin embargo la alteración de los mismos se le atribuye a las Bacterias ácido lácticas.

Cabe resaltar que ninguna normatividad Colombiana especifica que estos microorganismos sean alterantes de vida útil, sin embargo estudios e investigaciones han demostrado mediante ensayos que las BAL pueden transformar las características físicas y sensoriales de estos productos, por su capacidad para crecer en condiciones anoxigenicas, acortando el periodo de vida útil de los productos cárnicos cocidos.

En este estudio también se quiso evaluar el crecimiento de microorganismos psicrotrofos por su capacidad para desarrollarse en ambientes similares a los que son sometidos los derivados cárnicos durante la distribución y posterior comercialización.

4.2.2. Preparación de la muestra y diluciones iniciales.

El recuento de microorganismos alterantes para cada uno de los productos cárnicos procesados objeto de estudio (Tocineta, morcilla, jamón y salchicha) incluyó el control de bacterias ácido lácticas y microorganismos psicrotrofos. Para ello, se tomó una muestra de cada producto almacenado a cada una de las temperaturas de prueba y se procedió a hacer el análisis. Inicialmente, se añadió 90 ml de agua peptona al 0.1% a 10 g de muestra que fue triturada y homogeneizada en Stomacher durante 30 segundos. Se hicieron diluciones decimales seriadas de cada muestra y posteriormente se sembró un volumen determinado en cada tipo de medio de cultivo en función del microorganismo a estudiar.

4.2.3. Recuento de bacterias ácido lácticas (BAL)

La enumeración de las BAL se llevó a cabo siguiendo el método descrito en la Norma Técnica Colombiana NTC 5034 (ICONTEC, 2002). A partir de diluciones decimales del alimento, se sembró en profundidad 1 ml de cada dilución, adicionando una capa de agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe). Una vez solidificadas las placas, se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas en una atmósfera anaeróbica con 10% de CO_2 . Después del periodo de tiempo especificado, se contaron las colonias generalmente pequeñas, blanco-grisáceas y lisas.

4.2.4. Recuento de microorganismos aerobios psicrófilos (MAP)

El análisis de biota aerobia psicrófila se llevó a cabo siguiendo el método descrito en la norma ISO 17410 (ISO, 2001). Se tomó 1 ml de cada una de las diluciones del alimento y se sembró por duplicado en profundidad, adicionando una capa de agar PCA (Plate Count Agar). Una vez solidificadas las placas, se incubaron de forma invertida a $6,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 10 días. Después de cumplido el tiempo de incubación se procedió a hacer el conteo de colonias blancas y lisas.

4.2.5. Análisis estadístico

Los datos fueron obtenidos a partir de experimentos independientes con repetición, y las medias fueron obtenidas por los triplicados. Los datos observados fueron ajustados usando el software ComBase on-line y posteriormente fueron sujetos a análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0,05 usando el paquete estadístico StatGraphics Centurión XV (StatPoint, Inc. 1982-2007, versión 15.2.05, U.S.A.) por comparación de los parámetros obtenidos a partir de cada tratamiento para todos los experimentos realizados. Los modelos matemáticos fueron generados mediante análisis de regresión simple, previa transformación de variables para estabilizar la variación, y posteriormente fueron sometidos a análisis de varianza para evaluar el nivel de significancia y ajuste del modelo a un p-valor $< 0,05$.

4.2.6. Otras actividades desarrolladas durante la práctica

4.2.6.1 Alérgenos

Un alérgeno es una sustancia generalmente de naturaleza proteica, que en determinados individuos son capaces de ocasionar una respuesta anómala, dando lugar a una serie de síntomas adversos.

La alergia a los alimentos está ahora reconocida como un tema importante de seguridad alimentaria.

La contaminación de un producto libre de alérgeno por un producto que contenga alérgeno es un riesgo al que se enfrentan muchos fabricantes.

La comprobación de superficies, equipos y muestras de agua de enjuagado para asegurar la limpieza ha supuesto una ayuda eficaz en el control de riesgos de contaminación cruzada y es una herramienta importante que muchas empresas han incorporado en sus planes de gestión de alérgenos.

Esta prueba tiene como propósito describir los pasos secuenciales para la detección de alérgenos en los equipos de producción de la planta Derivados Cárnicos a través de un kit rápido que permita monitorear que los procesos de limpieza ejecutados conllevan a la eliminación de estos.

El kit Clean trace 3M TM proteínas de superficie (alérgeno), se basa en una reacción Biuret que consiste en que, en condiciones alcalinas los iones de cobre(Cu^{2+}) formen un complejo con uniones peptídicas de proteínas y se reduzcan a Cu^+ . Esta prueba ofrece una estimación de las proteínas mediante un cambio de coloración.

4.2.6.2 Análisis Microbiológico de ambiente

Este análisis, permite monitorear la calidad del aire en todas las áreas del proceso, para determinar los riesgos de contaminación del producto. Aplica para las áreas que representan riesgo de contaminación para los productos o para aquellas que tengan aire controlado sea por filtración o por diferencial de presión y que requieran ser monitoreadas microbiológicamente.

El Monitoreo de la calidad del ambiente, se realiza a través de dos medios de cultivo expuestos (sedimentación) o por succión de metros cúbicos de aire mediante un muestreador de aire, uno exento de sustancias inhibitoras e indicadoras que permite el desarrollo de bacterias viables presentes en el ambiente (Agar PCA y/o petrifilm mesófilos) y otro medio selectivo para la numeración y detección de mohos y levaduras (Agar YGC) para determinar los riesgos de contaminación cruzada del producto.

4.2.6.3 Análisis microbiológico de Manipuladores, superficies y equipos

El propósito de esta prueba es; detectar el indicador de calidad *E.coli* en las manos de manipuladores de alimentos, superficies y equipos como indicador sanitario de contaminación fecal, mediante un agar selectivo, el cual hace posible la identificación simultánea de coliformes totales y *E. coli*.

La combinación de dos sustratos cromógenos; el Salmon-GAL el cual es escindido por la enzima B-D galactosidasa, característico de coliformes, provoca una coloración roja y el sustrato X- glucoronido escindido por la enzima B-D glucoronidasa para la identificación de *E. coli* provocando una coloración azul-violeta de las colonias.

4.2.6.4 Análisis Microbiológico de Aguas

Este análisis permite evaluar la calidad microbiológica del agua potable e industrial, mediante la identificación de coliformes totales, *E.coli* y mesófilos, como indicadores del grado de contaminación de la misma, utilizando para determinar coliformes totales y *E.coli* el reactivo de sustrato definido (Colilert), y para la identificación de mesófilos, siembra en profundidad en Agar PCA.

4.2.6.5 Controles positivos y negativos en agar y en petrifilm

Garantizar la preparación, conservación y uso de los medios de cultivo sólidos y placas con medio de cultivo deshidratado, evaluando la selectividad, productividad y promoción de crecimiento como punto de partida para tener resultados microbiológicos confiables, son los principales objetivos de este análisis.

El análisis microbiológico de indicadores de calidad, se realiza por inoculación de cepas de referencia en agar y en medio deshidratado (petrifilm).

4.2.6.6 Análisis microbiológico a producto terminado

La finalidad de esta prueba es determinar e Identificar microorganismos en producto terminado, bajo los parámetros establecidos por normas nacionales (NTC 1325 expedida por ICONTEC).

El Análisis microbiológico a producto terminado, se evalúa, mediante la identificación de coliformes totales y *E. coli*.

4.2.6.7 Toma de muestras ambientales

Monitorear la presencia de *Listeria spp* en todas aquellas superficies, instalaciones, equipos, utensilios que se encuentren en contacto directo o indirecto con el alimento, en zonas adyacentes o aledañas al proceso, y que puedan convertirse en fuentes de contaminación por este microorganismo patógeno.

La determinación de *Listeria spp*, por técnica Vidas es un análisis inmunoenzimático o tecnología de proteína recombinante, que permite la detección de antígenos propios de este microorganismo gracia al método ELFA (Ensayo de Inmunofluorescencia ligada a Enzima). La recuperación de *Listeria spp* en muestras ambientales está determinada por tres factores: la humectación del isopo, el tamaño de la plantilla y la transferencia al medio de pre-enriquecimiento LPT.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES PARA EL DESARROLLO DE LA PASANIA																				
TIEMPO ACTIVIDADES	MESES																			
	FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO			
SEMANAS	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Contratación e inducción a la planta derivados Cárnicos Colarta.			X																	
Lectura de instructivos correspondientes a los muestreos microbiológicos llevados a cabo en el laboratorio control calidad de derivados cárnicos			X	X																
Inducción al laboratorio Microbiología				X	X															
MUESTREO MICROBIOLÓGICO																				
Ambiente					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Manipuladores					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Superficie y equipos					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
Aguas					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Alérgenos					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Materia Prima					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Producto terminado																				
Ambientales																				
Controles positivos y negativos																				

ACTIVIDADES PARA EL DESARROLLO – PROYECTO DE GRADO																				
TIEMPO ACTIVIDADES	MESES																			
	ABRIL								MAYO								JUNIO			
SEMANAS	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2						
Diseño de la metodología	X	X																		
Recepción de las muestras	X	X																		
Diseño Experimental			DIA 18	DIA 22	DIA 25	DIA 27	DIA 31	DIA 4	DIA 8	DIA 11	DIA 15	DIA 18	DIA 21	DIA 25						
Recuento de Bacterias Ácido Lácticas			DIA 23	DIA 26	DIA 28	DIA 30	DIA 3	DIA 7	DIA 9	DIA 12	DIA 14	DIA 17	DIA 20	DIA 23	DIA 24					
Recuento de Microorganismos Psicrófilos					DIA 28	DIA 30	DIA 3	DIA 5	DIA 10	DIA 12	DIA 15	DIA 18	DIA 21	DIA 23	DIA 24	DIA 26	DIA 28	DIA 31	DIA 01	
Planteamiento Teórico del Proyecto				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. RECUESTO DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS EN TOCINETA, MORCILLA, SALCHICHA Y JAMÓN.

Como se aprecia en las figuras 2, 4 y 6, el crecimiento de BAL en tocineta, morcilla y salchicha a las diferentes temperaturas fue irregular ya que, por una parte los recuentos iniciales corresponden a la contaminación proveniente de la materia prima y en este sentido, la distribución de la población no es homogénea en las superficies del producto. En ese sentido Fleet (1999) reporta que con pocas excepciones, la mayoría de los alimentos presentan un medio ambiente que es heterogéneo en la estructura física y la composición química, lo que en consecuencia, afecta la distribución homogénea de los microorganismos causando un crecimiento microbiano heterogéneo a lo largo del ecosistema alimentario. Es decir, diferentes ubicaciones dentro del mismo producto alimenticio tienen significativamente diferentes microbiotas.

Por otro lado, las BAL incluyen un grupo heterogéneo de bacterias, las cuales pueden llegar a variar de producto en producto, y aún dentro del mismo producto (lote) (Dos Santos, 2007), por lo que no podría esperarse un crecimiento uniforme en función de las temperaturas evaluadas, ya que algunos de los miembros de este grupo pueden presentar una mayor o menor tolerancia a la temperatura.

En la figura 2 se muestran las curvas de crecimiento de bacterias acidolácticas en tocineta a las temperaturas evaluadas, mientras que en la figura 3 se presentan las curvas de crecimiento de BAL ajustadas con el modelo de Baranyi y Roberts para el mismo producto, un modelo cinético que permite modelar los efectos de variables intrínsecas y extrínsecas particularmente la temperatura, en el crecimiento microbiano.

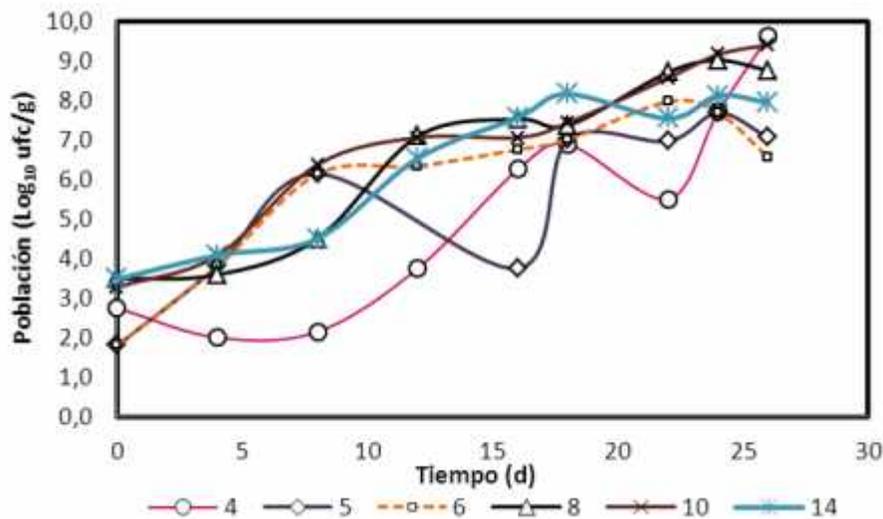


Figura 2. Curvas de crecimiento de BAL en tocineta almacenada en refrigeración.

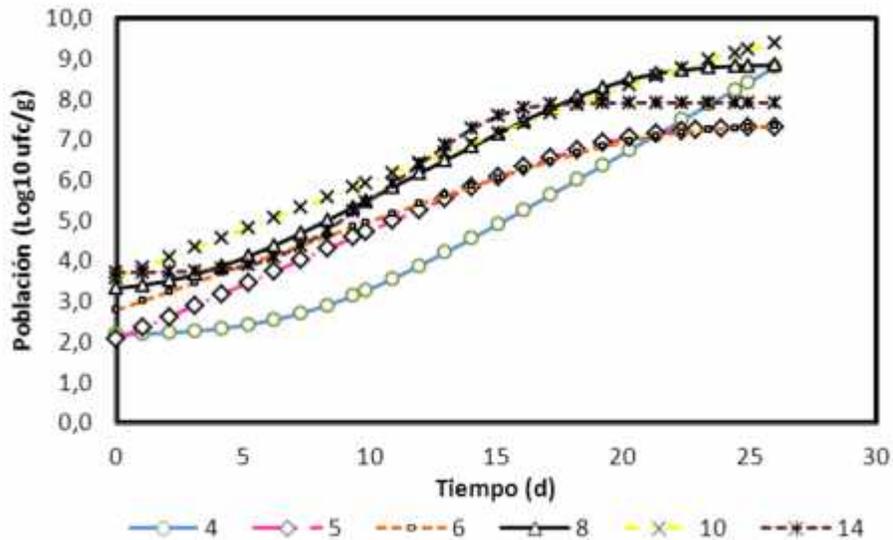


Figura 3. Curvas de crecimiento de BAL en tocineta almacenada en refrigeración ajustadas con el modelo primario de Baranyi y Roberts.

En la figura 4 se muestran las curvas de crecimiento de bacterias acidolácticas en morcilla a las temperaturas evaluadas, mientras que en la figura 5 se presentan las curvas de crecimiento de BAL ajustadas con el modelo de Baranyi y Roberts para el mismo producto.

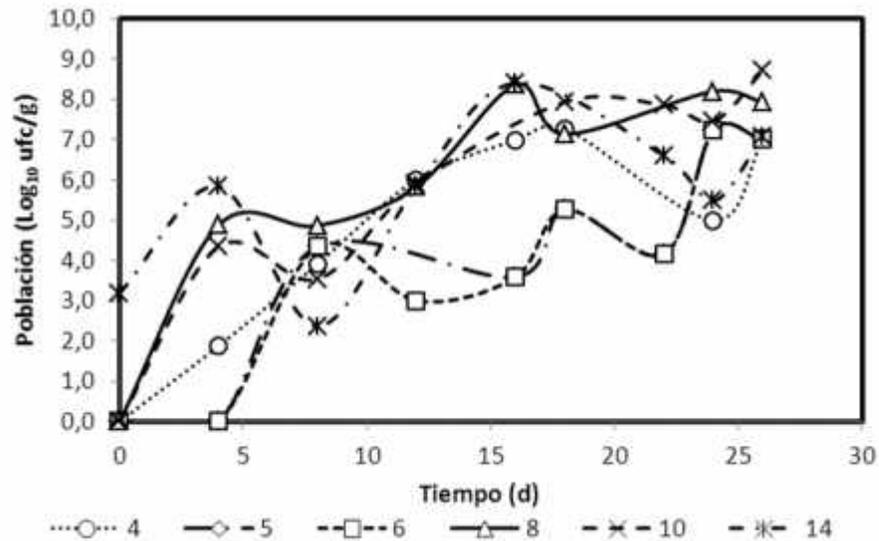


Figura 4. Curvas de crecimiento de BAL en morcilla almacenada en refrigeración.

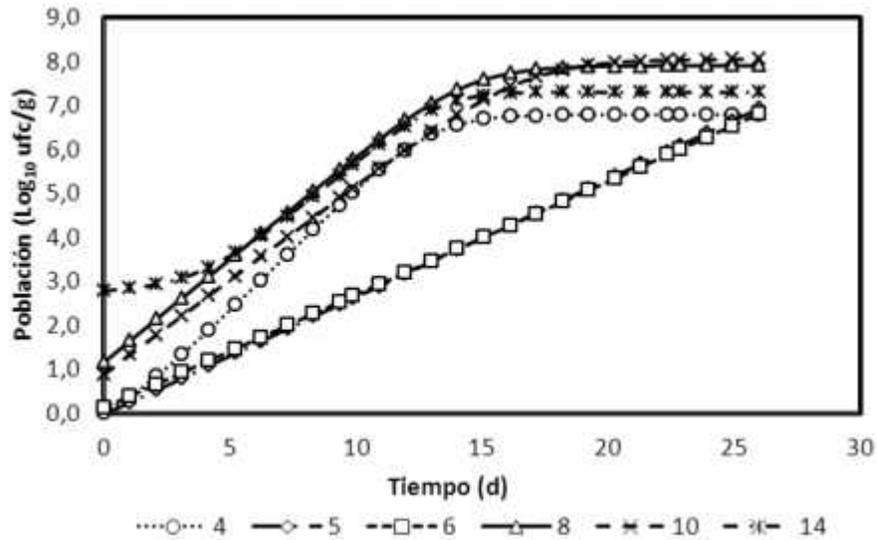


Figura 5. Curvas de crecimiento de BAL en morcilla almacenada en refrigeración ajustadas con el modelo primario de Baranyi y Roberts.

En la figura 6 se muestran las curvas de crecimiento de bacterias acidolácticas en salchicha XL a las temperaturas evaluadas, mientras que en la figura 7 se presentan las curvas de crecimiento de BAL ajustadas con el modelo de Baranyi y Roberts para el mismo producto.

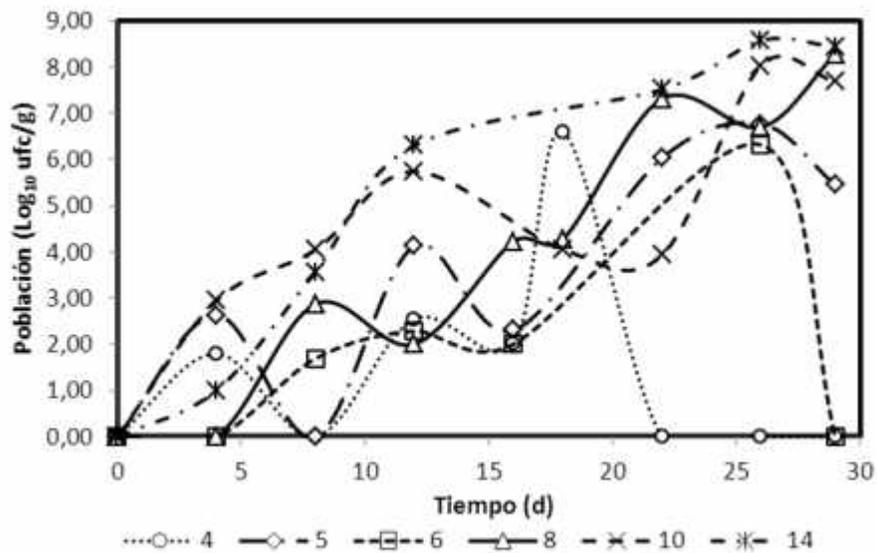


Figura 6. Curvas de crecimiento de BAL en salchicha XL almacenada en refrigeración.

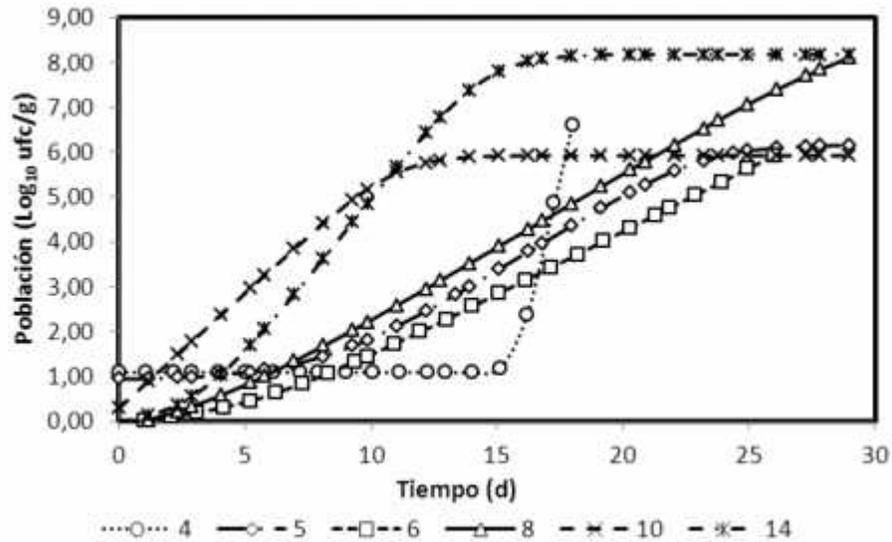


Figura 7. Curvas de crecimiento de BAL en salchicha XL almacenada en refrigeración ajustadas con el modelo primario de Baranyi y Roberts.

Finalmente, en la figura 8 se muestran las curvas de crecimiento de bacterias acidolácticas en jamón a las temperaturas evaluadas, en ella se aprecia que el crecimiento de BAL en jamón no se observó durante los días iniciales, debido en gran parte a la baja cantidad de microorganismos iniciales después del proceso de cocción del jamón, el cual inhibe fuertemente estos organismos alterantes.

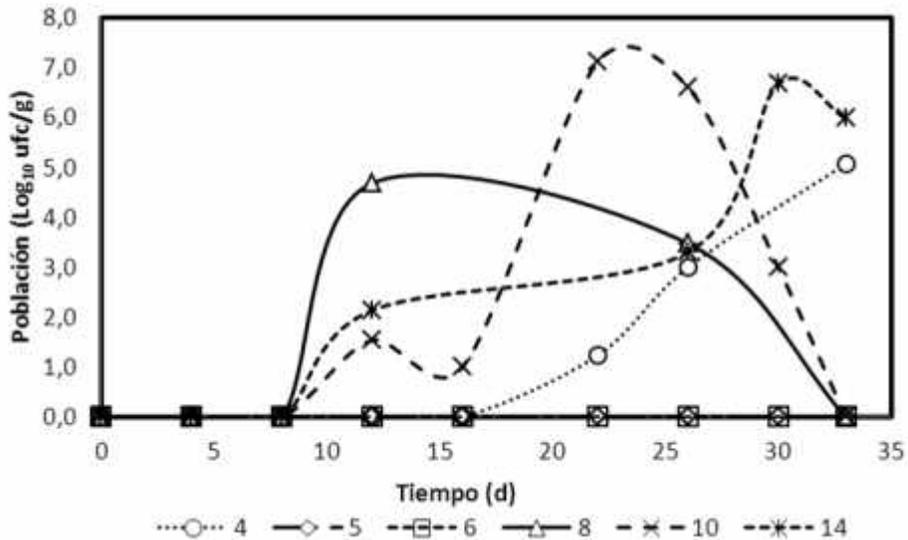


Figura 8. Curvas de crecimiento de BAL en jamón almacenada en refrigeración.

En las tablas 2, 3 y 4 se reflejan los parámetros cinéticos obtenidos para cada curva de crecimiento de BAL en tocineta, morcilla y salchicha XL, respectivamente, almacenadas a diferentes temperaturas de refrigeración, después de ajustar el crecimiento con el modelo primario de Baranyi y Roberts usando el software DMFit on-line (<http://www.combase.cc/index.php/en/tools>)

Tabla 2. Parámetros cinéticos de BAL en tocineta, obtenidos con el software DMFit.

Parámetro	Temperatura (°C)					
	4	5	6	8	10	14
Modelo	No asym	No lag	No lag	Complet	No lag	Complet
R ²	0,86±0,98	0,96±0,42	0,92±0,53	0,95±0,47	0,94±0,49	0,98±0,26
N ₀	2,18±0,53	2,06±0,23	2,79±0,69	3,33±0,32	3,59±0,25	3,72±0,14
Lag	7,54±2,94	n.d	n.d	3,31±1,85	n.d	6,25±0,79
μ _{máx}	0,219±0,07	0,269±0,02	0,327±0,04	0,358±0,06	0,468±0,06	0,529±0,07
N _{máx}	n.d	7,33±0,21	7,37±0,75	8,86±0,24	9,88±1,06	7,91±0,09

n.d = no detectado.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de BAL en morcilla, obtenidos con el software DMFit.

Parámetro	Temperatura (°C)					
	4	5	6	8	10	14
Modelo	Complet	Lineal	Lineal	No lag	No lag	Complet
R ²	0,95±0,60	0,87±0,97	0,80±0,18	0,86±0,99	0,90±0,19	0,79±0,94
N ₀	0,02±0,42	0,03±0,46	0,13±0,53	1,16±0,60	0,88±0,53	2,79±0,64
Lag	0,88±1,54	n.d	n.d	n.d	n.d	3,82±0,31
μ _{máx}	0,257±0,03	0,268±0,03	0,43±0,07	0,469±0,09	0,472±0,19	0,561±0,10
N _{máx}	6,79±0,24	6,93±0,21	6,83±0,35	7,91±0,40	8,05±0,36	7,34±0,39

n.d = no detectado.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de BAL en salchicha XL, obtenidos con el software DMFit.

Parámetro	Temperatura (°C)					
	4	5	6	8	10	14
Modelo	No asymp	Complet	No asymp	Complet	No asymp	Complet
R ²	0,72±0,93	0,58±0,71	0,88±0,82	0,90±0,98	0,54±0,76	0,98±0,47
N ₀	1,09±0,65	0,94±1,28	0,02±0,72	0,12±0,92	0,29±1,60	0,01±0,46
Lag	15,73±0,95	8,14±8,86	4,96±4,68	3,06±1,35	n.d	2,95±5,17
μ _{máx}	0,282±0,07	0,331±0,09	0,349±0,29	0,424±0,13	0,512±0,31	0,716±0,11
N _{máx}	n.d	6,16±1,39	n.d	9,07±4,86	5,93±0,85	8,18±0,27

n.d = no detectado.

Para el jamón, no se pudo obtener los parámetros cinéticos debido a la falta de ajuste representativo de los datos, toda vez que a 5°C y 6°C no se detectó crecimiento de BAL, mientras que a 4°C el crecimiento fue evidente solo después

de 15 días de almacenamiento. A 8°C, 10°C y 14°C el crecimiento de las BAL se detectó después de 8 días de almacenamiento, pero solo en el jamón almacenado a 14°C el crecimiento incrementó hasta el final del periodo de almacenamiento, mientras que, en las temperaturas de 8°C y 10°C, el recuento de las BAL cae a cero al final del periodo de almacenamiento después de un aumento del crecimiento hasta los 12 y 22 días, respectivamente. Debido a estos comportamientos, no fue posible establecer una correlación de las velocidades de crecimiento para cada temperatura estudiada, y por lo tanto, tampoco fue posible desarrollar el modelo matemático.

La escasa actividad de BAL en el jamón y los recuentos bajos en la salchicha XL y en menor proporción en la morcilla, puede asociarse también con la inactivación de estos microorganismos debido al proceso térmico al que son sometidos los productos durante su elaboración. Dicho proceso puede alcanzar temperaturas entre 65 – 80°C que reducen la carga microbiana total en dos o más reducciones decimales, especialmente los microorganismos psicrótrofos y mesófilos sensibles al calor (Cabeza *et al.*, 2006). Después del proceso de cocción, se encuentran recuentos microbianos con valores comprendidos entre 0,5 y 4,0 log₁₀ufc/g de producto (Cabeza *et al.*, 2006; Samelis *et al.*, 2000; 1998). Los valores encontrados en cuanto a las BAL en estos tres productos son similares a los reportados por Cabeza (2006) en la morcilla de León, quien estudio la evolución de los diferentes grupos microbianos bajo el modelo de Baranyi; y Santos *et al.* (2005) en la morilla de Burgos (dos embutidos de sangre típicos españoles), así como por Cayré *et al.* (2005) en emulsiones cárnicas cocidas, Samelis *et al.* (2000; 1998) en cárnicos cocidos y jamón cocido, Franz y Von Holy (1996) y Von Holy *et al.* (1991) en salchichas tipo Viena.

6.2. RECUENTO DE BACTERIAS PSICRÓTROFAS VIABLES (BPV) EN TOCINETA, MORCILLA, SALCHICHA XL Y JAMÓN.

Como se aprecia en las figuras 9 y 11, el crecimiento de bacterias psicrótrofas en tocineta y morcilla almacenadas a las diferentes temperaturas también fue irregular; el recuento en tocineta fue más alto a comparación de la morcilla, sin embargo, en ambos productos aumentó en la medida que el tiempo de almacenamiento también lo hacía, alcanzando en todos los casos valores superiores a 6 log₁₀ufc/g al final del periodo evaluado. Por otra parte, en la salchicha (figura 13), el comportamiento de las BPV fue aún más irregular que el visto para tocineta y morcilla, ya que en algunos casos el crecimiento de este grupo se vio interrumpido (decaimiento) antes de finalizar el periodo de prueba, en especial para la temperatura de 5°C, y para 6°C y 8°C el crecimiento decae cerca del fin del periodo evaluado; solo en las temperaturas de 10°C y 14°C pudo observarse una población final mayor a 6 log₁₀ufc/g.

El comportamiento irregular obedece principalmente a que este grupo de microorganismos es bastante heterogéneo aún incluso más que el de las bacterias acidolácticas, y en la medida que la temperatura de almacenamiento

aumenta, también puede presentarse una recuperación de bacterias mesófilas capaces de crecer a temperaturas mayores a 10°C, originando una variación en las curvas de crecimiento. Al igual que ocurre con las BAL, también se observa una variación en la población inicial, ya que esta también obedece a la contaminación natural de la materia prima y su distribución tanto en las superficies como en los diversos productos no es homogénea (Rodríguez M.2003).

En la figura 9 se muestran las curvas de crecimiento de bacterias psicrótrofas en tocineta a las temperaturas evaluadas, mientras que en la figura 10 se presentan las curvas de crecimiento de BPV ajustadas con el modelo de Baranyi y Roberts para el mismo producto.

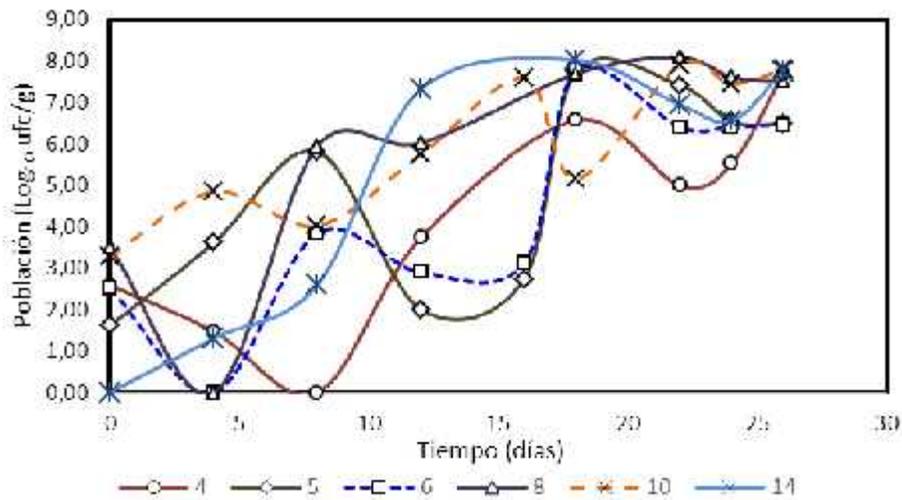


Figura 9. Curvas de crecimiento de BPV en tocineta almacenada en refrigeración.

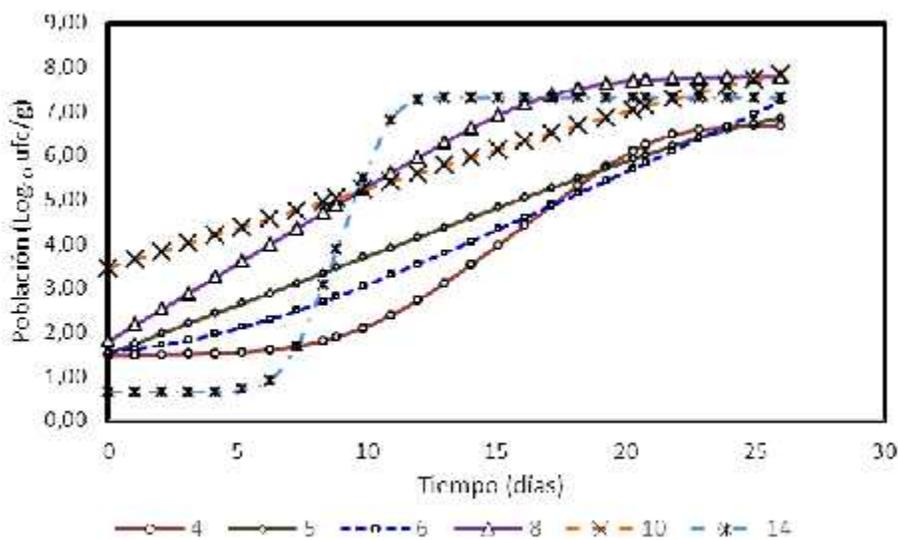


Figura 10. Curvas de crecimiento de BPV en tocineta almacenada en refrigeración ajustadas con el modelo primario de Baranyi y Roberts

Por otra parte, en las figuras 11 y 12 se muestran las curvas de crecimiento de bacterias psicrótrofas en la morcilla a las temperaturas evaluadas, correspondiendo la primera de ellas al crecimiento observado, y la segunda al crecimiento ajustado con el modelo de Baranyi y Roberts.

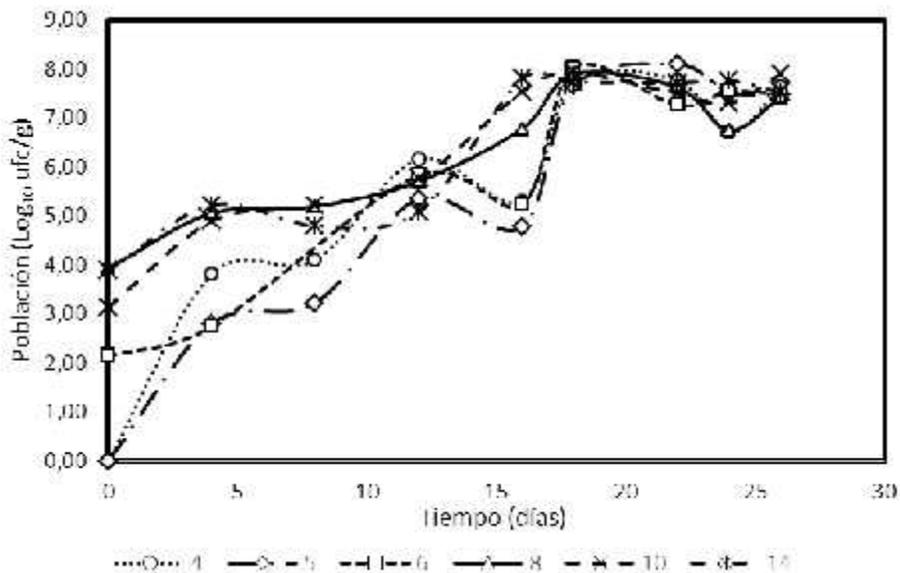


Figura 11. Curvas de crecimiento de BPV en morcilla almacenada en refrigeración.

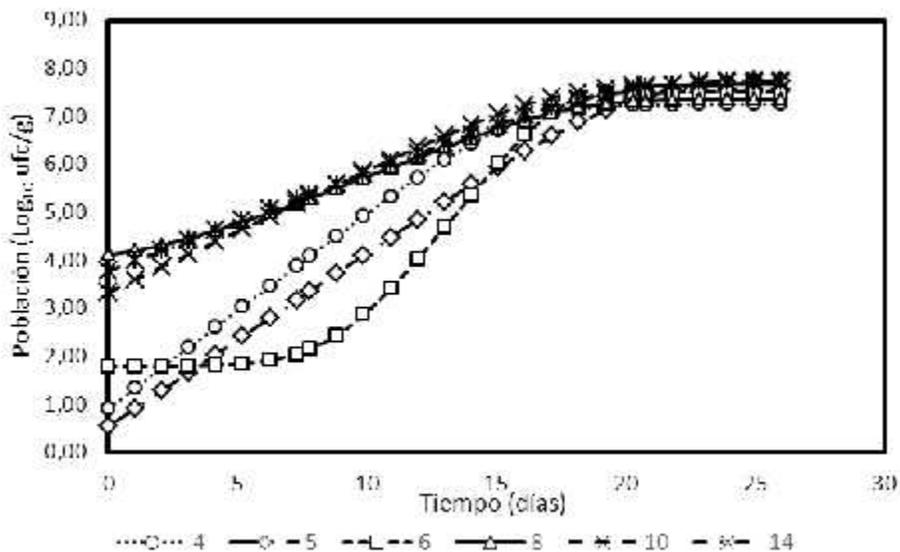


Figura 12. Curvas de crecimiento de BPV en morcilla almacenada en refrigeración ajustadas con el modelo primario de Baranyi y Roberts.

En la figura 13 se presenta las curvas de crecimiento de bacterias psicrótrofas en salchicha XL a las temperaturas evaluadas, mientras que en la figura 14 se muestra las curvas de crecimiento de BPV ajustadas con el modelo de Baranyi y Roberts para el mismo producto.

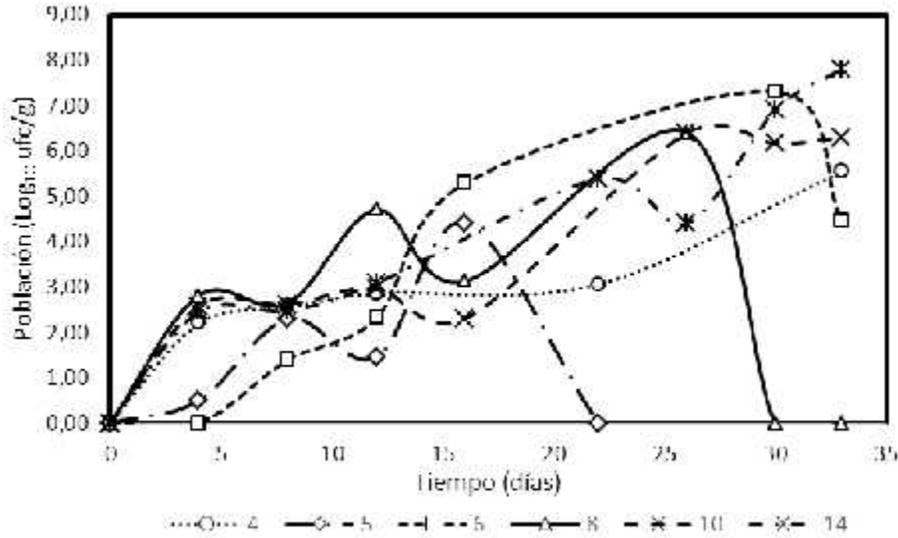


Figura 13. Curvas de crecimiento de BPV en salchicha XL almacenada en refrigeración.

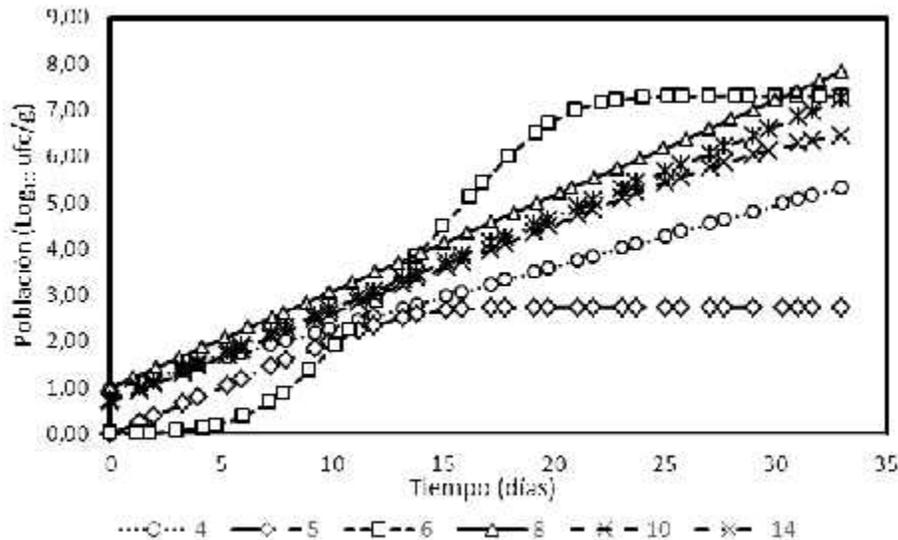


Figura 14. Curvas de crecimiento de BPV en salchicha XL almacenada en refrigeración ajustadas con el modelo primario de Baranyi y Roberts.

Finalmente, en la figura 15 se presenta las correspondientes curvas de crecimiento observadas para las bacterias psicrótrofas en el jamón.

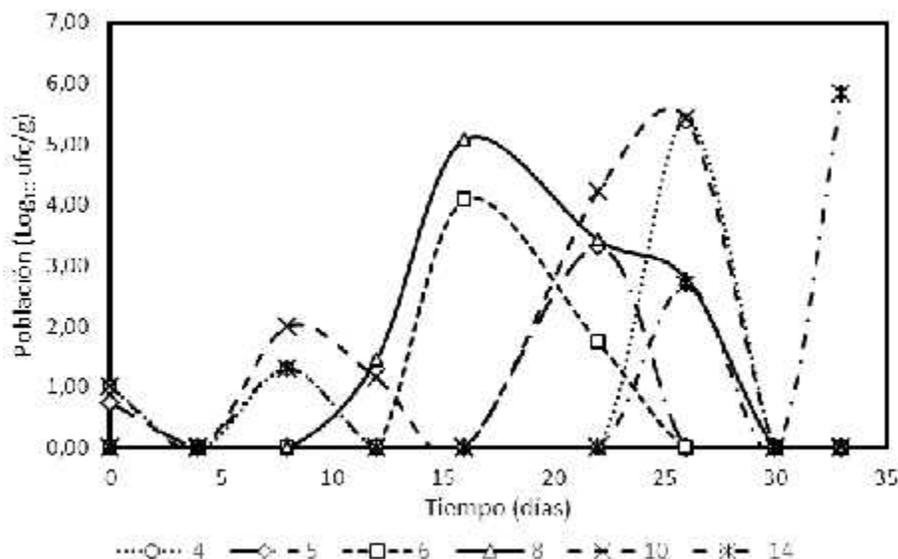


Figura 15. Curvas de crecimiento de BPV en jamón almacenada en refrigeración.

De nuevo, tal y como ocurrió con las BAL, para el jamón fue imposible modelar el efecto de la temperatura sobre este grupo microbiano, ya que el crecimiento observado fue bastante irregular, con oscilaciones que muestran recuperación de bacterias psicrótrofas en unos lapsos de tiempo y en otros no. Este comportamiento también puede deberse a la diversidad de microorganismos que pueden presentarse en el producto, ya que este grupo es aún más disímil que el de las BAL, y puede incluir incluso levaduras tal y como reportan Mateo *et al.* (2006) y Cabeza *et al.* (2006).

En las tablas 5, 6 y 7 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos para cada tratamiento experimental de BPV crecidas en tocineta, morcilla y salchicha XL. Estos parámetros fueron obtenidos después de ajustar el crecimiento respectivo con el modelo primario de Baranyi y Roberts usando el software DMFit on-line (<http://www.combase.cc/index.php/en/tools>).

Tabla 5. Parámetros cinéticos de BPV en tocineta, obtenidos con el software DMFit.

Parámetro	Temperatura (°C)					
	4	5	6	8	10	14
Modelo	Completo	No lag	No asym	No lag	No lag	Completo
R ²	0,72±1,39	0,43±1,93	0,57±1,66	0,61±1,74	0,70±0,96	0,95±0,75
N ₀	1,48±0,96	1,51±1,50	1,55±1,46	1,79±1,44	3,45±0,70	0,65±0,53
Lag	9,75±6,15	n.d	4,75±10,47	n.d	n.d	6,86±2,03
μ _{máx}	0,22±0,12	0,267±0,12	0,458±0,36	0,350±0,19	0,178±0,06	1,618±2,64
N _{máx}	6,68±1,00	7,28±5,35	n.d	7,77±1,01	8,21±3,03	7,32±0,38

Tabla 6. Parámetros cinéticos de BPV en morcilla, obtenidos con el software DMFit.

Parámetro	Temperatura (°C)					
	4	5	6	8	10	14
Modelo	No lag	No lag	Completo	Completo	No lag	No lag
R ²	0,84±1,02	0,90±0,86	0,73±1,50	0,84±0,54	0,93±0,46	0,81±0,70
N ₀	0,92±0,85	0,54±0,66	1,79±1,04	4,12±0,53	3,33±0,37	3,78±0,54
Lag	n.d	n.d	8,73±4,56	2,25±4,95	n.d	n.d
μ _{máx}	0,407±0,11	0,361±0,06	0,671±0,47	0,209±0,08	0,254±0,04	0,205±0,05
N _{máx}	7,26±0,54	7,79±0,64	7,52±0,83	7,37±0,33	7,68±0,27	7,77±0,49

Tabla 7. Parámetros cinéticos de BPV en salchicha XL, obtenidos con el software DMFit.

Parámetro	Temperatura (°C)					
	4	5	6	8	10	14
Modelo	Lineal	No lag	Completo	No lag	No lag	Lineal
R ²	0,80±0,79	0,20±1,40	0,97±0,54	0,65±1,27	0,83±0,97	0,899±0,82
N ₀	0,96±0,49	-0,02±1,20	0,02±0,42	1,01±0,99	0,69±0,67	0,74±0,51
Lag	n.d	n.d	6,82±1,91	n.d	n.d	n.d
μ _{máx}	0,133±0,03	0,204±0,18	0,548±0,12	0,208±0,11	0,193±0,05	0,197±0,03
N _{máx}	n.d	2,74±1,09	7,313±0,54	8,74±83,57	6,73±1,96	n.d

Como puede apreciarse en las tablas anteriores, en general la velocidad máxima de crecimiento de BPV en todos fue aumentando desde 4°C hasta alcanzar su mayor velocidad a 6°C en todos los casos, para luego volver a disminuir en la medida que la temperatura aumenta hasta 14°C. Este comportamiento visto concuerda con la técnica que se emplea para el recuento de este grupo microbiano, la cual emplea una temperatura de incubación de 6,5°C por 7 días. En general, las velocidades de crecimiento obtenidas para las BPV fueron menores que las vistas para las BAL. El comportamiento de la velocidad de crecimiento sugiere a primera vista el plantear un modelo predictivo usando la función matemática cóncava, sin embargo, el análisis de varianza simple no mostró diferencias significativas en las velocidades de crecimiento de BPV para los productos evaluados (datos no mostrados), por lo que no se plantea el desarrollo de un verdadero modelo para este grupo microbiano, ya que la variabilidad observada en la velocidad de crecimiento no quedaría explicada a satisfacción por el modelo al no encontrarse un efecto significativo de la temperatura.

6.3. DESARROLLO DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS PARA BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS CRECIDAS EN TOCINETA, MORCILLA Y SALCHICHA XL.

Para el desarrollo de los modelos matemáticos, se usó el módulo de análisis de regresión de un factor del software StatGraphics Centurion XV versión 15.2.05. Previo al desarrollo de los modelos se ejecutó un procedimiento de transformación de variables que permite por una parte linealizar los modelos a ser estimados, y por otra parte, estabiliza la variabilidad (varianza) y produce que las desviaciones alrededor del modelo sean distribuidas de forma más normal. A este respecto, Dantigny y Bensoussan (2008) reportan que la varianza de la tasa de crecimiento específico de las bacterias por lo general depende de la magnitud de la media, y en consecuencia, el efecto de los factores ambientales tales como la temperatura o la actividad de agua en la tasa de crecimiento específico es a menudo modelado previa transformación de variables empleando la raíz cuadrada o una transformación logarítmica.

Para la generación de los modelos de crecimiento, se empleó la velocidad máxima específica a las temperaturas de 4°C, 6°C, 8°C y 14°C. En todos los casos, los modelos ajustados y seleccionados presentaron valores p menores a 0,05, indicando la existencia de una relación estadísticamente significativa entre la respuesta ($\mu_{m\acute{a}x}$) y el factor estudiado (Temp.) a un nivel de confianza del 95%.

6.3.1. Modelo matemático para el crecimiento de BAL en tocineta.

De los 27 posibles modelos capaces de ser generados por el software StatGraphics, 26 presentaron un $R^2 > 70\%$, y solo uno no fue posible ajustar (ver anexo 1). De ellos, el modelo matemático con mejor ajuste fue el de Y-cuadrado con un $R^2 = 0,9896$ lo que indica que el modelo ajustado explica en un 98,96% la variabilidad observada en $\mu_{m\acute{a}x}$ por efecto de la temperatura. El modelo ajustado se muestra en la siguiente ecuación:

$$\mu_{m\acute{a}x} = \sqrt{-0,0411832 + (0,0227383 \times T)}$$

De acuerdo con el análisis de varianza del modelo estadístico (ver anexo 2), el valor-P observado (0,0052) fue menor que 0,05, indicando que existe una relación estadísticamente significativa entre $\mu_{m\acute{a}x}$ y T con un nivel de confianza del 95,0%.

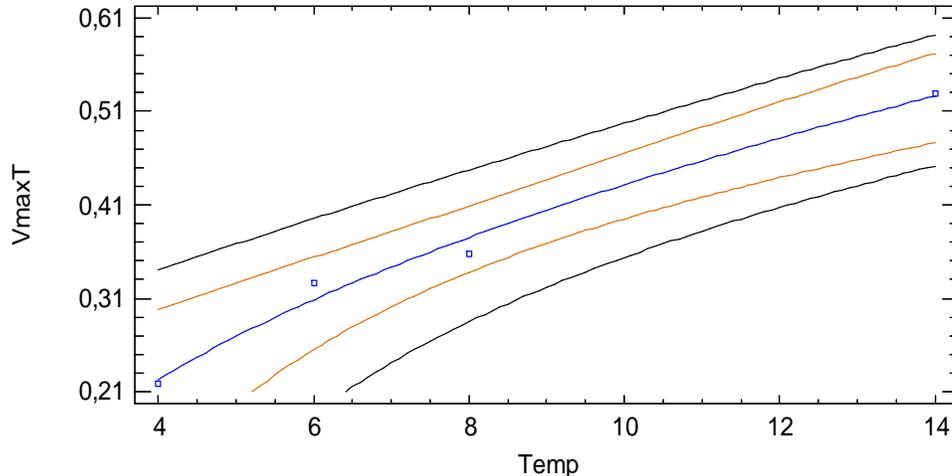


Figura 16. Gráfico del modelo ajustado para crecimiento de BAL en tocineta almacenada en refrigeración.

En la figura 16 se presenta la gráfica generada por el software StatGraphics para el modelo ajustado decrecimiento de BAL en tocineta. En esta gráfica se muestra en color azul la línea media de ajuste, en color rojo los límites de confianza del 95% para el modelo y en color negro los límites de predicción del modelo para una confianza del 95%.

6.3.2. Modelo matemático para el crecimiento de BAL en morcilla.

En el caso del crecimiento de BAL en morcilla, solo 21 modelos ajustados por el software StatGraphics presentaron un $R^2 > 70\%$ (Ver anexo 3). De estos, el modelo matemático con mejor ajuste fue el de Y-cuadrado X-inversa con un $R^2 = 0,98$ indicando que el modelo ajustado explica un 98,99% de la variabilidad en $\mu_{\text{máx}}$ por efecto de la temperatura. El modelo ajustado se muestra en la siguiente ecuación:

$$\mu_{\text{máx}} = \sqrt{0.404385 - 1, \frac{3569}{T}}$$

De acuerdo con el análisis de varianza del modelo estadístico (ver anexo 4), el valor-P observado (0,0050) fue menor que 0,05, indicando que también existe una relación estadísticamente significativa entre $\mu_{\text{máx}}$ y T con un nivel de confianza del 95,0%.

En la figura 17 se presenta la gráfica generada por el software StatGraphics para el modelo ajustado de crecimiento de BAL en morcilla. En esta gráfica se muestra en color azul la línea media de ajuste, en color rojo los límites de confianza del 95% para el modelo y en color negro los límites de predicción del modelo para una confianza del 95%.

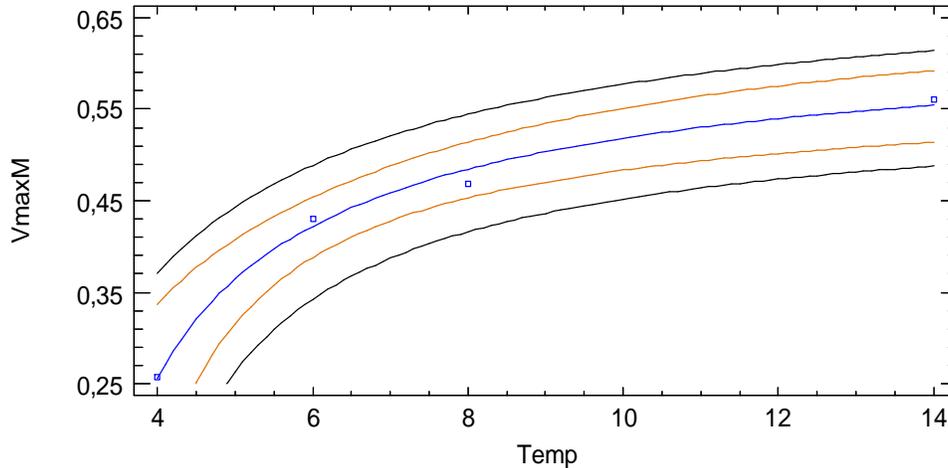


Figura 17. Gráfico del modelo ajustado para crecimiento de BAL en morcilla almacenada en refrigeración.

6.3.3. Modelo matemático para el crecimiento de BAL en salchicha XL.

Al igual que en el caso del modelo de crecimiento de BAL en tocineta, para la salchicha XL el software StatGraphics centurió ajustó 26 posibles modelos con un $R^2 > 70\%$, y solo uno no fue posible ajustar (ver anexo 5). De estos 26 modelos, el modelo matemático con mejor ajuste fue un modelo Y-inversa Log-X con un $R^2 = 0,9999$, lo que indica que el modelo ajustado explica en un 99,99% la variabilidad observada en $\mu_{m\acute{a}x}$ como efecto de la temperatura. El modelo ajustado se muestra en la siguiente ecuación, teniendo en cuenta que el Log de X se expresa como el logaritmo natural de la temperatura (Ln T):

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{1}{5,93484 - (1,71883 \times \text{Ln}T)}$$

De acuerdo con el análisis de varianza del modelo ajustado (ver anexo 6), el valor-P observado (0,0000) también fue menor que 0,05, indicando como ocurre con los modelos anteriores la existencia de una relación estadísticamente significativa entre $\mu_{m\acute{a}x}$ y T con un nivel de confianza del 95,0%.

Por otra parte, en la figura 18 se presenta la gráfica generada por el software StatGraphics para el modelo ajustado de crecimiento de BAL en salchicha XL. En esta gráfica se muestra en color azul la línea media de ajuste, en color rojo los límites de confianza del 95% para el modelo y en color negro los límites de predicción del modelo para una confianza del 95%.

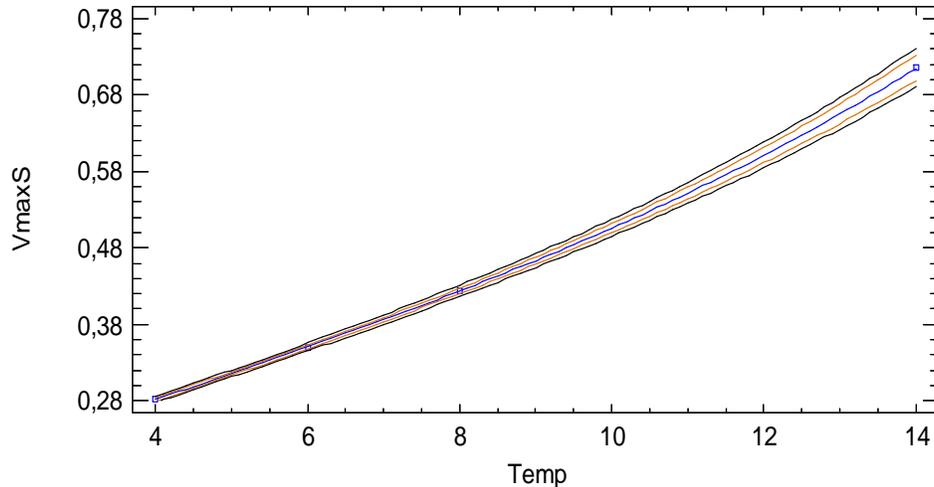


Figura 18. Gráfico del modelo ajustado para crecimiento de BAL en salchicha XL almacenada en refrigeración.

6.4. VALIDACIÓN DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS PARA EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS EN TOCINETA, MORCILLA Y SALCHICHA XL.

6.4.1. Validación interna de los modelos matemáticos para el crecimiento de BAL en tocineta, morcilla y salchicha.

Para la validación de los modelos seleccionados, se usaron tanto los índices estadísticos de calidad del ajuste en regresión lineal simple propuestos por Gutiérrez y De la Vara (2012), los cuales son mostrados en la tabla 8, así como los índices propuestos por Ross en 1996y que se presentaran en la tabla 12. Los primeros índices son obtenidos directamente a partir del análisis de regresión desarrollado con el software StatGraphics centurión (Validación matemática o *in situ*), mientras que los segundos (índices de Ross)se obtienen después de compararlas respuestas observadas y las estimadas por los modelos para condiciones de temperatura que no fueron usadas para construir los modelos. En este caso se compararon las velocidades de crecimiento de BAL en los tres productos a las temperaturas de 5°C y 10°C. Esta última se conoce como la validación externa del modelo.

Tabla 8. Índices estadísticos de calidad del ajuste obtenidos para los modelos de crecimiento de BAL en tocineta, morcilla y salchicha.

Índices estadísticos de calidad del ajuste.	Modelo Tocineta	Modelo Morcilla	Modelo Salchicha
Coeficiente de determinación (R^2)	98,96%	98,99%	99,99%
Coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj})	98,44%	98,50%	99,99%
Coeficiente de correlación (R)	0,995	-0,995	-0,999
Error estándar de estimación	0,0123	0,0126	0,0086
Error absoluto medio (MAE)	0,0072	0,0074	0,0051
Estadístico DW (valor p)	0,9178	0,8046	0,5719

DW = Durbin-Watson

De acuerdo con los resultados de R^2 mostrados en la tabla 8, el modelo obtenido para el crecimiento de BAL en tocineta explica el 98,96% de la variabilidad en $\mu_{m\acute{a}x}$ después de transformar a una escala recíproca para linealizar el modelo, mientras que para el modelo de BAL en morcilla la variabilidad queda explicada en un 98,99%. En el caso del modelo para salchicha, esta variabilidad queda prácticamente explicada en su totalidad por el modelo ya que se obtuvo un R^2 de 99,99%.

Por otra parte, en los tres casos se obtuvo una relación relativamente fuerte entre las variables modeladas, ya que el coeficiente de correlación (R) en todos los casos alcanzó un valor cercano a $\pm 1,00$. Para la tocineta la relación entre las variables es directa ($R = 0,995$) mientras que para la morcilla y el jamón la relación es inversa ($R = -0,995$ y $-0,999$, respectivamente).

El error estándar de estimación indica la magnitud del error de estimación de un modelo, y a medida que el modelo ajuste mejor, el error estándar de estimación disminuye. En los tres casos el error de estimación es bajo, siendo la del modelo de la salchicha la que presenta el menor error de desviación de los residuos (0,0086). Estos valores pueden usarse para construir los límites de predicción para nuevas observaciones.

El error absoluto medio (MAE) sirve para ver cuánto falla en promedio el modelo al hacer la estimación de la variable de respuesta, siendo este uno de los índices más ampliamente usados en microbiología predictiva para la validación de los modelos. En nuestro caso, nuevamente el modelo de crecimiento de BAL en salchichas presentó el valor más bajo (MAE = 0,0051) en comparación con los modelos para tocineta (MAE = 0,0072) y morcilla (MAE = 0,0074).

El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos, es decir, diagnóstica la presencia de correlación entre los residuos consecutivos, que es una posible manifestación de la falta de independencia de los datos. Para verificar esta suposición, puede emplearse las

gráficas de residuos contra el orden en el que se obtuvieron los datos. La suposición se cumple si los puntos en estas gráficas no siguen ningún patrón bien definido, lo cual se manifiesta por valores p mayores a 0,05. En todos los casos los valores p para el estadístico DW fueron mayores que 0,05, por lo que no hay una indicación de una autocorrelación serial en los residuos con un nivel de confianza del 95,0%.

En la figura 19, 20 y 21 se presentan los gráficos de equivalencia entre los valores observados (experimentales) y los estimados o predichos por los modelos para crecimiento de BAL en tocineta, morcilla y salchicha, respectivamente. Este tipo de gráficos constituye otra forma de evaluar la confiabilidad, el ajuste y la bondad de los modelos, ya que permiten detectar las diferencias existentes entre los valores de la velocidad de crecimiento hallados experimentalmente frente a las estimadas por los modelos para las mismas condiciones que fueron usadas para generar los modelos.

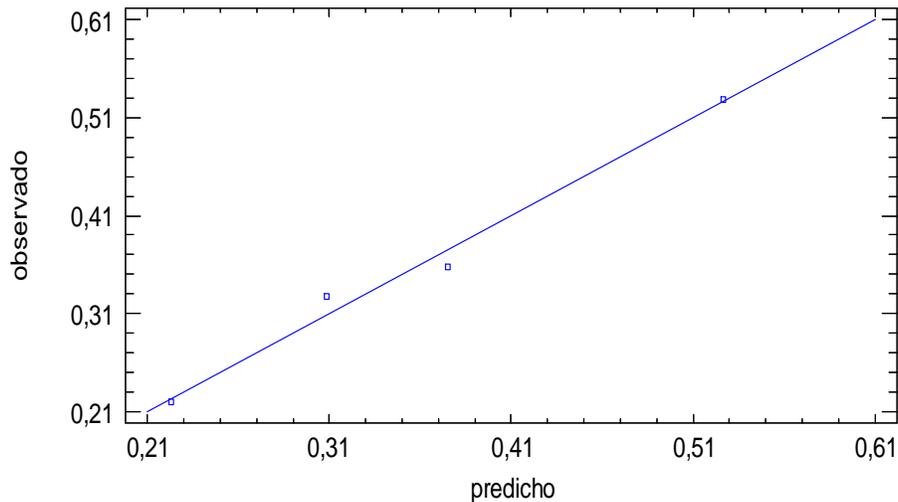


Figura 19. Gráfico de equivalencia entre los valores observados y los estimados por el modelo de crecimiento de BAL en tocineta.

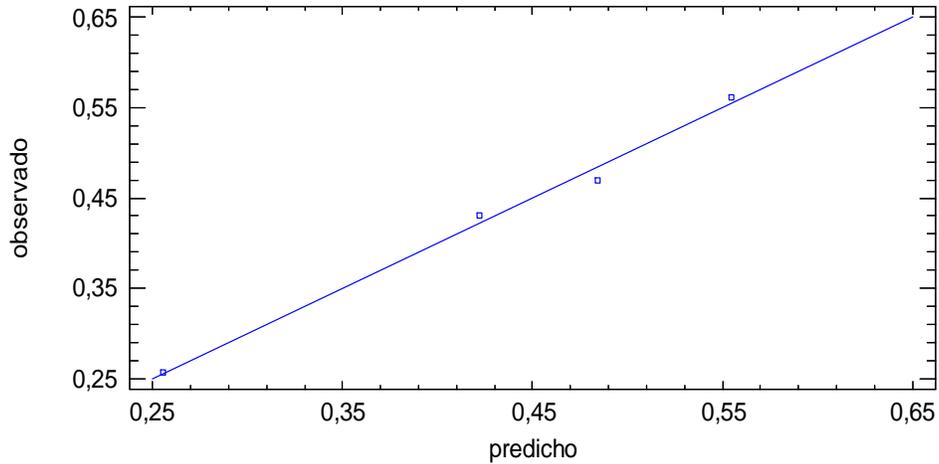


Figura 20. Gráfico de equivalencia entre los valores observados y los estimados por el modelo de crecimiento de BAL en tocineta.

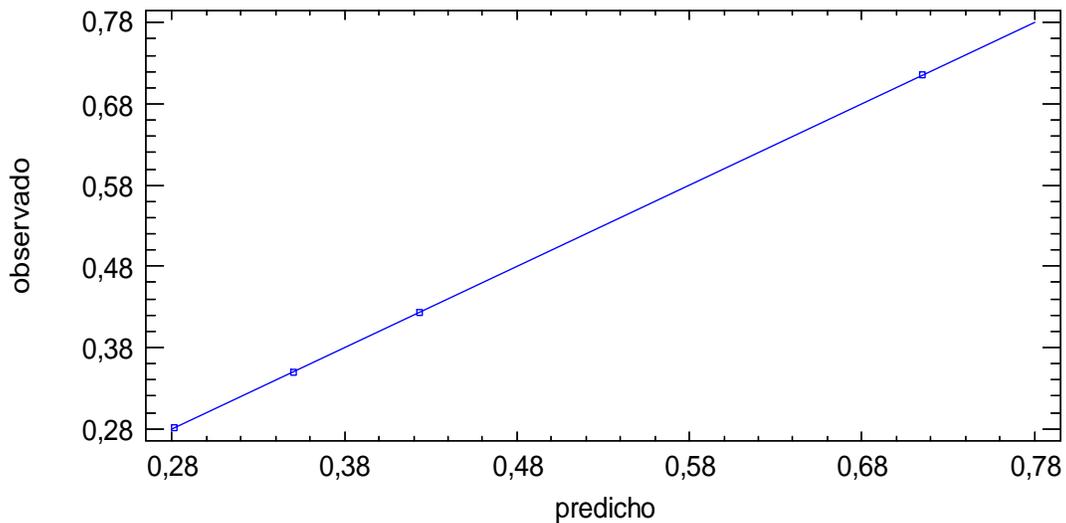


Figura 21. Gráfico de equivalencia entre los valores observados y los estimados por el modelo de crecimiento de BAL en salchicha XL.

Como puede observarse en la figura 19, las diferencias en las velocidades de crecimiento observadas y predichas a las temperaturas extremas (4°C y 14°C) es mínima, ya que los puntos se ubican ligeramente sobre la línea de equivalencia, mientras que las diferencias para las temperaturas de 6°C y 8°C se ubican por encima y debajo de la línea de equivalencia respectivamente, con una diferencia similar entre ellas. Lo anterior es evidencia de un modelo con un buen ajuste de datos.

De igual forma, en la figura 20, la bondad del modelo para el crecimiento de BAL en morcilla es similar al observado en el modelo para la tocineta, es decir que las diferencias en las velocidades de crecimiento observadas y predichas se encuentran cerca de la línea de equivalencia pero ligeramente por encima de la misma en todas las temperaturas, con excepción de la de 8°C, la cual se ubica por

debajo de la misma. Lo anterior es evidencia de un modelo con un buen ajuste de datos pero que puede estimar valores mayores a los observados. De todas formas durante la validación externa se comprobará esta suposición.

Con respecto a la gráfica mostrada en la figura 21, la bondad del modelo para el crecimiento de BAL en salchicha XL es mejor que los obtenidos para la tocineta y la morcilla, ya que en el caso del modelo para salchicha, las diferencias en las velocidades de crecimiento observadas y predichas son mínimas, encontrándose prácticamente ubicadas sobre la línea de equivalencia. Lo anterior es un indicativo de un modelo con un ajuste casi perfecto.

A manera de conclusión general, los tres modelos seleccionados cumplen con los criterios de calidad de ajuste definidos por Gutiérrez y De la Vara (2012), por lo que pueden someterse a validación externa. En este sentido, los autores anteriores recomiendan que para fines de predicción, se usen aquellos modelos que presenten un R^2_{aj} de al menos 70%, en lugar del R^2 , ya que este último aumenta de manera artificial con cada término que se agrega al modelo, aunque sea un término que no contribuye en mucho a la explicación de la respuesta, sin embargo, el R^2_{aj} baja de valor cuando el término que se agrega no aporta mucho a la explicación de la respuesta. Los tres modelos seleccionados presentan un R^2_{aj} mayor de 98%.

6.4.2. Validación externa de los modelos matemáticos para el crecimiento de BAL en tocineta, morcilla y salchicha.

Como se comentó en el numeral 6.4.1., para la validación externa de los modelos se emplearon los índices de Ross (1996), así como el porcentaje de error de predicción propuesto por Mataragas *et al.* (2011).

En las tablas 9, 10 y 11 se presentan los resultados de la comparación de las velocidades de crecimiento observadas y predichas por los modelos de crecimiento de BAL en tocineta, morcilla y salchicha, respectivamente, a una confianza del 95%, mientras que en la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos para los índices propuestos por Ross (1996) y Mataragas *et al.* (2011).

Tabla 9. Comparación de las velocidades de crecimiento observadas y predichas para el crecimiento de BAL en tocineta almacenada en refrigeración, a una confianza del 95%.

Temp. (°C)	$\mu_{\text{máx}}$ Observados	$\mu_{\text{máx}}$ Predichos	Límite de Predicción (95% confianza)		Límite de Confianza (95% confianza)		% error de predicción
	(Log ₁₀ ufc/g*d)		Inferior	Superior	Inferior	Superior	
Datos para generar el modelo							
4,0	0,219	0,223093	0,000000	0,339978	0,104399	0,297728	-1,8689
6,0	0,327	0,308621	0,184925	0,395345	0,25522	0,354058	5,6205
8,0	0,358	0,375132	0,285213	0,447326	0,33789	0,408996	-4,7855
14,0	0,529	0,526454	0,451759	0,591795	0,476414	0,572133	0,4813
Datos para validar el modelo							
5,0	0,269	0,269275	0,0971082	0,368222	0,196146	0,326412	-0,1022
10,0	0,468	0,431509	0,353766	0,497243	0,395083	0,465091	7,7972

Tabla 10. Comparación de las velocidades de crecimiento observadas y predichas para el crecimiento de BAL en morcilla almacenada en refrigeración, a una confianza del 95%.

Temp. (°C)	$\mu_{\text{máx}}$ Observados	$\mu_{\text{máx}}$ Predichos	Límite de Predicción (95% confianza)		Límite de Confianza (95% confianza)		% error de predicción
	(Log ₁₀ ufc/g*d)		Inferior	Superior	Inferior	Superior	
Datos para generar el modelo							
4,0	0,257	0,255265	0,00000	0,371283	0,129275	0,337059	0,6751
6,0	0,430	0,422179	0,342626	0,488956	0,453037	0,514103	1,8119
8,0	0,469	0,484533	0,416002	0,544506	0,453037	0,514103	-3,3120
14,0	0,561	0,554494	0,487848	0,613947	0,513809	0,592391	1,1597
Datos para validar el modelo							
5,0	0,268	0,364699	0,263413	0,443423	0,31572	0,407837	-36,0817
10,0	0,472	0,518358	0,45188	0,57723	0,483442	0,551066	-9,8216

Tabla 11. Comparación de las velocidades de crecimiento observadas y predichas para el crecimiento de BAL en salchicha almacenada en refrigeración, a una confianza del 95%.

Temp. (°C)	$\mu_{\text{máx}}$ Observados	$\mu_{\text{máx}}$ Predichos	Límite de Predicción (95% confianza)		Límite de Confianza (95% confianza)		% error de predicción
	(Log ₁₀ ufc/g*d)		Inferior	Superior	Inferior	Superior	
Datos para generar el modelo							
4,0	0,282	0,281528	0,277784	0,285374	0,27915	0,283947	0,1674
6,0	0,349	0,350248	0,345151	0,355494	0,347814	0,352716	-0,3576
8,0	0,424	0,423613	0,416261	0,43123	0,420224	0,427057	0,0913
14,0	0,716	0,714918	0,690476	0,741154	0,698541	0,732081	0,1511
Datos para validar el modelo							
5,0	0,331	0,315607	0,311279	0,320056	0,313259	0,317991	4,6505
10,0	0,512	0,505792	0,494884	0,51719	0,500011	0,511708	1,2125

Tabla 12. Índices de Ross y Mataragas *et al.*, usados para validar los modelos que describen el efecto de la temperatura de refrigeración en el crecimiento de BAL en tocineta, morcilla y salchicha.

Producto Modelado	B_f	A_f	RMSE	MPE
Tocineta	0,9612	1,0425	0,0365	3,9497
Morcilla	1,4261	1,4261	0,1072	22,9517
Salchicha	0,9477	1,0552	0,0166	2,9315

B_f Factor de sesgo

A_f Factor de exactitud

RMSE Raíz del error cuadrado medio

MPE Porcentaje de Error medio de predicción

De acuerdo con los resultados anteriores, el modelo para estimar el crecimiento de BAL en tocineta presentó los mayores porcentajes de error de predicción en el ajuste de los datos usados para generar el modelo, mientras que el de salchicha presentó el menor porcentaje de predicción en esta estimación. Sin embargo, de acuerdo con Ross (1996) el mejor modelo no es el que presenta el mejor ajuste de los datos, sino el que mejor estime las respuestas, y en ese sentido el modelo para estimar el crecimiento de BAL en morcilla es el que presenta el mayor error en el porcentaje de estimación de acuerdo con los datos usados para validarlo, ya que como se observa en la tabla 10, el porcentaje medio de error de estimación (MPE) fue de 22,95%, lo cual se refleja también con los resultados obtenidos para los valores de sesgo y exactitud del modelo, los cuales fueron los más altos. Sin embargo, este modelo podría generar respuestas más seguras en la estimación de la velocidad de crecimiento de BAL, ya que su sesgo es mayor a uno. Es decir,

las velocidades estimadas por el modelo son mayores a las observadas y por lo tanto, si se usan estos datos para calcular el tiempo de vida útil (TVU) del producto, este TVU estimado sería menor que el observado dando un mayor margen de seguridad al producto. De todas formas, este modelo presenta un porcentaje de error de predicción alto (22,95%), el cual supera el límite aceptado científicamente (menor al 20%) para modelos predictivos microbianos, a pesar de estar dentro de los límites estadísticamente aceptados (30% error en la respuesta).

Por otro lado, si bien los modelos para estimar la velocidad de crecimiento de BAL en tocineta y salchicha presentan valores de sesgo cercanos a uno (0,96 y 0,95, respectivamente), estos valores al ser menores que uno indican que los modelos no son muy seguros para estimar la vida útil, puesto que las respuestas estimadas por estos modelos en general son ligeramente mayores a las observadas. Sin embargo, de acuerdo al valor MPE obtenido son modelos que están dentro del porcentaje de error aceptado, el cual es de un 20% de acuerdo con lo establecido por Ross (1996) y Mataragas *et al.* (2011).

De todas formas, debe considerarse que el error observado en estos modelos puede estar sujeto a la gran heterogeneidad de especies que constituyen las bacterias acidolácticas, lo que hace que las respuestas puedan variar entre temperatura y temperatura y aún dentro de la misma temperatura por efecto de las sucesiones microbianas que puedan darse. Otro factor que también influye en el error de los modelos es que en nuestro caso solo se consideró el efecto de la temperatura, obviando el efecto que aportan otros factores sobre la velocidad de crecimiento y que contribuyen con el aumento del error experimental. Por lo tanto y a manera de recomendación para mejorar la fiabilidad de estos modelos, se debería considerar:

- Desarrollar un mayor número de réplicas del experimento, ya que la repetición es uno de los principios básicos del diseño experimental que contribuyen con la disminución de la variabilidad.
- Caracterizar la especie dominante de BAL en cada producto, y con base en ella desarrollar los modelos adecuados, ya que como sugiere McMeekin y Ross (2002) *“la experiencia ha mostrado que para la mayoría de los casos donde están implicadas asociaciones de microorganismos alterantes, el tiempo en el cual ocurre o se desarrolla la alteración de los alimentos está directamente relacionada con el tiempo de generación de aquel microorganismo que juega el papel predominante en dicha asociación”*
- Caracterizar y estandarizar la población inicial de los productos, ya que esta influye en el tiempo de vida útil estimado, a mayor población inicial, sucede un mayor desarrollo microbiano y por lo tanto, el tiempo de vida útil resulta más corto.

6.4.3. Estimación de la vida útil de la tocineta, morcilla y salchicha usando los modelos matemáticos predictivos.

En la literatura científica se han reportado varias formas para la estimación de la vida útil biológica por medio de modelos matemáticos, uno de ellos es usando la ecuación de aproximación de Monod-Hinshelwood descrita por McMeekin y Ross (2002) y descrita ampliamente por Cabeza (2013), la cual se muestra a continuación:

$$t_s = \left[\frac{(N_s - N_0)}{\log 2} \right] \times T_g$$

Donde t_s es el tiempo necesario para que se desarrolle la alteración bajo las mismas condiciones extrínsecas e intrínsecas medidas (tiempo de vida útil); N_s (\log_{10} ufc/g) es el valor correspondiente a la población de seguridad (valor máximo permisible antes de considerarse alterado el producto); N_0 (\log_{10} ufc/g) es el valor correspondiente a la población inicial presente en el producto; T_g es el tiempo de generación de la población alterante específica. Así una vez N_s y T_g han sido determinados para esas condiciones de almacenamiento, es muy fácil determinar el tiempo de vida útil sustituyendo los valores en la fórmula anterior, y por tanto, puede establecerse el mantenimiento de la calidad de estos productos bajo estas condiciones.

Otro método simple descrito por Pereira y Malfeito (2015) plantea el uso de la ecuación de la recta obtenida en la gráfica de dispersión la velocidad de crecimiento microbiano (\log_{10} ufc/g*d) frente a la temperatura ($^{\circ}$ C). Posteriormente se calcula el incremento en el crecimiento como el inverso de la pendiente, la cual corresponde al tiempo necesario para alcanzar un incremento de 1 unidad \log ufc/g. Finalmente la vida útil se calcula como el tiempo necesario (en días) para alcanzar un incremento de 6 \log ufc/g más la duración de la fase de latencia (en días).

En este trabajo se usó el primer enfoque, asumiendo una población inicial estándar (N_0) que corresponde a la población inicial media observada en cada temperatura para cada producto. Como margen de seguridad (N_s) se definió una población equivalente a 6 \log ufc/g, la cual corresponde al límite máximo permitido en el cual aparecen síntomas evidentes de alteración (Pereira y Malfeito, 2015; Mateo *et al.*, 2006; Cabeza *et al.*, 2006; Borch *et al.*, 1996). El tiempo de generación (T_g) para cada temperatura fue estimado usando la relación $T_g = 1/k$ siendo $k = \mu_{\text{máx}}$ estimado por cada modelo.

Los datos obtenidos para $\mu_{\text{máx}}$, T_g y TVU son mostrados en la tabla 13, asumiendo una N_0 de 2,95 \log_{10} ufc/g para tocineta, 0,84 \log_{10} ufc/g para morcilla y 0,41 \log_{10} ufc/g para salchicha.

La determinación de la reducción del tiempo de vida útil en días para cada uno de los alimentos sometidos a estudio, se realizó por diferencia entre los valores máximos y mínimos tanto de temperatura como de tiempo de vida útil para cada producto, reflejando valores negativos, lo cual muestra una disminución significativa en la duración estimada que estos alimentos deben tener, es decir en el que este se mantiene inocuo.

Tabla 13. Tasas máximas de crecimiento estimadas, tiempo de generación y tiempo de vida útil(TVU) calculado para cada producto a temperaturas entre 4°C y 14°C.

Temp. (°C)	$\mu_{\text{máx}}$ estimada para BAL			T_G (días)			TVU (días)		
	MT	MM	MS	MT	MM	MS	Tocineta	Morcilla	Salchicha
4	0,2231	0,2553	0,2815	4,4825	3,9175	3,5520	45	40	36
5	0,2693	0,3647	0,3156	3,7137	2,7420	3,1685	38	28	32
6	0,3086	0,4222	0,3503	3,2402	2,3687	2,8551	33	24	29
7	0,3435	0,4589	0,3861	2,9113	2,1794	2,5902	30	22	26
8	0,3751	0,4845	0,4236	2,6657	2,0638	2,3606	27	21	24
9	0,4043	0,5036	0,4634	2,4734	1,9857	2,1582	25	20	22
10	0,4315	0,5184	0,5058	2,3175	1,9292	1,9771	24	20	20
11	0,4571	0,5301	0,5515	2,1877	1,8864	1,8133	22	19	18
12	0,4813	0,5397	0,6011	2,0776	1,8528	1,6637	21	19	17
13	0,5049	0,5477	0,6553	1,9826	1,8257	1,5261	20	19	15
14	0,5265	0,5545	0,7149	1,8995	1,8035	1,3988	19	18	14
REDUCCIÓN DEL TIEMPO DE VIDA UTIL (días)							-2.6	-2.2	-2.2

T_G = tiempo de generación

MT = Modelo para tocineta, MM = modelo para morcilla, MS = modelo para salchicha.

TVU = tiempo de vida útil.

Como se observó en las figuras 2, 4 y 6, los valores de la población inicial observada fueron más altos en tocineta, seguida de la morcilla y en menor valor para salchicha, la cuales son consistentes con los valores reportados por Cabeza *et al.* (2006) y Samelis *et al.* (2000, 1998) para productos cárnicos sometidos a procesos de cocción y dependiendo de la intensidad del tratamiento térmico que reciben los mismos. En el caso de la tocineta se trata de un producto semicocido, por lo que el tratamiento térmico aplicado es de 65°C, temperatura que tiene un menor efecto sobre la reducción de la población inicial en comparación con la morcilla, la cual recibe un proceso térmico más drástico pero no tan elevado para evitar que durante la cocción explote la tripa por efecto de dilatación del contenido (Mateo *et al.*, 2005).

La salchicha recibe el proceso térmico más drástico lo que garantiza una reducción apreciable de la carga microbiana, reflejando los valores más bajos. Sin

embargo, y ante una baja carga microbiana inicial al final de la cocción, las BAL pueden encontrar menor competencia de otros grupos microbianos originando un mayor incremento de BAL en el tiempo, el cual se ve reflejado por la menor estimación de vida útil alcanzada para la salchicha en comparación con la tocineta y la morcilla. En aquellos productos cárnicos que son sometidos a temperaturas de cocción más bajas, el crecimiento de BAL puede verse retrasado por competencia de sustratos con otros grupos microbianos. Adicionalmente, algunos productos cárnicos como la salchicha pueden contener sustancias antimicrobianas como las sales de nitro, cuya actividad es más marcada en condiciones anaeróbicas (vacío) presentando un efecto selectivo siendo más acusado para algunos grupos microbianos como las enterobacterias, *B. thermosphacta* o los clostridios, pero con menor efecto sobre las BAL o micrococcos (Cabeza *et al.*, 2006; Borch *et al.*, 1996; Nielsen, 1983).

Debe considerarse también, que en general los productos cárnicos cocidos constituyen un buen sustrato para el desarrollo de diversos grupos microbianos (Buchanan, 1986), debido a sus condiciones intrínsecas tales como a_w relativamente alta (0,97 a 0,99), pH cercano a 6 y un elevado contenido en nutrientes fácilmente asimilables por la mayoría de la microbiota, como la glucosa, aminoácidos, nucleótidos, urea y proteínas solubles (Cabeza *et al.*, 2006; Nychas *et al.*, 1998).

En cuanto a la caducidad de la vida útil de los productos cárnicos originados por el desarrollo microbiano, se requiere que la población alterante se encuentre en general en valores comprendidos entre 10^6 a 10^8 ufc/g. Cuando se produce el deterioro de los alimentos y el número de bacterias es menor al citado, es presumible que la alteración no sea de origen microbiano, sin embargo, ni el recuento de microorganismos totales (psicrótrofos), ni el de alterantes (BAL) puede predecir directamente la calidad de los productos y la caducidad de los mismos, ya que también intervienen otros factores fisicoquímicos que puedan acelerar el fin de la vida útil (Cabeza *et al.*, 2006; Gram *et al.*, 2002).

Finalmente, hay que considerar también que la vida útil depende de la atmósfera empleada. En este caso los productos son envasados al vacío, consiguiendo una mayor vida útil. Sin embargo, la combinación de las condiciones de baja temperatura, empaquetamiento a vacío, la presencia de sal común y, en su caso, sales de nitro en salchichas favorece el crecimiento de BAL psicrótrofas principalmente de los géneros *Lactobacillus* spp. (Especialmente homofermentativos como *L. sakei*) y *Leuconostoc* spp., tal y como ha sido reportado ampliamente por Cabeza *et al.*, 2006; Cayré *et al.*, 2005; Franz y Von Holy, 1996; Metaxopoulos *et al.*, 2002; Pexara *et al.*, 2002. Otros grupos microbianos como las *Pseudomonas*, enterobacterias y las levaduras no tiene posibilidades de dominar la biota alterante, bien sean por las condiciones de anaerobiosis para las primeras, o por fenómenos de antagonismo competitivo frente a las BAL, en el caso de las otras (Franz y Von Holy, 1996).

7. CONCLUSIONES

Se logró desarrollar tres modelos matemáticos para evaluar el efecto de la temperatura de refrigeración sobre la velocidad de crecimiento de bacterias acidolácticas, y a partir de ellos estimar la vida útil biológica de la tocineta, morcilla y salchicha. Para el caso del jamón no pudo desarrollarse el modelo matemático para las BAL debido al comportamiento irregular de este grupo en el producto, presentando oscilaciones del crecimiento.

En el caso de las bacterias psicrótrofas, si bien la temperatura influyó en la velocidad de crecimiento, esta no fue significativa a un $p < 0,05$ con excepción de la temperatura de 6°C, por tal razón, no se pudo desarrollar para ningún producto el modelo matemático respectivo para las bacterias psicrótrofas. Sin embargo, se plantea la búsqueda de un modelo alternativo por medio de análisis de regresión no lineal.

Las BAL se desarrollaron de forma favorable, creciendo a todas las temperaturas de estudio. El recuento inicial, correspondiente al Tiempo 0, varió de unos productos a otros siendo cero para el caso del Jamón cocido mientras que para Tocineta, morcilla y salchicha XI fue superior a 2 ufc/gr logarítmicas; lo cual permitió evaluar mediante modelos matemáticos la velocidad de crecimiento de estos microorganismos con excepción del Jamón, ya que presentó constantes oscilaciones, es decir aumento y descenso de la población en los diferentes tiempos y temperaturas evaluados durante el desarrollo del experimento.

En el caso de BPV existieron diferencias en los recuentos iniciales, variando entre 1 ufc/gr logarítmica por cada grado de aumento de temperatura. Los niveles máximos alcanzados por estos microorganismos fueron en general elevados entre 7 y 8 ufc/gr logarítmicas.

La temperatura de refrigeración influyó significativamente en la velocidad de crecimiento de las BAL a un valor $p < 0,05$, observándose un efecto directo entre estas variables, es decir, con el aumento de la temperatura también aumentó la velocidad de crecimiento. Sin embargo, este incremento no responde de forma lineal en el rango evaluado de 4°C hasta 14°C, por lo que el desarrollo de los modelos implica una previa transformación de las variables con el objeto de linealizarlas y obtener un modelo simple. No obstante, al transformar las variables, el efecto directo solo se mantuvo en el modelo de la tocineta, mientras que para la morcilla y salchicha la relación pasó a ser inversa. En todos los casos, la variabilidad de la temperatura demostró alta correlación con respecto a la velocidad de crecimiento de los microorganismos implicados en la alteración de los productos cárnicos.

La validación interna de los modelos matemáticos mostró que el modelo para estimar el crecimiento de BAL en tocineta presentó los mayores porcentajes de

error de predicción, mientras que los modelos de morcilla y salchicha presentaron errores bajos en los porcentajes de predicción. Sin embargo, la validación externa indicó que el modelo para estimar el crecimiento de BAL en morcilla es el que presenta el mayor error en el porcentaje de estimación (22,95%), así como los mayores valores de sesgo y exactitud. Este modelo supera el límite de error aceptado científicamente (menor al 20%) para modelos predictivos microbianos, a pesar de estar dentro de los límites estadísticamente aceptados (30% error en la respuesta).

Los modelos para estimar la velocidad de crecimiento de BAL en tocineta y salchicha presentaron los valores de sesgo más cercanos a uno (0,96 y 0,95, respectivamente), lo que indicaría que los modelos no son muy seguros. Sin embargo, de acuerdo al error medio de predicción obtenido son modelos que están dentro del porcentaje de error aceptado (<20%). En este sentido, el modelo generado para la salchicha es el que presenta los errores más bajos de predicción tanto en la validación interna como externa.

8. RECOMENDACIONES

Al tratarse de dos grupos bacterianos muy diversos, es decir, con poca homogeneidad entre sus individuos, se concluye a manera de recomendación el de caracterizar la especie dominante en cada asociación, y con base en ella, desarrollar el modelo matemático más adecuado. Así mismo, se debe desarrollar múltiples réplicas del experimento y ampliar el desarrollo y validación de los modelos a otras temperaturas que no fueron consideradas en este trabajo.

Para tener una mayor certeza sobre la vida útil biológica de cada producto, se recomienda hacer un seguimiento de otros factores que pueden condicionar el comportamiento microbiano, como lo es el pH, la actividad de agua y la variación del potencial redox en el interior del empaque, ya que dependiendo de estos factores, pueden variar las sucesiones microbianas al final del periodo de vida útil.

BIBLIOGRAFÍA

- Alais, C., Linden, G. 1990. Capítulo 1: Generalidades sobre la composición de los alimentos. I. Datos analíticos. En: Bioquímica de los alimentos. Editado por Masson, S.A. Barcelona, España. Pp. 3-7.
- Anónimo. 2016. Vida útil (Shelflife) de los alimentos. Universidad Nacional del Santa, Nuevo Chimbote, Ancash, Perú. Documento recuperado de: http://biblioteca.uns.edu.pe/saladocentes/archivoz/curzoz/aula_2_iii_unidad.pdf.
- Arribas, M., Polo, C. 2008. Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. *Food Microbiology*, 25: 875 – 881.
- Axelsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology. En: Salminen, S. & Von Wright, A. (Eds). *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and functional aspects*, 2 ed. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp. 1-72.
- Baranyi J., Roberts T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23:277 – 294.
- Baranyi, J., Jones, A., Walker, C., Kaloti, A., Robinson, T.P., Mackey, B.M., 1996. A combined model for growth and subsequent thermal inactivation of *Bochothrixthermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1029–1035.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P.J. 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10: 43 – 49.
- Björkroth, J. 2005. Microbiological ecology of marinated meat products. A review. *Meat Science*, 70: 447 – 480.
- Björkroth, K.J., Korkeala, H. 1997. Use of rRNA gene restriction patterns to evaluate lactic acid bacterium contamination of vacuum-packaged sliced cooked whole-meat product in a meat processing plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 448 – 453.
- Björkroth, K.J., Vandamme, P., Korkeala, H.J. 1998. Identification and characterization of *Leuconostoccarosum*, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3313 – 3319.
- Borch, E., Kant, M.L., Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat product. *Food Microbiology*, 33: 103 – 120.
- Buchanan, R.L., Whiting, R.C., Damert, W.C. 1997. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *FoodMicrobiology*, 14: 313 – 326.
- Buelvas, G.A. 2013. Desarrollo y validación de modelos matemáticos predictivos del crecimiento microbiano para estimación de la vida útil en jamón lonchado

- empacado al vacío. Trabajo de grado Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería y Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. 125 p.
- Buelvas, G; Patiño, J; Flores, C. 2012. Efecto de la cadena de frío sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, la calidad fisicoquímica y la alteración de jamones cocidos lonchados empacados al vacío. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(2): 55 – 64.
- Cabeza H, E.A. 2006. Aportaciones a la caracterización de la morcilla de León y evolución de determinados parámetros físicos, químicos y microbiológicos durante su conservación a refrigeración. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Pp. 1 – 363. Recuperado de: http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/hermesoft/portallG/PaginasArillas/archivos/objetosConocimiento/1/47/Tesis_Doctoral_Enrique_Cabeza.pdf;jsessionid=8DE37C74C936A62B3BDD057C69BB7E34.
- Cabeza H, E.A. 2013. Aplicación de la Microbiología Predictiva en la determinación de la vida útil de los alimentos. Recuperado de: https://www.academia.edu/992792/Aplicaci%C3%B3n_de_la_Microbiolog%C3%ADa_Predictiva_en_la_determinaci%C3%B3n_de_la_vida_%C3%BAtil_de_los_alimentos.
- Cabeza H, E.A., Mateo O, J., Caro C, I., Zumalacárregui R, J.M. 2006. Características de los principales grupos microbianos asociados al deterioro de los productos cárnicos cocidos almacenados a refrigeración. *Alimentación, equipos y tecnología*, 211(1): 47 – 51.
- Casp, A., Abril, J. 1999. Parte I: Bases de la conservación de alimentos. En: *Procesos de conservación de alimentos*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. Pp. 35-54.
- Cayré, M.E., Garro, O, Vignolo, G. 2005. Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrixthermosphacta* in cooked meat emulsions. *FoodMicrobiology*, 22: 505 – 512.
- Cayré, M.E., Vignolo, G.M., Garro, O.A. 2007. Selección de un modelo primario para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y *Brochothrixthermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas. *Información tecnológica*, 18: 23-29.
- Chaillou, S., Christieans, S., Rivollier, M., et al. 2014. Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef. *Meat Science*, 97: 332 – 338.
- Codex Alimentarius - Comisión conjunta FAO-OMS. 1998. Sección II: definiciones, Directrices para el diseño de las medidas de control de los alimentos

- vendidos en las vías públicas de África. En: Requisitos generales (Higiene de los alimentos). Suplemento al volumen 1B. Roma, Italia. M-83.
- Coll C.F., Giannuzzi L., Noia M.A., Zaritzky N. (2001). El modelado matemático: una herramienta útil para la industria alimenticia. *Revista Ciencia Veterinaria*, 3(3): 22 – 28.
- Dalgaard, P. 2004. Chapter 14: Predictive microbiology. En: FAO Fisheries Technical Paper No. 444: Assessment and Management of Seafood Safety and Quality. Editors: Huss H.H., Ababouch, L., Gram, L. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome. Pp. 204 – 209.
- Dalgaard, P., 1995. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 305–317.
- Dantigny, P., Bensoussan, M. 2008. The logarithmic transformation should be avoided for stabilizing the variance of mould growth rate. *International Journal of Food Microbiology*, 121: 225 – 228.
- Dantigny, P., Marín, S., Beyer, M., Magan, N. 2007. Mould germination: Data treatment and modelling. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 17 – 24.
- Datta, A.K., Sablani, S.S. 2007. Chapter 1: Mathematical Modeling Techniques in Food and Bioprocesses: an overview. En: Handbook of food and bioprocess modeling techniques / editors, Shyam S. Sablani, *etal.* CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. Pp. 1 – 11.
- Devlieghere, F., Van Belle, B., Debevere, J., 1999. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *International Journal of Food Microbiology*, 46: 57–70.
- Dos Santos E., A.J. 2007. Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, España. Pp. 282.
- Einarsson, H. 1994. Evaluation of a predictive model for the shelf life of cod (*Gadus morhua*) fillets stored in two different atmospheres at varying temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 93–102.
- Einarsson, H., Ericksson, S.G., 1986. Microbial growth models for prediction of shelf life of chilled meat. Recent Advances and Developments in the Refrigeration of Meat by Chilling International Institute of Refrigeration, Paris, France. Pp. 397–402.
- Ellis, D.I., Goodacre, R. 2001. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends. *Trends in Food Science and Technology*, 12: 414 – 424.

- Fleet, G.H. 1999. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 101 – 117.
- Franz, C.M.A.P., Von Holy, A. 1996. Bacterial populations associated with pasteurized vacuum-packed Vienna sausages. *Food Microbiology*, 13: 165 – 174.
- Gacula, M.C., Kubala, J.J. 1975. Statistical models for the shelf life failures. *Journal of Food Science*, 40: 404 – 409.
- García, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. 2011. Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillusochraceus* and *Aspergillusparasiticus*. *Food Microbiology*, 28: 406 – 417.
- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Cenens, C., Van Impe, J.F., 1998. Application of artificial neural networks as a non-linear modular modeling technique to describe bacterial growth in chilled food products. *International Journal of Food Microbiology*, 44: 49–68.
- Geisen, R., Lücke, F.K., Kröckel, L. 1992. Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtsch*, 72: 894 – 898.
- Gibson, A.M., Bratchell, N., Roberts, T.A. 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *Journal Applied of Bacteriology*, 62: 479.
- Gill, C.O., Jones, T., 1992. Assessment of the hygienic efficiency of two commercial processes for cooling pig carcasses. *Food Microbiology*, 9: 335–343.
- Gill, C.O., Phillips, D.M., Hoeffen, M.P.F. 1988. A computer program for assessing the remaining storage life of chilled red meats from product temperature histories. In: *Proceeding of Meetings of Commissions C2, D1, D2/3, E1, September 5–9, Institut International du Froid Paris, Refrigeration for Food and People*, pp. 73–77.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Givskov, M. 2002. Food spoilage - interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 79 – 97.
- Gutiérrez, H., De la Vara, R. 2012. Capítulo 11: Análisis de Regresión. En: *Análisis y Diseño de Experimentos*, 3ª ed. Editorial McGraw-Hill. México D.F., México. Pp. 299 – 341.
- Hugas, M., Monfort, J.M. 1997. Bacterial Starter cultures of meat fermentation. *Food Chemistry*, 59: 547 – 554.
- Huisin'tVeld J.H.J. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 1 – 18.

- ICMSF. 2001. Microorganismos de los alimentos 6. Ecología microbiana de los productos alimentarios. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- ICONTEC (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación). 2002. Norma Técnica Colombiana - NTC 5034. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de bacterias mesofílicas de ácido láctico. Técnica de recuento de colonias a 30°C. Bogotá, D.C., Colombia.
- ICONTEC (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación). 2008. Norma Técnica Colombiana – NTC 1325. Industrias Alimentarias. Productos cárnicos procesados (no enlatados). Quinta actualización. Bogotá, D.C., Colombia.
- ISO (International Organization for Standardization). 2001. Norma ISO 17410. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the enumeration of psychotrophicmicroorganisms. Geneve, Switzerland.
- Jay, M.J. 2002. Capítulo 5. Carnes elaboradas. En: Microbiología moderna de los alimentos. 4a Ed. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España. Pp. 81-92.
- Kant-Muermans, M.L.T., Stekelenburg, F.K., Zwietering, M.H., Huis in'tVeld, J.H.J., 1997. In: Modelling the Shelf Life of Packed, Cooked Meat Products, World Congress on Food Hygiene, The Hague, Netherlands. Pp. 53–57.
- Labuza, T.P. 1982. Shelflife dating of foods. Food & Nutrition Press Publisher. Westport, CT. Pp. 500.
- Labuza, T.P., 1994. Determination of the Shelf Life of Foods. Article in edited. Recuperado de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/ShelfLife1corto_8507.pdf.
- Laguado C., G.E., Suárez Q, W.H., Cabeza H, E.A. 2016. Desarrollo y validación de un modelo predictivo del crecimiento de bacterias acidolácticas en chorizo cocido empacado al vacío y almacenado a refrigeración. @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria, 14(1). Artículo en prensa.
- Lahlali, R., Serrhini, M.N., Friel, D., Jijakli, M.H. 2007. Predictive modeling of temperatures and water activity (solute) on the *in vitro* radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. International Journal of Food Microbiology, 114: 1 – 9.
- Li, H., Xie, G., Edmondson, A. 2007. Evolution and limitations of primary mathematical models in predictive microbiology. British Food Journal, 109: 608 – 626.
- Man, D. 2004. Capítulo 1: Introducción a la caducidad de los alimentos. Preguntas más frecuentes. En: Caducidad de los alimentos. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España. Pp. 4.

- Mataragas, M., Dimitriou, V., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H. 2011. Quantifying the spoilage and shelf-life of yogurt with fruits. *Food Microbiology*, 28: 611 – 616.
- Mateo O. J., Cabeza H, E.A., Zumalacárregui R, J.M. 2006. Alteración microbiana de los productos cárnicos cocidos durante se almacenamiento a refrigeración. *Alimentación, equipos y tecnología*, 208: 57 – 62.
- Mateo O., J., Antiduelo, A., CabezaH, E.A., ZumalacarréguiR, J.M. 2005. Proceso de elaboración de la morcilla de León una morcilla de cebolla. *Alimentación, equipos y tecnología*, 2005:44 – 49.
- McDonald, K., Sun, D.W. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 52: 1 – 27.
- McKellar, R.C., Lu, X. 2004. Chapter 2: Primary Models. En: *Modeling Microbial Responses in Food*. Edited by Robin C. McKellar and Xuewen Lu. CRC Series in Contemporary Food Science, Boca Ratón, FL, USA. Pp. 33 – 74.
- McMeekin, T., Olley, J., Ratkowsky, D., Corkrey, R., Ross, T. 2013. Predictive microbiology theory and applications: Is it all about rates?. *Food Control*, 29: 290 – 299.
- McMeekin, T.A., Olley, J., Ratkowsky, D.A., Ross, T. 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 73: 395 – 407.
- McMeekin, T.A., Ross, T. 2002. Predictive Microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 133 – 153.
- McMeekin, T.A., Ross, T., 1996. Shelf-life prediction: status and future possibilities. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 65–83.
- Metaxopoulos, J., Mataragas, M., Drosinos, E.H. 2002. Microbial interaction in cooked cured meat products under vacuum or modified atmosphere at 4°C. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 363 – 373.
- Neumeyer, K., Ross, T., McMeekin, T.A. 1997a. Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage pseudomonads. *International Journal of Food Microbiology*, 38: 45–54.
- Neumeyer, K., Ross, T., Thomson, G., McMeekin, T.A., 1997b. Validation of a model describing the effects of temperature and water activity on the growth of psychrotrophic Pseudomonads. *International Journal of Food Microbiology*, 38: 55–63.
- Nychas, G.J.E., Arkoudelos, J.S. 1990. Staphylococci: their role in fermented sausages. *Journal Applied of Bacteriology, Symp. Suppl.*, 167S-188S.

- Nychas, G.J.E., Drosinos, E.H., Board, R.G. 1998. Chemical changes in stored meat. Davies, A., Board, R, (Ed). The microbiology of meat and poultry. London, Blackie Academic & Professional. Pp 288 – 320.
- Patsias, A., Chouliara, I., Badeja, A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. 2006. Shelflifeofa chilled precooked chicken product stored in air under modified atmospheres: microbial, chemical, sensory attributes. Food Microbiology, 23: 423 – 429.
- Pereira, M., Malfeito F., M.2015. A simple method to evaluate the shelf life of refrigerated rabbit meat. Food Control, 49: 70 – 74.
- Pérez, M.R. 2003. Desarrollo y validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba. Córdoba, España. 251 p.
- Pexara, E.S., Metaxopoulos, J., Drosinos, E.H. 2002. Evaluation of shelf life of cured, cooked, sliced turkey fillets and cooked pork sausages “piroski” stored under vacuum and modified atmospheres at +4 and +10°C. Meat Science, 62, 33 – 43.
- Pin, C., Baranyi, J., 1998. Predictive models as a means to quantify the interactions of spoilage organisms. International Journal of Food Microbiology, 41: 59–72.
- Rahkila, R., Nieminen, T., Johansson, P., Säde, E., Björkroth, J. 2012. Characterization and evaluation of the spoilage potential of *Lactococcus piscium* isolates from modified atmosphere packaged meat. International Journal of Food Microbiology, 156: 50 – 59.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. Journal of Bacteriology, 149: 1–5.
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. Journal of Applied Bacteriology, 81: 501 – 508.
- Ross, T., McMeekin, T.A. 1994. Predictive Microbiology. International Journal of Food Microbiology, 23: 241 – 264.
- Saghir, S., Wagner, K.H., El madfa, I. 2005. Lipid oxidation of beef fillets during braising with different cooking oils. Meat Science, 71:440 – 445.
- Sakala, R.M., Hayashidani, H., Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y., Fukushima, A., *et al.* 2002. Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. International Journal of Food Microbiology, 74: 87 – 99.

- Samelis, J., Kakouri, A., Georgiadou, K.G., Metaxopoulos, J. 1998. Evaluation on the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 649 – 660.
- Samelis, J., Kakouri, A., Rementzis, J. 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiology*, 17: 329 – 340.
- Santos, E.M., Jaime, I., Rovira, J., Lyhs, U., Korkeala, H., Björkroth, J. 2005. Characterization and identification of lactic acid bacteria in “*Morcilla de Burgos*”. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 285 – 296.
- Schoolfield, R.M., Sharpe, P.J.H., Magnuson, C.E. 1981. Non-linear regression of biological temperature-dependent rate models base on absolute reaction-rate theory. *Journal of Theoretical Biology*, 88: 719 – 731.
- Sebranek, J.G., Sewalt, V.J.H., Robbins, K.L., Housser, T.A. 2005. Comparison of a natural rosemary extract and BHZ/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Science*, 69: 289 – 296.
- Sofos, J.N. 1994. Chapter 14: Microbial growth and its control in meat, poultry and fish. En: *Quality Attributes and their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products*. Edited by Pearson, A.M., and Dutson, T.R. Blackie Academic and Professional. Glasgow, Great Britain.
- Tirado, J., Paredes, D., Velázquez, G., Torres, J.A. 2005. Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(1): 66 – 76.
- Valík, L., Pieckova, E. 2001. Growth modeling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 63: 11 – 17.
- Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Martens, T., De Baerdemaeker, J., Vandewalle, J., 1992. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2901–2909.
- Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Schellekens, M., Martens, T., De Baerdemaeker, J., 1995. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. *International Journal of Food Microbiology*, 25: 227–249.
- Vankerschaver, K., Wilcox, F., Smout, C., Hendrickx, M., Tobback, P., 1996. The influence of temperature and gas mixtures on the growth of the intrinsic microorganisms on cut endive: predictive versus actual growth. *Food Microbiology*, 13: 427 – 440.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., De Graef, V., Debevere, J. 2005. In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with

- anaerobically stored cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology*, 98:33 – 42.
- Von Holy, A., Cloete, T.E., Holzappel, H. 1991. Quantification and characterization of microbial population associated with spoilage, vacuum-packed Vienna sausages. *Food Microbiology*, 8: 95 – 104.
- Von Wright, A., Axelsson, L. 2012. *Lactic Acid Bacteria: An Introduction*. Eds.: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., von Wright, A., Eds., *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 4th Edition, Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, Boca Raton, 1 – 16.
- Welch, R.W., Mitchell, P.C. 2000. Food Processing: a century of change. *British Medical Bulletin*, 56(1): 1 – 17.
- Whiting, R.C., Buchanan, R.L. 1993. A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiology*, 10: 175 – 177.
- Whiting, R.C., Cygnarowicz-Provost, A. 1992. A quantitative model for bacterial growth and decline. *Food Microbiology*, 9: 269 – 277.
- Williams, T., 1992. In: *The Principles Involved in the Determination of Product Shelf life*, Leatherhead Food Research Association, UK.
- Yarce, C. 2013. Microbiología predictiva: una ciencia en auge. *INGE@UAN – Tendencias en la Ingeniería*, 3(6): 31 – 43.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1875 – 1881.

ANEXOS

Anexo 1. Comparación de modelos alternos para el crecimiento de BAL en tocineta.

<i>Modelo</i>	<i>Correlación (R)</i>	<i>R-Cuadrada (R²)</i>
Cuadrado de Y	0,9948	98,96%
Raíz Cuadrada de X	0,9928	98,57%
Raíz Cuadrada-Y Log-X	0,9922	98,45%
Doble Inverso	0,9907	98,15%
Logaritmo de X	0,9905	98,11%
Cuadrado Doble	0,9891	97,82%
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	0,9886	97,73%
Multiplicativa	0,9881	97,64%
Raíz Cuadrada Doble	0,9873	97,48%
Lineal	0,9872	97,46%
Curva S	-0,9864	97,30%
Log probit	0,9792	95,88%
Logístico	0,9765	95,36%
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	0,9758	95,22%
Raíz Cuadrada-Y Inversa de X	-0,9754	95,14%
Raíz Cuadrada de Y	0,9752	95,10%
Cuadrado-Y Log-X	0,9734	94,75%
Cuadrado de X	0,9629	92,72%
Inversa-Y Log-X	-0,9628	92,70%
Inversa de X	-0,9591	91,99%
Exponencial	0,9570	91,59%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	0,9408	88,51%
Cuadrado-Y Inversa de X	-0,9163	83,96%
Log-Y Cuadrado-X	0,9125	83,26%
Inversa de Y	-0,9050	81,90%
Inversa-Y Cuadrado-X	-0,8416	70,83%
Inversa-Y Raíz Cuadrada-X	<sin ajuste>	

Anexo 2. Análisis estadístico del modelo de crecimiento de BAL en tocineta.

Análisis de Varianza

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0,0289537	1	0,0289537	190,04	0,0052
Residuo	0,00030471	2	0,000152355		
Total (Corr.)	0,0292584	3			

$$R = 0,994779$$

$$R^2 = 98,9586 \text{ por ciento}$$

$$R^2_{aj} = 98,4378 \text{ por ciento}$$

$$\text{Error estándar del est.} = 0,0123432$$

$$\text{Error absoluto medio (MAE)} = 0,00718468$$

$$\text{Estadístico Durbin-Watson} = 3,28887 \text{ (P=0,9178)}$$

$$\text{Autocorrelación de residuos en retraso 1} = -0,661662$$

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo Y-cuadrada para describir la relación entre $\mu_{\text{máx}}$ y T. La ecuación del modelo ajustado es

$$\mu_{\text{máx}} = v(-0,0411825 + 0,0227383 * T)$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre $\mu_{\text{máx}}$ y T con un nivel de confianza del 95,0%.

El R^2 indica que el modelo ajustado explica el 98,9586% de la variabilidad en la $\mu_{\text{máx}}$ después de transformar a una escala recíproca para linearizar el modelo. El R es igual a 0,994779, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,0123432. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones. El error absoluto medio (MAE) de 0,00718468 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es mayor que 0,05, no hay indicación de una autocorrelación serial en los residuos con un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo 3. Comparación de modelos alternos para el crecimiento de BAL en morcilla.

<i>Modelo</i>	<i>Correlación</i>	<i>R-Cuadrada</i>
Cuadrado-Y Inversa de X	-0,9950	99,00%
Inversa de X	-0,9925	98,50%
Raíz Cuadrada-Y Inversa de X	-0,9862	97,26%
Cuadrado-Y Log-X	0,9848	96,98%
Curva S	-0,9773	95,52%
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	0,9663	93,37%
Logaritmo de X	0,9592	92,01%
Doble Inverso	0,9547	91,14%
Raíz Cuadrada-Y Log-X	0,9421	88,76%
Cuadrado de Y	0,9417	88,69%
Raíz Cuadrada de X	0,9299	86,47%
Multiplicativa	0,9231	85,21%
Raíz Cuadrada Doble	0,9077	82,40%
Lineal	0,8958	80,25%
Cuadrado Doble	0,8879	78,84%
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	0,8841	78,16%
Log probit	0,8840	78,14%
Inversa-Y Log-X	-0,8831	77,99%
Logístico	0,8807	77,56%
Raíz Cuadrada de Y	0,8693	75,57%
Exponencial	0,8417	70,84%
Cuadrado de X	0,8279	68,54%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	0,7951	63,21%
Inversa de Y	-0,7873	61,98%
Log-Y Cuadrado-X	0,7618	58,03%
Inversa-Y Cuadrado-X	-0,6980	48,73%
Inversa-Y Raíz Cuadrada-X	<sin ajuste>	

Anexo 4. Análisis estadístico del modelo de crecimiento de BAL en morcilla.

Análisis de Varianza

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0,0313613	1	0,0313613	197,70	0,0050
Residuo	0,000317263	2	0,000158632		
Total (Corr.)	0,0316786	3			

Coefficiente de Correlación = -0,99498

R-cuadrada = 98,9985 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98,4977 por ciento

Error estándar del est. = 0,0125949

Error absoluto medio = 0,0074057

Estadístico Durbin-Watson = 3,0941 (P=0,8046)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0,631306

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo Y-cuadrada X-inversa para describir la relación entre $\mu_{\text{máx}}$ y Temp. La ecuación del modelo ajustado es

$$\mu_{\text{máx}} = \text{sqrt}(0,404385 - 1,3569/\text{Temp})$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre $\mu_{\text{máx}}$ y Temp con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 98,9985% de la variabilidad en $\mu_{\text{máx}}$. El coeficiente de correlación es igual a -0,99498, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,0125949. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones, seleccionando la opción de Pronósticos del menú de texto.

El error absoluto medio (MAE) de 0,0074057 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es mayor que 0,05, no hay indicación de una autocorrelación serial en los residuos con un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo 5. Comparación de modelos alternos para el crecimiento de BAL en salchicha XL.

<i>Modelo</i>	<i>Correlación</i>	<i>R-Cuadrada</i>
Inversa-Y Log-X	-1,0000	99,99%
Raíz Cuadrada de Y	0,9998	99,96%
Cuadrado Doble	0,9994	99,88%
Exponencial	0,9990	99,80%
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	0,9990	99,79%
Cuadrado de X	0,9979	99,57%
Logístico	0,9977	99,55%
Log probit	0,9976	99,51%
Lineal	0,9968	99,36%
Raíz Cuadrada Doble	0,9939	98,78%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	0,9922	98,45%
Multiplicativa	0,9897	97,95%
Raíz Cuadrada de X	0,9856	97,14%
Cuadrado de Y	0,9839	96,82%
Inversa de Y	-0,9831	96,66%
Log-Y Cuadrado-X	0,9821	96,45%
Doble Inverso	0,9793	95,89%
Raíz Cuadrada-Y Log-X	0,9784	95,73%
Logaritmo de X	0,9645	93,02%
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	0,9641	92,94%
Inversa-Y Cuadrado-X	-0,9464	89,57%
Curva S	-0,9421	88,76%
Cuadrado-Y Log-X	0,9338	87,20%
Raíz Cuadrada-Y Inversa de X	-0,9187	84,41%
Inversa de X	-0,8941	79,94%
Cuadrado-Y Inversa de X	-0,8464	71,63%
Inversa-Y Raíz Cuadrada-X	<sin ajuste>	

Anexo 6. Análisis estadístico del modelo de crecimiento de BAL en salchicha XL.

Análisis de Varianza

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	2,45811	1	2,45811	33065,04	0,0000
Residuo	0,000148684	2	0,0000743418		
Total (Corr.)	2,45826	3			

Coefficiente de Correlación = -0,99997

R-cuadrada = 99,994 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,9909 por ciento

Error estándar del est. = 0,00862217

Error absoluto medio = 0,00510518

Estadístico Durbin-Watson = 2,78321 (P=0,5719)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0,525432

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo Y-inversa log-X para describir la relación entre $\mu_{\text{máx}}$ y Temp. La ecuación del modelo ajustado es

$$\mu_{\text{máx}} = 1/(5,93484 - 1,71883 \cdot \ln(\text{Temp}))$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre $\mu_{\text{máx}}$ y Temp con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99,994% de la variabilidad en $\mu_{\text{máx}}$. El coeficiente de correlación es igual a -0,99997, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,00862217. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones, seleccionando la opción de Pronósticos del menú de texto.

El error absoluto medio (MAE) de 0,00510518 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es mayor que 0,05, no hay indicación de una autocorrelación serial en los residuos con un nivel de confianza del 95,0%.