

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Informe de Práctica de Especialidad



**ANÁLISIS DE MATERIAS PRIMAS Y EVALUACIÓN DE
PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA EN LA COMPAÑÍA
ENLATADORA NACIONAL (CENSA)**

VERNON RODRÍGUEZ JOHNSON

CARTAGO, AGOSTO 2002

ANÁLISIS DE MATERIAS PRIMAS Y EVALUACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA EN LA COMPAÑÍA ENLATADORA NACIONAL (CENSA)[◇]

RESUMEN

Cada día observamos como las industrias ponen especial énfasis en el desarrollo de políticas de calidad, reducción en el uso de insumos y en la conservación del medio ambiente, preocupadas por asegurarles a sus consumidores un producto de gran calidad.

Las pruebas de este documento se en las instalaciones de la Compañía Enlatadora Nacional (CENSA) y tuvo como objetivo determinar la eficiencia de los procedimientos utilizados en la compañía para el aseguramiento de la calidad, durante la elaboración de atún enlatado, de manera que se establezca control en: la recepción de las materias primas, limpieza de las áreas y equipos de producción.

Se utilizaron pruebas rápidas del tipo inmunocromáticas para evaluar la calidad de las materias primas para determinar la ausencia o presencia de *Salmonella* spp y/o *Listeria* sp y de inmunoensayos (ELISA) para determinar la concentración de histamina. Además se realizaron pruebas de omnipresencia de microorganismos en puntos importantes del proceso de enlatado. Se encontró que todas las pruebas inmunocromáticas fueron negativas para los patógenos antes mencionados y que en ninguna de las pruebas ELISA se encontró una concentración de histamina superior a 5 ppm.

En las pruebas de omnipresencia de microorganismos se encontró que la gran mayoría de los sitios muestreados tuvieron una carga bacteriana bastante alta saliéndose de los niveles que determinan a un sitio limpio. Finalmente se determinó que parte de los tanques utilizados en el proceso presentan contaminación por coliformes, constituyendo, un riesgo potencial para la calidad del producto y salud del consumidor.

Palabras Clave: Atún, Histamina, Omnipresencia de microorganismos, ELISA competitivo directo, Placas inmunocromáticas, Análisis sensorial.

[◇] Elaborado por: Vernon Rodríguez Johnson. Informe de Práctica de Especialidad. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2002.

ANÁLISIS DE MATERIAS PRIMAS Y EVALUACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA EN LA COMPAÑÍA ENLATADORA NACIONAL (CENSA)

ABSTRACT

Every day we observed as the industries put special emphasis in the development of quality policies, reduction in the use of supplies and the conservation of the environment, worried to assure to its consumers a product to them great quality.

The tests of this document in the facilities of Compañía Enlatadora Nacional (CENSA) and had like objective to determine the efficiency of the procedures used in the company for the securing of the quality, during the processing of tinned tuna, so that control settles down in: the reception of the raw materials, cleaning of the areas and equipment of production.

Fast tests of the type were used immunochromatic to evaluate the quality of the raw materials to determine the absence or presence of *Salmonella* spp and/or *Listeria* sp and *immuno-sorbent assay* (ELISA) to determine the histamine concentration. In addition tests of omnipresence of microorganisms were made in important points of the canning process.

One was that all the immunochromatics tests were negative for the pathogens before mentioned and that in no of tests ELISA was a concentration of 5 histamina superior to ppm.

In the tests of omnipresence of microorganisms one was that the great majority of the sampled sites had a bacterial load enough discharge leaving the levels that determine to a clean site. Finally one determined that it leaves from the tanks used in the process present/display contamination by coliformes, constituting, a potential risk for the quality of the product and health of the consumer.

Key Words: Tuna, Histamine, omnipresence of microorganisms, direct competitive ELISA, immunochromatics plates, sensorial analysis.

**ANÁLISIS DE MATERIAS PRIMAS Y EVALUACIÓN DE
PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA EN LA COMPAÑÍA
ENLATADORA NACIONAL (CENSA)**

Informe presentado a la Escuela de Biología del

Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial

para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Miembros del Tribunal

Dra. Virginia Montero M.Q.
Profesora guía

Lic. José Prudente Reyes
Representante de CENSA

Ph. D Miguel Rojas
Lector

DEDICATORIA

**A la Santísima Trinidad
Por darme la oportunidad de vivir, amar y servir.**

**A mi hijo Johan
Cuya existencia le ha dado luz y alegría a mi vida.**

**A Judith
Por su apoyo, paciencia y comprensión.**

**A mi madre.
Por ser fuente inspiradora de esfuerzo y compromiso.**

**A mi padre
Quien a pesar de estar tan lejos, siempre estuvo cerca.**

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que durante todo este tiempo me han ayudado de muy distintas maneras:

A mi hermana, tíos y primos, pues gracias a su apoyo moral y económico pude recorrer este camino.

A los profesores Virginia Montero y Miguel Rojas, por su comprensión, tolerancia y consejos, pues gracias a su ayuda descubrí hacia adonde ir.

A la Compañía Enlatadora Nacional. por convertirse en un aula más en mi carrera, y muy especialmente al Gerente de Aseguramiento de Calidad Danny Prudente por sus consejos sugerencias y aportes para la realización de este trabajo. A Francisco, Gerente de Planta, por darme su confianza y amistad.

A *"los mismos de siempre"* . por darme su amistad sincera y hacer más grata mi estancia en Cartago.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	i
Abstract	ii
Acreditación	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice General	vi
Índice de Tablas	viii
Índice de Figuras	ix
Índice de Anexos	x
Introducción	11
Marco Teórico	12
<i>Refrigeración y Congelación</i>	19
<i>Cambios Autolíticos Durante el Almacenamiento en Congelación</i>	21
<i>Envases</i>	24
<i>Tratamiento Térmico</i>	27
<i>Alteraciones en el Producto Enlatado</i>	28
✧ Alteraciones Biológicas o Microbianas	31
✧ Alteración Química.....	33
✧ Alteraciones físicas.....	33
<i>Factores que Alteran la Calidad de los Enlatados</i>	34
✧ Contaminación por <i>Clostridium botulinum</i>	34
✧ Contaminación por Histamina.....	36
✧ Rancidez	38
✧ Formación de trimetilamina (TMA).....	38
<i>Etapas del Proceso de Enlatado</i>	39

Objetivos.....	41
<i>Objetivo General</i>	<i>41</i>
<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>41</i>
Materiales y Métodos.....	42
<i>Prueba de Histamina</i>	<i>42</i>
<i>Análisis de Salmonella sp.....</i>	<i>45</i>
<i>Determinación de la Concentración de Sal en el Atún Entero</i>	<i>48</i>
<i>Análisis Microbiológicos y Químico para Aguas de Uso industrial</i>	<i>49</i>
<i>Análisis Sensorial y Físico del Producto Terminado</i>	<i>50</i>
<i>Pruebas de Omnipresencia de Microorganismos.....</i>	<i>52</i>
Resultados	55
<i>Prueba de Histamina</i>	<i>55</i>
<i>Análisis de Salmonella sp.....</i>	<i>56</i>
<i>Pruebas de identificación de Listeria sp.....</i>	<i>57</i>
<i>Prueba de Concentración de Sal en la Materia Prima</i>	<i>58</i>
<i>Análisis Sensorial y Físico del Producto Terminado</i>	<i>58</i>
<i>Análisis Microbiológico del Agua de Uso Industrial.....</i>	<i>60</i>
<i>Análisis Microbiológicos</i>	<i>60</i>
<i>Pruebas de Omnipresencia.....</i>	<i>61</i>
✧ <i>Pruebas utilizando el Método de Contacto Directo:</i>	<i>62</i>
✧ <i>Pruebas utilizando el Método de Control Ambiental</i>	<i>63</i>
✧ <i>Pruebas utilizando el Método del Hisopo (Quick Swab)</i>	<i>65</i>
Discusión.....	67
<i>Concentración de Histamina.....</i>	<i>67</i>
<i>Análisis de Salmonella y Listeria</i>	<i>73</i>
<i>Análisis Sensorial al Producto Terminado</i>	<i>75</i>
<i>Concentración de Sal en la Materia Prima</i>	<i>78</i>
<i>Análisis Microbiológicos Para Aguas de Uso Industrial.....</i>	<i>79</i>
Conclusiones y Recomendaciones	87
Anexos	91
Bibliografía	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Productos de degradación final obtenidos durante la fase de post mortem en el pescado.	16
Tabla 2. Resumen de los cambios autolíticos en el pescado enfriado. ..	23
Tabla 3. Absorbancia y concentración de histamina en cuatro diferentes pruebas realizadas a la materia prima para la producción de atún enlatado en CENSA.	55
Tabla 4. Parámetros de control para el análisis cuantitativo y cualitativo durante el análisis sensorial y físico del producto terminado.	59
Tabla 5. Resultados del análisis microbiológico de tres tanques de almacenamiento de agua.	60
Tabla 6. Prueba de Omnipresencia de Microorganismos en diferentes áreas del proceso de enlatado de atún en la Compañía Enlatadora Nacional, Puntarenas.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la flora bacteriana en el atún.	17
Figura 2. Efecto de la neurotoxina producida por <i>Clostridium botulinum</i>	35
Figura 3. Resultado del test rápido inmuno-cromático Reveal® para <i>Salmonella spp</i> en las cuatro pruebas realizadas en CENSA.	57
Figura 4. Resultado del test rápido inmunocromático Reveal® para <i>Listeria sp</i> en cada una de las pruebas.....	57
Figura 5. Determinación de concentración de sal en la materia prima.	58
Figura 6. Pruebas de Omnipresencia por el método de contacto directo.	62
Figura 7. Pruebas de Omnipresencia por el método control ambiental.	64
Figura 8. Pruebas de Omnipresencia por el método Quick Swab.	65
Figura 9. Coloraciones de los controles para la determinación de la concentración de histamina.....	67
Figura 10. Pozos de microtitulación.....	68
Figura 11. Método ELISA directo competitivo.....	69
Figura 12. Descripción de los componentes que forman parte de una placa de ensayo inmunocromático.....	74

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de Flujo para la Elaboración de Atún Enlatado.	92
Anexo 2. Metodología de la prueba Veratox® para Histamina	93
Anexo 3. Metodología de las Pruebas con Placas Inmunocromáticas	94
Anexo 4. Medios de Enriquecimiento Selectivo	95
Anexo 5 Análisis Sensorial y Físico: calificación por deducción por puntos.....	97
Anexo 6 Pruebas de Omnipresencia de Microorganismos en el área de procesado de atún en la Compañía Enlatadora Nacional S.A.	98
Anexo 7. Condiciones que permiten determinar la posible causa de deterioro en enlatados.....	101
Anexo 8. Criterios para la evaluación organoléptica de la calidad del atún fresco.	103

INTRODUCCIÓN

Cada día vemos como las empresas pertenecientes a la industria alimenticia ponen especial énfasis en el desarrollo de políticas de calidad y de reducción en el uso de insumos así como en la conservación del medio ambiente, terminando así con aquellos tiempos en que las empresas se regían según los términos de la administración Tayloriana, en donde se proponía un desarrollo empresarial que anteponía la calidad ante la productividad.

Lee (1999) manifiesta que las empresas se han visto en la necesidad de “*cambiar con el tiempo*” pues la competencia por los mercados globales es más intensa y los consumidores buscan productos que no solo satisfagan sus necesidades, sino que también le den la certeza de que reciben un alimento preparado en óptimas condiciones y bajo procedimientos estándar.

En este momento, es donde el término de *Aseguramiento de la Calidad* surge para que se inicie un proceso de normalización que tendrá como objetivo de controlar el producto, desde las materias primas hasta su distribución.

Es por eso que se hace necesario contar con protocolos orientados a comprobar que las materias primas recibidas en la empresa no presentan organismos patógenos o compuestos causantes de alteración. Asimismo se deben de optimizar y normalizar eficientemente los procedimientos de limpieza y desinfección de las áreas y equipos involucrados en la producción.

Teniendo en cuenta lo anterior, la Compañía Enlatadora Nacional S.A ha buscado la manera de realizar pruebas a las materias primas al ser recibidas en la compañía durante la descarga. Además de elaborar un documento en donde se especifiquen los procedimientos de limpieza y desinfección en la empresa.

El presente trabajo se orienta hacia la evaluación de la eficiencia de los procedimientos de limpieza desarrollados actualmente en la empresa. Asimismo se realizaron pruebas a las materias primas para garantizar el cumplimiento de los parámetros establecidos para organismos patógenos como *Salmonella* sp, *Listeria* sp y demás componentes que causan alteración entre los que se destaca la histamina.

MARCO TEÓRICO

El pescado como alimento, constituye una de las principales fuentes de proteínas de alta calidad que requiere el hombre para su alimentación. No sólo proporciona una amplia variedad de productos alimenticios para uso humano, sino que se utiliza en gran escala en la alimentación animal, para la obtención de productos de valor medicinal y de otros productos técnicos. (FERNANDEZ et al, 1991)

Las tribus de la familia Escombridae, entre las que se mencionan Thunnini, Sardini, Escomberomorini y Escombrini, se destacan por ser muy importantes dentro de la industria alimentaria, más específicamente relacionadas con la elaboración de productos enlatados. De las tribus anteriormente mencionadas es la Thunnini la que se encuentra en la vanguardia en lo que ha pescado procesado se refiere. El atún, nombre común con el que se engloban varios géneros de la tribu Thunnini, es quizás el más representativo dentro de la industria alimentaria en la producción de enlatados de pescado. (JOSEPH et al, 1993)

Este pescado es considerado un "nómada del mar" por sus grandes migraciones a través del año y por su amplia distribución por casi todos los mares del planeta, tanto en aguas tropicales como templadas. Gracias a esta característica de migrar por casi todo el planeta, el atún se encuentra entre los alimentos de mayor consumo, pesca y elaboración de productos relacionados a nivel mundial. (LASSEN, 1989)

Los atunes son capturados por barcos atuneros, dichas capturas se llevan a cabo en cerca de 70 países costeros e islas en el mundo. Sin embargo el 50% de las capturas se concentran en dos países: Japón y USA. (JOSEPH et al, 1993)

Algunas de las especies principales del atún y su distribución son las siguientes[◇]:

- **Bluefin (*Thunnus thynnus var. macoyii*):** se distribuye principalmente en aguas subtropicales y templadas del Pacífico norte. En el Pacífico oeste presentándose también en el norte de Nueva Zelanda, en el este de Australia.

[◇] JOSEPH, J; KLAWE, W; MURPHY, P. 1993. **Tuna and Billfish**. Inter-american tropical Tuna Commission. Lajolla, California. 46 p.

- **Yellowfin (*Thunnus albacares*):** se encuentra presente en aguas tropicales y subtropicales de la India. Además puede ser encontrado tanto en el océano Pacífico como en el Atlántico.
- **Skipjack o Barrilete (*Katsuwonus pelamis*):** es un pescado de una amplia distribución y grandes migraciones. Su comportamiento es bastante cosmopolita en aguas calientes. Únicamente se encuentra ausente en el mar Negro.
- **Bigeye (*Thunnus obesus*):** se encuentra en aguas calientes de la India y en los océanos Pacífico y Atlántico.
- **Albacora (*Thunnus alalunga*):** se distribuye en aguas templadas, tropicales y subtropicales de todos los océanos incluyendo el mar Mediterráneo. Este pez es el más exquisito, sin embargo su captura en zonas tropicales es difícil debido a que no viaja en cardúmenes muy grandes, viaja en pequeños grupos.

El pescado tras su muerte y durante su posterior almacenamiento pasa claramente por cuatro fases de deterioro, independiente de la temperatura de refrigeración a la que se trabaje:

- **Pre-rigor**, en la cual el pescado presenta unas características sensoriales externas máximas, destacando su textura firme y elástica. Comienzan los procesos autolíticos de alteración entre los que se pueden mencionar el cese de la circulación y de la respiración aeróbica. Además se observa excitabilidad muscular, contracciones fibrilares, sarcómeros relajados. Actina y miosina se encuentran libres por lo que el músculo es elástico. Se tiene un pH cercano a 7. (REDVY, 2001)
- **Rigor mortis**, durante la cual el pescado presenta el cuerpo totalmente rígido y duro; es el mejor síntoma de frescura. La dureza del pescado se debe al inicio de los procesos de respiración anaeróbica en los que el glucógeno pasa a ácido láctico. Continúan los procesos autolíticos del deterioro al entrar en acción las catepsinas, enzimas endógenas del músculo del pescado. Algunos sarcómeros empiezan a contraerse, se produce una formación irreversible de actomiosina y el pH desciende aproximadamente a 6. (REDVY, 2001)

- **Post-rigor**, cuando la carne del pescado se halla flácida, ligeramente firme pero con una clara pérdida de elasticidad. Aunque las características externas no son las adecuadas, el pescado aún no presenta sensaciones desagradables (sobre todo de olor). Comienza el deterioro bacteriano. Se da un proceso enzimático sobre los aminoácidos hasta llegar a sus productos finales de degradación (Tabla 1).
- **Alteración**. El deterioro bacteriano ya es evidente, presentando el pescado una carne más blanda y olor desagradable. Los sarcómeros se desintegran y se da la ruptura del colágeno. El pH vuelve a ascender a 7. Las enzimas endógenas (catepsinas, proteinasas y colagenasas) terminan con los procesos de descomposición. (LEE, 1999)

Como se ha mencionado antes, los peces, una vez sacados del agua pasan a la rigidez cadavérica o *rigor mortis* que obedece a una transformación de origen enzimático del glucógeno, que pasa a ácido láctico. Peces que sufren stress prolongado, durante la pesca de arrastre, entran en rigidez rápidamente, lo que influye directamente en el tiempo de conservación. Esto porque la rigidez cadavérica opone -gracias a un descenso del pH y de la contracción de la musculatura del pescado- cierta resistencia a la proliferación bacteriana, por esta razón se deben de dirigir esfuerzos para que la rigidez cadavérica logre prolongarse el mayor tiempo posible. (JAY, 1996)

Esta rigidez cadavérica se logra alargar y con ello se puede alcanzar un período más prolongado de conservación, manipulando el pescado de manera especial mediante las siguientes actividades:

- Realizando el sacrificio del pescado inmediatamente después de la captura.
- Reduciendo el tiempo de la pesca de arrastre (no más de 2h)
- Practicando una refrigeración (inhibición de la acción enzimática).

Se ha determinado que una vez sacado del agua el atún se mantiene a una temperatura entre los 16-22 °C, dando lugar a la aparición del *rigor mortis* entre 1-1.5 horas y presenta una duración de 14-20 horas. (BURNS, 1994)

Si el pescado se guarda en hielo, se retrasa de 1-3 horas la aparición de la rigidez en relación con el pescado depositado al aire. La desaparición de la rigidez esta acompañada por un reblandamiento de la musculatura por acción enzimática. (FERNANDEZ et al, 1991)

El atún recién capturado tiene una superficie brillante, iridiscente, el cuerpo está cubierto por una capa delgada, casi transparente y uniformemente extendida de mucosidad; los ojos son brillantes y saltones, las pupilas negras y las córneas transparentes; las agallas son claras y exentas de mucosidad. El olor del pescado fresco sin grasa se describe muy frecuentemente como "olor a mar"; el pescado graso tiene un olor agradable parecido a la margarina. Aunque su carne es blanca y flácida después de la captura, tan pronto como aparece el *rigor mortis* se hace firme. (REDVY, 2001)

Asimismo hay que tener especial cuidado y observar claramente las características organolépticas que presenta el pescado antes de llevarlo al proceso, por lo que se le debe de poner especial atención al momento en que el pescado empieza a cambiar de aspecto. (GARCÍA, 1992)

Las alteraciones en las características del pescado recién capturado empiezan a ocurrir hacia el final del *rigor mortis* si este no ha sido iniciado en un proceso que permita la conservación del pescado (RACCACH, 1989). Algunas de estas señales son:

- La superficie pierde su brillo y olor claros y comienza a cubrirse de una mucosidad más espesa.
- La mucosidad se espesa y se enturbia, adquiere entonces un color amarillo o pardo.
- Los ojos se hunden y encogen gradualmente, las pupilas se ponen turbias y lechosas y las córneas se ponen opacas.
- Las agallas al principio adquieren un color blanquecino y posteriormente un color grisáceo.

- La carne se ablanda gradualmente hasta que se pueda arrancar con facilidad de la espina dorsal. Al apretarla, exuda, un jugo y su brillo translúcido original cambia adquiriendo un aspecto lechoso.
- A lo largo de la espina dorsal, una decoloración pardo rojiza se va extendiendo en la carne desde los vasos sanguíneos.

Si la retención continúa el olor a pescado fresco cambia. Al principio es un olor dulzón, después adquiere un olor similar al amoníaco, predominando el conocido "olor a pescado" y finalmente aparecen los olores ya conocidos de putrefacción (Tabla 1). (FERNANDEZ et al, 1991)

Tabla 1. Productos de degradación final obtenidos durante la fase de post mortem en el pescado.

Sustrato	Producto Final de Degradación
<i>Carbohidratos</i>	CO ₂ + H ₂ O
<i>Óxido de trimetilamina (OTMA)</i>	TMA: Trimetilamina (olor a pescado)
<i>Cisteína</i>	Ácido Sulfhídrico (H ₂ S)
<i>Meticono</i>	Metil mercapto –Dimetil sulfhídrico
<i>Histidina</i>	Histamina
<i>Arginina</i>	Ornitina – putrefacción
<i>Urea</i>	Amoniaco (olor a orina)

Las bacterias siempre son responsables de la descomposición, estas se encuentran en grandes cantidades en el pescado específicamente viven en la mucosidad de la piel en las branquias y en el canal intestinal. (FERNANDEZ et al, 1991)

Después de la muerte de los pescados, los mecanismos reguladores que previenen la invasión de los tejidos por las bacterias, cesan de funcionar y en corto tiempo se pueden apreciar microorganismos en algunos tejidos (FERNANDEZ, 1993). El tejido muscular de los peces sanos es estéril y su contaminación se efectúa una vez muertos desde las branquias, del sistema vascular y directamente a través de la piel (Figura 1).

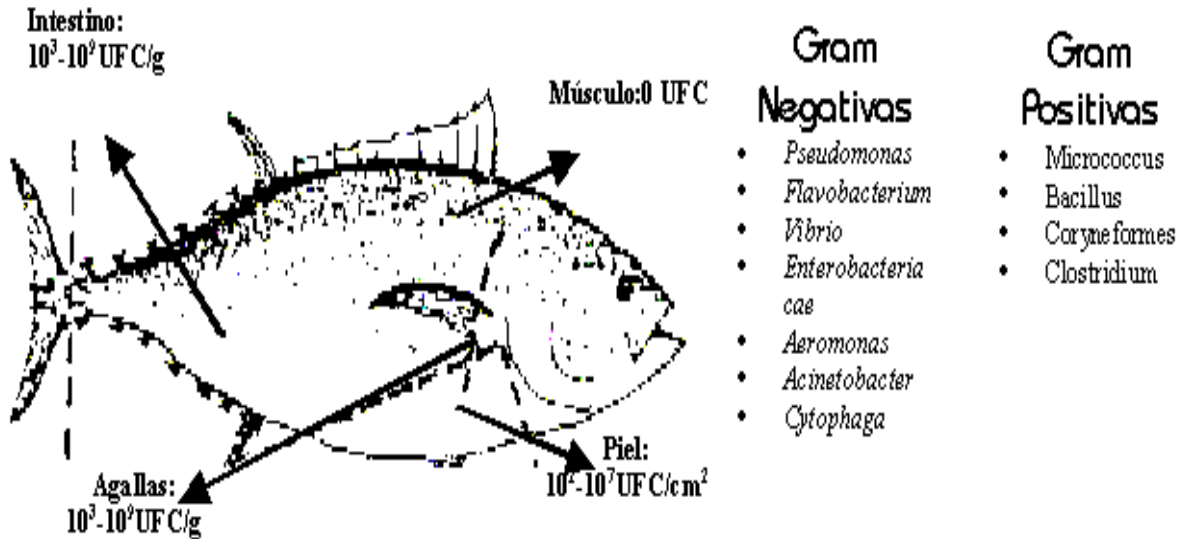


Figura 1. Distribución de la flora bacteriana en el atún. El número total de $10^2 - 10^7$ UFC/cm² se establece como rango normal en la superficie de la piel. Las branquias e intestinos contienen entre 10^3 y 10^9 UFC/g. Nótese como el músculo o carne, parte del atún de interés comercial se mantiene estéril, su contaminación se deberá a la transferencia de microorganismos de los demás tejidos del atún. Al lado derecho se detallan algunos géneros de bacterias encontrados en exámenes microbiológicos realizados a las diferentes estructuras del atún.

La acción bacteriana trae como consecuencia el desdoblamiento de las proteínas, una alteración del olor y el color producto de la difusión por los tejidos del pescado de sustancias producidas por las bacterias.

El pudrimiento tiene gran importancia en la industria alimentaria, ya que el desarrollo de este proceso en cualquier alimento lo hace no apto para el consumo y extraordinariamente dañino para la industria. La putrefacción es un complicado proceso bioquímico de descomposición de las sustancias proteicas bajo la acción de las enzimas proteolíticas de los microorganismos putrefactivos hasta NH_3 y CO_2 como principales productos. (FERNANDEZ, 1993)

La putrefacción puede ser aeróbica o anaeróbica. La putrefacción aeróbica se realiza en presencia de oxígeno libre del aire y es un proceso que se caracteriza por ser mucho más completa la descomposición. Aquí no aparecen las sustancias intermedias tales como indol, el estacol, ácidos grasos y generalmente se obtienen al final del proceso H_2O , H_2 , NH_2 , N_2 y CO_2 . Entre los microorganismos que ocasionan este proceso esta el *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. (MADIGAN, et. al. 1998)

La putrefacción anaeróbica es la que se realiza en ausencia de oxígeno libre y se caracteriza el proceso por una amplia producción de sustancias intermedias, principalmente malolientes y algunas tóxicas, aunque siempre aparecen NH_2 y CO_2 .

Entre los microorganismos que producen este proceso tenemos el *Clostridium sporogenes* y *Clostridium botulinum*.

El pescado requiere, entonces, de un método que permita la conservación de las condiciones organolépticas, es por eso que se recurre a la refrigeración y congelación como métodos para mantener el pescado en buen estado. (JAY, 1996)

Sin embargo, debe destacarse que muchos microorganismos no mueren ni a las temperaturas más bajas, utilizadas prácticamente para la conservación en frío, por lo que comienzan a multiplicarse en cuanto los alimentos vuelven a alcanzar temperaturas superiores. (RACCACH, 1989)

Esta característica de las bacterias es de gran importancia ya que la totalidad de la invasión bacteriana se origina mediante contaminaciones secundarias que se producen durante la manipulación y transporte del pescado a bordo del barco atunero donde penetran grandes cantidades de distintas especies bacterianas. (GARCÍA, 1992)

Las bacterias presentes en el medio que circunda a los peces generalmente son gérmenes psicrófilos de distintos géneros (*Pseudomonas* y *Achromobacter*) estos crecen mejor entre 14° a 20°C , pero pueden crecer lentamente en o sobre alimentos a temperaturas de refrigeración de 4°C . Debido a esta capacidad son llamadas psicro (frío) tróficos (que crecen). Ninguna de estas bacterias, excepto *C. botulinum* tipo E, es de importancia en los alimentos enlatados. (FERNANDEZ, 1989). Las bacterias psicrófilas existentes en el agua son en su mayor parte bacilos gramnegativos móviles y de crecimiento aerobio así como algunos grampositivos y bacilos finos. (MADIGAN, et. al. 1998)

Refrigeración y Congelación

Se entiende por refrigeración del pescado el proceso mediante el cual la temperatura de este organismo desciende hasta un punto inferior, próximo al de congelación (varía entre 0.6 y – 2 °C) (BURNS, 1994)

El enfriamiento se debe fundamentalmente al agua de fusión del hielo que fluye sobre la superficie del pescado. La temperatura del agua de fusión se eleva ligeramente a medida que fluye sobre el pescado, pero si existe suficiente hielo entre el pescado el agua se enfría y funde más hielo. Además el flujo de agua de fusión también produce un lavado por arrastre del limo bacteriano, de los productos resultantes de la alteración y de la sangre remanente, contribuyendo así a conservar el aspecto y olor del pescado. Por lo que es importante asegurar que el agua de fusión drene libremente y evitar la inmersión del pescado en agua sucia. (REDVY, 2001)

Existen diferentes formas o tipos de hielo que se ajustan a la posterior conservación del pescado. Algunos de los tipos de hielo más importantes se citan a continuación:[◇]

- **Troceado:** tiene el inconveniente de que al fundirse deja espacios libres entre el pescado por lo que el enfriamiento es más lento.
- **Escamas:** no produce estos espacios se pone una capa sobre otra.
- **Germicidas:** se vienen utilizando en algunos países con el fin de disminuir la población bacteriana utilizando ácido bórico y acético, el ozono, cloro, fenol y antibióticos.
- **Hielo y sal:** busca un enfriamiento más rápido.
- **Hielo y aire:** se mantiene temperatura ideal de 2-3 °C lo que facilita la lenta difusión del hielo y permite mantener el pescado en un ambiente húmedo se conserva mejor.

[◇] FERNANDEZ, P.R.; GONZÁLEZ, R. 1991. **Estudio y procesamiento de los peces**. Ciudad de la Habana, Cuba. Editorial Pueblo y Educación. 208 p.

- **Refrigeración por inmersión en un medio líquido:** este sistema enfría más rápidamente se puede conseguir una temperatura de 2-3 °C presenta el inconveniente de que hay mayor penetración de sal en los tejidos. No comprimen el pescado.

Por otra parte, La *congelación del pescado* es el proceso durante el cual la temperatura inicial del organismo desciende por debajo del punto de congelación en todos sus puntos, la finalidad de congelar el pescado, tanto fresco como procesado, consiste en obtener un producto que pueda almacenarse por unos meses y que luego de congelado haya cambiado en absoluto a consecuencia del proceso, de forma que el pescado fresco debidamente congelado, almacenado y descongelado es virtualmente indistinguible del pescado fresco mantenido en hielo. El pescado a congelar debe tener un alto grado de frescura, debe de congelarse antes de que se produzca el *rigor mortis* o mientras transcurre este estado, el pescado no fresco posee una vida como alimento bastante limitada y se altera rápidamente cuando se congela y almacena en frío incluso al principio puede parecer comestible, en el momento que llega al consumidor puede ser inaceptable. (LASSEN, 1989)

El agua del pescado se encuentra estructuralmente en los músculos de la carne de mamíferos. Su alto contenido de sustancias nutritivas favorece el crecimiento de microorganismos y en consecuencia, su deterioro. (FERNANDEZ, 1989)

En un músculo de pescado que se ha enfriado rápidamente desde 0 a -5 °C se forman pequeños cristales de hielo dentro de la estructura de las células filiformes microscópicas de la carne. Y si la temperatura se mantiene dentro de la zona crítica mucho tiempo se forman cristales mucho más grandes alterándose la estructura del músculo. (LEE, 1999)

Cuando los peces están en período de puesta, la grasa de los depósitos de reserva se moviliza, aumentando proporcionalmente en el músculo blanco fenómeno no desfavorable en la conservación frigorífica. La grasa es triglicérida (96 %) y son pobres en fosfolípidos. (GARCÍA, 1992)

Congelación por salmuera: salmuera se mantiene en contacto directo con el pescado, solo se usa una solución de NaCl.

La sal tiene propiedades bactericidas y bacteriostáticas, esta última se refiere a que inhibe el crecimiento y desarrollo de los microorganismos al tener la capacidad de extraer el agua por difusión y ósmosis de las células fibrilares del músculo del pescado. La propiedad bactericida se refiere a la capacidad de la sal de eliminar los microorganismos debido a que disminuye la solubilidad del oxígeno en el agua eliminando la posibilidad del desarrollo de bacterias aerobias, además de que produce la plasmólisis de la célula bacteriana, al estar en este estado los procesos de alimentación no se producen por lo que la célula se ve imposibilitada de realizar sus funciones normales.

Cambios Autolíticos Durante el Almacenamiento en Congelación

Sin embargo a pesar de todos los esfuerzos que se hacen para conservar al máximo el pescado y de limitar las reacciones que llevan a su deterioro durante el almacenamiento en cámaras de congelación, la alteración siempre se lleva a cabo. La reducción del óxido de trimetilamina (OTMA), un compuesto osmorregulatorio presente en atún se debe usualmente a la acción bacteriana, sin embargo se ha comprobado que también presentan una enzima en el tejido muscular capaz de descomponer el OTMA en trimetilamina (TMA) y formaldehído (FA). (REDVY, 2001)

El formaldehído induce el entrecruzamiento de las proteínas musculares ocasionando endurecimiento del músculo y pérdida de su capacidad para enlazar agua. La enzima responsable del endurecimiento inducido por el formaldehído es la OTMA-asa, o OTMA trimetilasa. La mayoría de las enzimas OTMA trimetilasas reportadas hasta ahora están unidas a la membrana y se toman más activas cuando el tejido de la membrana es roto por la congelación. (REDVY, 2001)

El músculo oscuro (rojo) presenta una mayor tasa de actividad que el músculo blanco, mientras otros tejidos como el riñón, el bazo y la vesícula biliar son extremadamente ricos de la enzima. Además, se ha demostrado que la cantidad de endurecimiento inducido por el formaldehído se intensifica por el abuso físico durante la captura, antes de la congelación, y por las fluctuaciones de la temperatura durante el almacenamiento en congelación. El medio más práctico para prevenir la producción autolítica de formaldehído es almacenando el pescado a temperaturas $<-30^{\circ}\text{C}$, a fin de minimizar las fluctuaciones de temperatura en el almacenamiento, y evitando la manipulación tosca o la aplicación de presión física sobre el pescado antes del congelamiento. (BERTULLO, 1990)

Existen numerosos cambios autolíticos que afectan la comestibilidad del pescado fresco y congelado, siendo la desorganización física de las células musculares el factor de mayor influencia en la autólisis, por lo que se han propuesto mecanismos que contribuyan en la prevención o inhibición de estos cambios. (Tabla 2)

Tabla 2. Resumen de los cambios autolíticos en el pescado enfriado.

Enzima (s)	Sustrato	Cambios encontrados	Prevención/Inhibición
Enzimas glucolíticas	glucógeno	Producción de ácido láctico, disminución del pH de los tejidos, pérdida de la capacidad de enlazar agua en el músculo. Altas temperaturas durante el rigor pueden ocasionar "desgajamiento"	El pescado debe pasar por la etapa de rigor a temperaturas lo más cercanas a 0 °C. Debe evitarse el agotamiento (estrés) pre-rigor
Enzimas autolíticas, (degradación de nucleótidos)	ATP ADP AMP	Pérdida del sabor a pescado fresco, producción gradual del sabor amargo (estados finales)	Igual que el anterior La manipulación inadecuada acelera la degradación
Catepsinas	proteínas, péptidos	Ablandamiento del tejido dificultando o impidiendo su procesamiento	La manipulación inadecuada el almacenamiento y la descarga
Quimotripsina, tripsina, carboxipeptidasas	proteínas, péptidos	Autólisis de la cavidad visceral en pelágicos (estallido de vientre)	El problema se agrava por congelación/descongelación y el almacenamiento en frío prolongado
Calpaína	proteínas miofibrilares	Ablandamiento, ablandamiento inducido por muda en crustáceos	¿remover del calcio para prevenir la activación?
Colagenasas	tejido conectivo	"desgajamiento" de filetes ablandamiento	La degradación del tejido conectivo está relacionada con el tiempo y temperatura de almacenamiento en refrigeración
OTMA trimetilasa	OTMA	Endurecimiento inducido por formaldehído	Temperatura de almacenamiento del pescado <30 °C Abuso físico y la congelación/descongelación aceleran el endurecimiento

Penetración de Sal: la penetración de sal, ocurre como resultado de la diferencia de salinidad del atún (0.25% en pescado vivo) y la del agua de mar o del contenedor de almacenamiento en el barco atunero dependiendo del método empleado. La absorción de sal se produce cuando el pescado está metido en una solución de mayor salinidad, sin importar el estado de congelación de la carne. La penetración de sal aumenta significativamente cuando: (1) se incrementa la temperatura, (2) se incrementa la salinidad del contenedor de almacenamiento en el barco, (3) se disminuye la cantidad de agua congelada en el pescado y (4) al producirse cualquier raspadura o corte en la piel del pescado.

La absorción de sal es reducida dramáticamente cuando el tejido muscular está congelado, ya que el congelado reduce la cantidad de agua sin congelar en la carne y la sal no puede diluirse rápidamente en el hielo. La piel del atún constituye una barrera en contra de la sal, su rotura permite a la sal entrar en la carne mucho más aprisa.

Envases

Los envases constituyen un factor de gran importancia en la producción de carnes enlatadas, actualmente dichos envases son de hojalata con una capa de estaño depositada electrolíticamente. La hojalata, sea electrolítica o de inmersión en agua caliente, debe protegerse con barniz (LEE, 1999). Entre los factores que favorecen la corrosión de los envases se deben citar los siguientes:

- El potencial de hidrógeno (pH) del producto (nivel de acidez).
- Azufre en el producto enlatado.
- Presencia de sustancias capaces de fijar estaño.
- Almacenaje a altas temperaturas.
- Presencia de oxígeno y de agentes oxidantes.

Cuando las latas se ven afectadas por oxidación, sulfuración o disolución del estaño se puede usar barniz para cubrir el daño. Entre las características que debe de poseer este barniz para poder ser usado en la protección de las latas están:

- Ser adherente.
- Elasticidad para resistir los esfuerzos mecánicos.
- Poseer buena resistencia.
- Debe resistir muy bien el contacto prolongado con los componentes.
- Sin sustancias tóxicas.
- No debe dar sabor, ni color al producto.

La preservación segura de los alimentos al ser enlatados depende del logro de tres condiciones (GARCÍA, 1992):

La aplicación de calor al producto, separadamente o en el envase, al grado necesario para garantizar la seguridad del consumidor y la esterilidad comercial del producto.

La utilización de un cierre del envase que evite el reingreso de microorganismos al producto térmicamente procesado.

El uso de procedimientos de manejo post-proceso que protejan la integridad del envase sellado y procesado.

La primera condición se logra utilizando procesos térmicos que varían en severidad, desde un tratamiento de calor leve que destruye solamente a aquellos organismos que tienen resistencia baja al calor, hasta los de la autoclave, capaces de matar todos los organismos en el producto.

Se han desarrollado procesos térmicos que evitan deterioro en el producto enlatado, si éste es tratado y almacenado de acuerdo con las condiciones consideradas normales para cada producto en particular.

El logro de la segunda condición - sellado del envase – va a depender del cierre de la lata, mientras que la tercera condición, protección de la integridad del sello hermético del envase, depende del manejo que reciben los envases durante las operaciones que lo transportan hacia y desde los procedimientos de llenado, sellado y procesamiento.

El objetivo primordial del tratamiento térmico de los alimentos en general y específicamente del pescado, es asegurar la destrucción de los microorganismos vivos capaces de deteriorar o perjudicar la salud del consumidor. Es necesario para mantener las cualidades organolépticas y nutritivas ajustar la intensidad y duración del tratamiento térmico.

Desde el punto de vista teórico el tratamiento térmico empleado para los productos marinos es suficiente para destruir todos los microorganismos excepto los termófilos, de manera que probablemente también sobrevivan algunas especies aerobias esporuladas mesófilas. Sin embargo en condiciones normales de almacenamiento los microorganismos esporulados que sobreviven a un tratamiento comercial adecuado son incapaces de desarrollarse lo cual nos lleva al término de *esterilidad comercial* para indicar la condición bacteriológica de los alimentos enlatados no estériles pero en condiciones de venta por lo que los productos enlatados comerciales estériles pueden definirse como alimentos que han sido tratados de modo tal que, bajo condiciones habituales de almacenamiento, no se alteran ni presentan peligro alguno para la salud del consumidor. Esta definición representa la norma bacteriológica mínima desde el punto de vista de salud pública y requiere para todos los productos enlatados marinos un tratamiento térmico capaz de destruir las esporas de *Clostridium botulinum*. Sus esporas sobreviven aún cuando son calentadas en una suspensión de aceite. Ya que la aniquilación de bacterias y esporas en un ambiente grasoso se asemeja a condiciones de esterilización con calor seco que requiere mayores temperaturas y un tiempo más prolongado. (FERNANDEZ *et al*, 1991)

Los productos enlatados tales como trozos en aceite o tomate se calientan por medio de convección lenta de manera que es muy importante la proporción sólido-líquido, o sea, pescado caldo. En general se está practicando en estos casos llenar las latas con un 70% de carne y un 30% de caldo; esto asegura una convección satisfactoria del calor en las latas. Convección significa la transferencia a través de un cuerpo de sustancias calentadas. (FERNANDEZ, 1993)

La penetración del calor en los envases esta sujeta a la influencia que se ejerce sobre los siguientes dos elementos: relación producto-envase y tratamiento térmico.

La *relación producto-envase* esta determinada por los siguientes factores: Influencia del volumen y forma del envase, influencia de la materia componente del envase e influencia de la consistencia del producto enlatado.

Por su parte el *tratamiento térmico* está determinado por: la temperatura inicial del producto y autoclave y por los sistemas de calentamiento y temperatura del autoclave.

A continuación se detallarán cada uno de los anteriores elementos que ejercen influencia en la penetración de calor:

Envase Y Producto[◇]

Influencia volumen y forma envase: la distancia del centro a la superficie del recipiente aumenta a medida que aumentan las dimensiones de este, de modo que el volumen del envase influye en el tiempo para alcanzar la temperatura necesaria de esterilización. En latas de igual volumen pero de diferentes formas requieren de distintos tiempos para la penetración del calor hasta el centro, porque varía la relación entre la superficie transmitente y el volumen. El calor penetra más intensamente desde las superficies planas del envase, de manera que para las latas cilíndricas la mayor penetración de calor se concentrará en los dos fondos de la lata.

Influencia de la materia componente del envase: es lógico que el calor debe de calentar el recipiente antes de penetrar en el interior, por lo tanto el tiempo necesario depende de la materia de la que está compuesto este y de su espesor. Por esta razón se buscan materias y límites óptimos de espesor lo que facilita en mayor escala el calentamiento del producto enlatado.

Influencia de la consistencia del producto: la penetración es tanto más lenta cuando más denso es el producto. Los productos enlatados puede decirse con certeza que pertenecen al grupo de los densos.

Tratamiento Térmico

Influencia de la temperatura inicial del producto y de la autoclave: un producto enlatado está afectado por el desnivel de temperatura entre el envase y el autoclave, las latas sumergidas más calientes alcanzan una temperatura más próxima a la del autoclave en un tiempo más corto y por ello permanecen a una temperatura más elevada durante mayor tiempo. De manera que existe la práctica de llenar las latas de algún producto en caliente.

[◇] GARCÍA, H. 1992. **Principios de Procesamiento Térmico**. Ciudad de la Habana, Cuba. Editorial Pueblo y Educación. 326 p.

Sistemas de calentamiento y temperatura del autoclave: La agitación de las latas durante el tratamiento térmico aumenta considerablemente la velocidad de penetración del calor en los contenidos líquidos, ya que se trasladan las porciones calientes a las regiones más frías del envase por lo que se emplean autoclaves rotativas. Para comprobar la eficiencia de la esterilización se utiliza:

- inoculación y prueba
- métodos clásicos de integración matemática
- gráfica de las velocidades letales en el punto frío.

El método que se utiliza con mayor frecuencia es el de inoculación y prueba. Para efectuarlo se inocula el alimento enlatado, con las esporas de un organismo representativo de los gérmenes productores de alteración más termorresistentes y que lo contaminan más frecuentemente.

El problema que presenta la utilización de este método es la determinación del número de esporas o gérmenes que deben añadirse a las latas. Además debe de considerarse el punto de inoculación ya que este varía de acuerdo al tipo de calentamiento, que se presente.

Alteraciones en el Producto Enlatado

El indicador más obvio de deterioro en alimentos enlatados es la combadura de uno o ambos extremos de la lata. Esto implica que el alimento posiblemente ha sufrido deterioro por parte de bacterias formadoras de gas. Los enlatadores de alimentos advierten a los consumidores a no utilizar ninguna lata que tenga uno o ambos extremos combados, a pesar de que la hinchazón puede deberse a otras causas que no son de origen microbiológico. (GARCÍA, 1992)

La apariencia y el olor del contenido de una lata también pueden indicar deterioro. Si el producto está partido y baboso, o si una salmuera o jarabe normalmente claros se ven turbios, podemos sospechar que hay deterioro.

Una vez que el producto haya sido enlatado se corre el riesgo de que exista contaminación debido a factores como: problemas en los cierres, deficiencia en la esterilización y formación de compuestos gaseosos por reacciones químicas dentro de la lata. A continuación se describen algunos de estos casos mediante situaciones específicas:

Las alteraciones pueden ser debido a la actividad microbiana, las reacciones químicas entre el envase y el contenido, las deficiencias técnicas en el modelo de esterilización empleado y condiciones inapropiadas de almacenamiento.

Los fondos de una lata normal con vacío bien efectuado, son ligeramente cóncavos o planos. Una lata con fondos abultados, a causa de una presión interna causada por los gases formados como consecuencia de la actividad química o microbiana se denomina, lata *hinchada o abombada*. (RACCACH, 1989)

Hinchazón dura: es aquella lata abombada en ambos extremos y que resiste la presión de los dedos cuando es presionada hacia el interior al intentar restablecer la posición normal.. Normalmente un abombamiento duro se doblará antes de que la lata explote. Puede ocurrir rotura a nivel del doble sello sobre la costura lateral o a mitad de esta.

Hinchazón suave: Una lata convexa en ambos extremos pero no lo suficiente como para impedir que ambas caras sean empujadas con la presión de los pulgares. Puede ser forzado hacia el interior pero nunca recuperará su posición normal.

Plana: lata con ambos extremos cóncavos y que permanece con esas características aún cuando se deje caer bruscamente sobre una superficie plana.

Elástica: lata con un extremo permanentemente convexo. Si se aplica suficiente presión a este extremo, se tornará cóncavo, pero la otra cara se abombará.

Saltón: lata que posee uno de los fondos hinchados, pero capaz de volver a su posición normal al presionarla con los dedos.

Lanzado: lata de aspecto normal que uno de sus fondos sale al exterior en cuanto se golpea contra cualquier objeto sólido, recuperando su posición normal al aplicarle presión.

De acuerdo a su origen las alteraciones de los productos enlatados pueden clasificarse de la siguiente manera:

❖ **Biológicas o microbianas** como resultado de:

- Tratamiento térmico insuficiente.
- Contaminación del contenido de las latas a través de fugas.
- Alteración del contenido antes de ser enlatada o esterilizada.

❖ **Alteración química:** ocasionada principalmente por formación de gases o precipitados producto de reacciones químicas.

- Abombamiento por hidrógeno.
- Formación de precipitados por formación de ácido sulfhídrico.

❖ **Alteración física:** manifestada por cambios evidentes, tanto en el exterior como en el interior, en la estructura original de la lata.

- Técnica incorrecta del manejo del autoclave.
- Vacío insuficiente.
- Llenado excesivo.
- Corrosión interna y externa de las latas.

❖ **Alteraciones Biológicas o Microbianas**

Tratamiento térmico insuficiente: El término procesamiento térmico inadecuado se explica por sí solo. Los procesos térmicos dados a los alimentos enlatados están destinados a destruir cualquier microorganismo de importancia desde el punto de vista de salud pública, así como también a microorganismos que no son importantes desde el punto de vista de salud pública. Si el proceso térmico es inadecuado para destruir al *Clostridium botulinum* el cual es un organismo mesófilo, la situación creada es sumamente peligrosa, ya que la salud del consumidor puede verse afectada. (GARCÍA, 1992)

Cuando un producto es poco ácido ($\text{pH} > 4.6$, como es el caso del atún enlatado) requiere que el tratamiento térmico sea efectivo ya que en esas condiciones de pH las esporas únicamente pueden ser eliminadas mediante alta temperatura.

Un proceso térmico puede ser inadecuado cuando se producen condiciones como las siguientes:

- Si el tiempo y la temperatura especificados en el proceso térmico programado para el producto en cuestión en el tamaño de envase en particular, o su equivalente, no se usa o no se establece correctamente.
- Si el proceso térmico programado no se aplica correctamente debido a alguna falla mecánica o del personal a cargo de la operación. Esto trae como consecuencia una variada sobrevivencia de microorganismos, los que durante su desarrollo producen gases, lo que determina la aparición de latas hinchadas. Otras veces el contenido experimenta una acidificación u otras modificaciones indeseables que afectan la calidad pero que no producen gases.

Como primer paso en la investigación de este tipo de alteración es la identificación del microorganismo responsable de la alteración, que seguramente será un esporulado de manera que lo más importante es averiguar el origen de la contaminación teniéndose que investigar todas las materias primas, máquinas y equipos en uso. Se debe de considerar la disposición de las latas dentro del autoclave ya que esta puede retardar las corrientes de convección, latas apretadas impiden el libre acceso del vapor o agua caliente a todas sus partes y de este resulta un calentamiento irregular. (FERNÁNDEZ, 1993)

Contaminación a través de fugas de los cierres: La mayoría de los envases de alimentos elaborados se sellan en una forma que produce un vacío. Esto crea una condición por medio de la cual cualquier sello que no fuese seguro, podría dar lugar a una succión o inspiración de aire, agua u otro material. El resultado probable de esta succión sería el deterioro del producto debido a la entrada de bacterias en el material absorbido. (RACCACH, 1989)

Este tipo de contaminación es la más importante en la práctica y se conoce generalmente como infiltración y se manifiesta rápidamente en forma de latas infladas. Si hay muchas latas infladas, es de esperarse que también haya un porcentaje bajo de latas dañadas no infladas (agriado plano) a causa de organismos productores de esporas, los cuales producen ácido y agrian el alimento sin producir gas, manteniéndose los extremos de la lata planos. Este tipo de bacterias son un problema principalmente económico, por lo que latas aparentemente normales deben examinarse cuidadosamente.

Los microorganismos que infectan el producto enlatado, como resultado de las fugas de los recipientes después del proceso, son de muy diversos tipos entre ellos están cocos y bacilos esporulados y no esporulados; estos últimos son los que se encuentran con mayor frecuencia al hacer exámenes microscópicos.

La contaminación en latas alteradas por fisuras se produce, en mayor medida durante el enfriamiento en agua. Durante el enfriamiento se origina cierto grado de vacío en la lata como consecuencia de la condensación del vapor de agua y la concentración del aire residual. La apertura de las fugas puede tener lugar en el momento en que la lata cambia de forma como consecuencia del hundimiento de sus tapas que cambian de forma convexa a cóncava al contacto con el agua de enfriar los productos. Por lo tanto el agua que se usa en el enfriamiento dentro de los autoclaves debe de ser clorada, además se debe de ser riguroso en el cierre de las latas durante la producción.

Alteración del producto anterior al tratamiento térmico: estas se producen cuando se retiene por demasiado tiempo entre la operación de llenado y sellado y del tratamiento térmico por otro. Por lo que se recomienda que los productos enlatados no deben de demorar su esterilización más de 30 minutos, después de ser sellados.

❖ **Alteración Química**

Abombamiento químico: ocurre como resultado de la formación de hidrógeno a causa de la corrosión interna del envase bajo la acción del contenido.

Tales alteraciones suceden frecuentemente en los productos de alta acidez en este caso cuando existen algunas imperfecciones en la cobertura, el estaño y el hierro entran en contacto con los ácidos orgánicos. El hidrógeno gaseoso se desprende cuando es desplazado por la acción del ácido sobre el metal. La acumulación de este gas a veces aumenta la presión interna de la lata observándose una hinchazón. En la producción de pescado esta se observa con muy poca frecuencia. (BERTULLO, 1990)

Formación de precipitados: puede ocurrir que el estaño se disuelva, lo que sucede especialmente en presencia de ácidos débiles como ácidos grasos libres. Entonces el estaño permanece en disolución o se precipita en forma de capa blanquecina que representa el ácido metaestático.

De más trascendencia es el ataque de compuestos de azufre sobre el hierro de las paredes de los envases, lo que se produce es una disolución del hierro sulfhídrico (FeS) de coloración negra que se precipita depositándose en cantidad considerable sobre los alimentos.

❖ **Alteraciones físicas**

Empleo incorrecto del autoclave: una señal característica de las latas que han sufrido presiones anormales durante la esterilización son las deformaciones permanentes en los fondos o de sus anillos. Estas latas se eliminan porque tales tensiones y deformaciones dan como resultado la aparición frecuente de fisuras o huecos en el cierre. Asimismo por el empleo de una plancha de hojalata incapaz soportar la presión que se produce durante la esterilización. (GARCÍA, 1992)

Otras veces se aprecia un abombamiento del fondo unilateral ligero, este último vuelve a su posición normal al presionarlo con el pulgar. Esta es causada por una evacuación incompleta del aire en el producto. Latas almacenadas a temperaturas ambientales altas muestran el defecto de hinchazón antes mencionado.

Un llenado excesivo puede causar deformación durante el proceso de esterilización, en la autoclave, por expansión de su contenido.

Vacío insuficiente: ocurre por pérdida de vacío que llega a conducir presiones internas excesivas en las latas en la autoclave, esto deforma los sellos lo que aumenta el potencial de deterioro por infiltración.

Corrosión exterior de las latas: la presencia de humedad excesiva sobre la superficie de las latas provoca la formación de herrumbre. Los productos marinos enlatados se enfrían por término medio a 45°C pues a esta temperatura las latas mantienen suficiente calor para que puedan secarse rápidamente. Las latas recién tratadas deben almacenarse en grupos relativamente pequeños y en almacenes frescos y bien ventilados.

Si la temperatura de enfriamiento se reduce a menos de los 45 °C recomendados puede no haber el suficiente calor para vaporizar la humedad sobre las latas por lo que estas se almacenarán húmedas en los almacenes.

Corrosión interna de los envases: en determinadas condiciones tanto el hierro como estaño pueden llegar a disolverse o desprenderse, generándose problemas debido a la capacidad que tienen ambos elementos para reaccionar con otros productos existentes en los alimentos formándose así sulfuro de estaño (coloreado) por la acción conjunta del estaño de las latas, del agua y de la solución de sal común con el SH₂.

Factores que Alteran la Calidad de los Enlatados

✧ **Contaminación por *Clostridium botulinum***

Este es el microorganismo causante de deterioro en enlatados más peligroso, pues cuando crece puede producir una enterotoxina letal ya que llega a causar una relajación irreversible y una parálisis flácida de los músculos. Como se observa en la figura 2 la toxicidad se produce cuando la toxina botulínica se fija en las membranas de una unión neuromuscular, bloqueando la transferencia de acetilcolina. Este bloqueo interfiere con la transmisión del impulso nervioso al músculo ocasionando una parálisis flácida como resultado de la inhibición de la contracción muscular.

El *C. botulinum* es un microorganismo mesofílico capaz de crecer en ausencia de aire u oxígeno y que es formador de esporas, habilidad que le permite sobrevivir en una gran cantidad de ambientes desfavorables, tales como calor y ambientes químicos. Crece mejor a temperaturas entre 30 y 37 °C, aunque es capaz de crecer a 4 °C.

Hay varios tipos de *C. botulinum* que se distinguen por la naturaleza de la toxina que producen, estos tipos son: A, B, C, D, E, F y G. Los tipos E y F son los que se asocian con ambientes marinos y presentan la característica de que son los que resisten las temperaturas más bajas (4 °C) por lo que el almacenamiento a temperaturas de refrigeración no garantiza, en ninguna medida, la inocuidad de un alimento frente a la bacteria. Asimismo la célula vegetativa se destruye al someterse a temperaturas superiores a los 50 °C, mientras que las esporas no tolerarán temperaturas superiores a la que se tiene con la ebullición del agua (100 °C). Además se ha determinado que la toxina del tipo E se desnaturaliza a 80 °C durante 10 minutos.

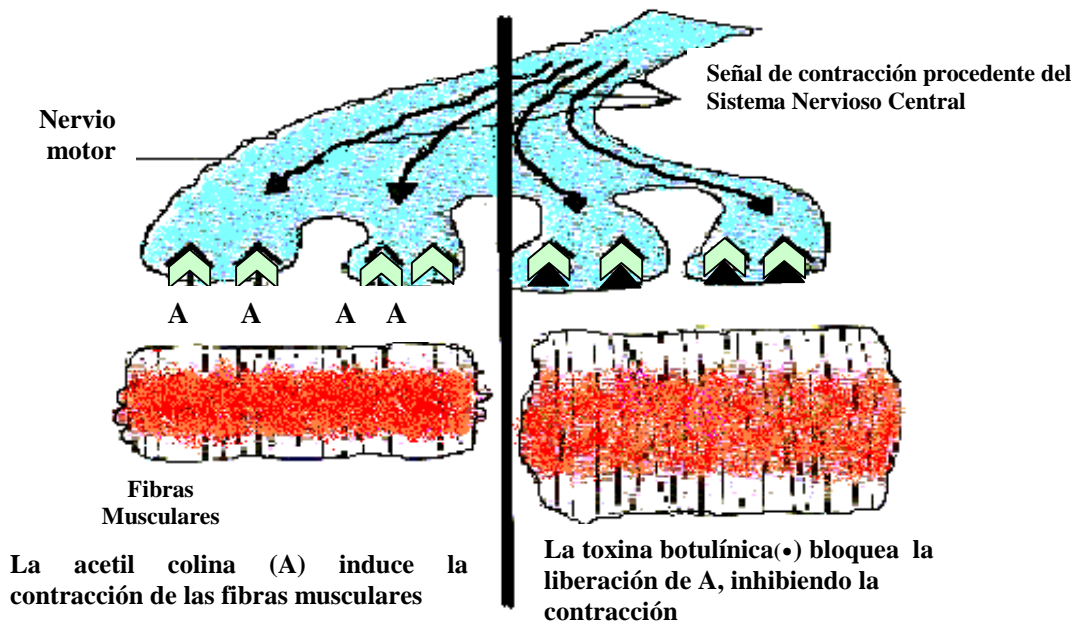


Figura 2. Efecto de la neurotoxina producida por *Clostridium botulinum* La toxina botulínica causa una relajación irreversible y una parálisis en los músculos afectados.

Ya que las esporas de *C. botulinum* se encuentran en cualquier parte, cualquier alimento crudo puede estar contaminado con ella, de manera que una vez que se inicia el proceso de enlatado se debe de tener especial cuidado en llevar el producto a condiciones de calor elevado para poder tener la certeza de que se destruyó a este microorganismo. Hay que mencionar que la neurotoxina únicamente se desarrolla en el alimento cuando el microorganismo se encuentra en su forma vegetativa bajo condiciones anóxicas y poco ácidas.

Un factor de seguridad que permite reducir el riesgo de crecimiento vegetativo o germinación de las esporas de *C. botulinum* es la adición de sal, que permite inhibir el crecimiento de las bacterias formadoras de esporas, contribuyendo a reducir el deterioro del alimento.

La sal llega a competir contra las esporas por el agua disponible, de manera que se logra bajar el A_w (Actividad del agua, medida en moléculas de agua libres para ser usadas por las soluciones disueltas) que requieren las esporas de *C. botulinum* ($A_w = 0.95$) hasta un A_w de 0.85 de manera que se requerirá únicamente de un tratamiento térmico eficiente para reducir al máximo las posibilidades de que las esporas de *C. botulinum* germinen a células vegetativas.

❖ **Contaminación por Histamina**

Si bien la intoxicación histamínica afecta a diferentes alimentos, es mucho más frecuente en el pescado específicamente en aquellos del orden de los escombroides al cual pertenece el atún. Se han identificado las dos causas principales de su presentación son: la manipulación antihigiénica del pescado y la conservación a temperaturas inadecuadas. (RODRÍGUEZ, 2000)

Para el pescado existe una normativa específica que fija los límites entre 100 y 200 ppm (mg de histamina / Kg de pescado).

Como se había mencionado antes la intoxicación histamínica más frecuente se asocia al consumo de pescado porque los microorganismos responsables de su formación actúan cuando la temperatura del pescado es superior a 15°C. Y si la temperatura es superior a 20°C la velocidad de formación se incrementa considerablemente. (BIOPSILOGÍA, 2002)

La formación de histamina se debe a la acción de microorganismos presentes en el músculo del pescado. Estos microorganismos normalmente son enterobacterias, que se encuentran en el intestino de personas o animales. (REDVY, 2001)

Al entrar el pescado a la fase post-mortem el músculo del pescado se empieza a alterar provocando la liberación de un aminoácido, la histidina. Este aminoácido es utilizado por los microorganismos del pescado, anteriormente descritos, dando lugar a una acumulación de histamina en el mismo. (RODRÍGUEZ, 2000)

Se conoce que cuando esta concentración rebasa los 500 ppm aparecen síntomas de intoxicación en personas sensibles, mientras que si la concentración llega a superar 1000 ppm, la intoxicación es prácticamente segura en cualquier consumidor.

La presencia de histamina en el producto final es un factor al que las industrias deben de estar preparadas, ya que se ha determinado que la histamina logra soportar el proceso de esterilización. Ante esta situación lo que se debe de hacer es realizar pruebas a las materias primas de manera que se utilice una estrategia de prevención para el aumento de la concentración de histamina en el producto terminado. (LEE, 1999)

El análisis de concentración de histamina a las materias primas se puede realizar mediante técnicas de tipo inmunológico y enzimático que permiten realizar el análisis con gran confiabilidad y a bajo costo, permitiendo que se puedan hacer muestreos constantes del producto terminado y de la materia prima en almacenamiento.

✧ **Rancidez**

El contenido de grasa del pescado fresco va desde 1 a 22% en algunas especies y particularmente las especies pelágicas. La grasa del pescado es bastante fluida y tiende a depositarse en depósitos definidos, principalmente debajo de la piel. El aceite de pescado es insaturado y reacciona rápidamente con el oxígeno de la atmósfera el cual resulta en un olor de rancidez desagradable. La velocidad de reacción es reducida cuando se disminuye la temperatura, pero la reacción puede ocurrir aún en el estado congelado. Esta es catalizada por las enzimas del sistema dentro del pescado y trazas de hierro o cobre actúan como pro-oxidantes. La reacción o el inicio de la oxidación o rancidez puede ser promovido por la luz.

✧ **Formación de trimetilamina (TMA)**

La TMA es formada en pescado de mar y provoca que estos se degraden como resultado de la reducción bacteriana del óxido de trimetilamina (OTMA). La reacción envuelve la oxidación simultánea del ácido láctico o ácido acético y dióxido de carbono. (BIOPSILOGÍA. 2002)

Esta reacción depende del pH. Vivos o cercanamente muertos los pescados son alcalinos, pero después de la muerte hay una rápida caída del pH cuando el glucógeno se rompe produciendo ácido láctico. En el pescado fresco algunos de sus constituyentes (particularmente OTMA) se comportan como buffers fuertes. Cercano al *rigor mortis* el OTMA es reducido por las bacterias a TMA, el cual no es un buffer a este pH, por lo tanto el pH cae lentamente. Eventualmente, al terminar el *rigor mortis* el ácido láctico desaparece y más material alcalino (incluyendo amonio) es producido y el pH alcanza un valor de 8 ó más en el pescado en estado de putrefacción.

Etapas del Proceso de Enlatado

Algunas de las etapas más importantes del proceso de enlatado son:

- ✧ **Recepción de materias primas:** se efectúan para mantener las buenas condiciones del pescado antes de llevarlo a proceso. Se realizan análisis microbiológicos y físico-químicos para comprobar que los procedimientos de captura y almacenamiento del atún en frío, mantuvieran intactas las condiciones naturales del atún. Dichos análisis constituyen el punto de control más importante, ya que de su resultado depende la aprobación para el almacenamiento de las materias primas en la compañía
- ✧ **Descongelación:** flujo de agua potable continuo durante aproximadamente 12 horas, para lograr bajar la temperatura de congelación hasta una temperatura cercana a los 2°C, que facilite el corte del atún durante el eviscerado.
- ✧ **Corte en lomos y Eviscerado:** facilita manipulación para la cocción, se deja el pescado de un tamaño manejable mediante cortes transversales; además se libra al pescado de las vísceras y otros tejidos que no son utilizados en el proceso.
- ✧ **Cocción:** para lograr una consistencia que facilite manipulación la temperatura será de 102-104°C por 25 minutos.
- ✧ **Enfriamiento:** porciones deben de estar a 40-50°C para continuar con el proceso.
- ✧ **Limpieza:** consiste en eliminar piel, cola, cabeza, las espinas, y partes oscuras.
- ✧ **Envasado latas:** consiste en llenar los envases con el producto natural (pescado procesado) de manera correcta y uniforme según los pesos que se hayan predeterminado.

En este punto es esencial que se tomen medidas de precaución para evitar que se queden algunas partículas de producto entre el borde del envase y la tapa colocada sobre el envase.

Una partícula del producto, atrapada en el cierre, no solo puede causar deformación del sello, sino que puede constituirse en un puente que permita la infiltración de microorganismos dentro del envase.

- ✧ **Dosificación de sal y líquidos de cobertura:** se tiene como objetivo lograr una concentración de cloruro de sodio en el producto envasado uniforme, además se añaden los líquidos de cobertura con el fin de mejorar el sabor. La dosificación se debe realizar a una temperatura de 80 -85⁰C para que se tenga un vacío correcto y una fácil penetración dentro de la lata.
- ✧ **Sellado:** se realiza para comprobar el cierre hermético de la lata y para evitar la descomposición del producto. Las latas se lavan para desprender grasa u otra suciedad en el exterior del envase.
- ✧ **Esterilización:** se realiza con el objetivo de evitar la putrefacción del producto y destruir microorganismos patógenos.
- ✧ **Etiquetado:** con esta operación se logra la correcta identificación del producto enlatado, en la etiqueta se deben de señalar todas las propiedades del producto así como sus componentes.
- ✧ **Almacenamiento:** tiene como objetivo mantener el producto terminado en las mejores condiciones, para proteger su calidad. El producto se almacenará en lugares secos, bien ventilados, bajo techo y con estibas adecuadas. Se debe evitar que la temperatura sobrepase los 30°C.
- ✧ **Distribución:** se realiza para conducir el producto terminado hacia los diferentes lugares para su venta.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la eficiencia de los procedimientos utilizados en CENSA para el aseguramiento preventivo de la calidad durante la elaboración de atún enlatado, con el fin de controlar la recepción de las materias primas, así como, la limpieza de las áreas y equipos de producción.

Objetivos Específicos

- Evaluar la materia prima (atunes enteros) durante el proceso de descarga, en sus características organolépticas distinguiendo contaminaciones con combustibles y amoníaco.
- Realizar pruebas tanto a materia prima cruda como a la cocida para determinar la presencia presuntiva de bacterias patógenas *Salmonella* spp y *Listeria* sp.
- Determinar la concentración de histamina en la materia prima que llega a la compañía durante la descarga, con el fin de permitir o rechazar su almacenamiento en la cámara dispuesta para tal fin.
- Cuantificar la concentración de sal en los tejidos del atún proveniente del barco durante la recepción de la materia prima.
- Verificar que los procedimientos de limpieza y desinfección de equipos sean eficientes mediante pruebas de omnipresencia de microorganismos, con el fin de determinar posibles puntos de control y de riesgo por contaminación microbiológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas y análisis realizados evaluaron algunas de las principales etapas involucradas en la elaboración del atún enlatado. Su ubicación dentro del diagrama de flujo del proceso se detallan en el anexo 1.

Las etapas del proceso evaluadas fueron: a) *la recepción de las materias primas*, b) *descongelado*, c) *limpieza del atún*, d) *llenado* y e) *sellado*. A continuación se especifican las pruebas y análisis ejecutados en la Compañía Enlatadora Nacional S.A.

Prueba de Histamina

Con esta prueba se evaluó a la principal materia prima de la compañía (atún) en las etapas de recepción de materias primas (atunes enteros congelados) y llenado de latas (atún cocido y limpio).

Se utilizó un *kit* de la Corporación NEOGEN denominado **test Veratox[®] para Histamina**, este es un test ELISA (del inglés *enzyme-linked immuno-sorbent assay*) competitivo directo, pues contiene pozos recubiertos con anticuerpos específicos para la histamina en una placa de microtitulación, sitios por los cuales compiten la histamina libre de una muestra blanco y un compuesto específico del test (conjugado) formado por una enzima ligada químicamente a la histamina presente en el conjugado. El test posee un límite mínimo de detección de 2 ppm, con un rango de cuantificación de 2,5 ppm a 50 ppm.

Se realizaron tres pruebas para determinar la presencia histamina en la carne del atún, una cada vez que hubo descargue de materia prima (atunes enteros) dentro de la Compañía Enlatadora Nacional (CENSA), esto ocurrió los días 30 de enero, 19 de febrero y 24 de abril del año 2002.

Asimismo se realizó una prueba comparativa el día 22 de mayo del mismo año, entre la materia prima almacenada en la cámara de almacenamiento y que se encontraba en el proceso de descongelación y una muestra de atún ya procesado (cocido y limpio).

Para las pruebas realizadas durante el tiempo de descargue se tomaron seis muestras del atún entero que estaba entrando a CENSA proveniente del barco atunero. Estas muestras se obtuvieron al cortar transversalmente el atún por debajo de la aleta pectoral teniéndose piezas de al menos 4 cm². Se tuvo especial cuidado en seleccionar al menos una muestra de cada uno de los contenedores de almacenamiento dispuestos en el barco para la materia prima destinada a la compañía.

Para la prueba comparativa se realizó un muestreo de tres atunes enteros que habían estado almacenados aproximadamente un mes en las cámaras de almacenamiento y que tenían cuatro horas de estar en las pilas de descongelación; estos muestreos tuvieron las mismas características que los muestreos descritos anteriormente en el tamaño, forma y lugar de muestreo. También se realizaron tres muestreos de atún disponible para ser enlatado por lo que se tomaron trozos de lomo limpio.

Una vez que se obtuvieron las muestras en el área de recepción de materias primas, pilas de descongelación y sala de limpieza de atún; se procedió a llevarlas al laboratorio en donde se pesaron 10 gramos de cada una de las muestras seleccionadas.

Posteriormente se colocaron los diez gramos en una bolsa a la que se le agregó 90 ml de agua destilada y se frotó con los dedos la muestra durante 20 segundos, de manera que se pudiera ir disgregando la muestra en el agua y luego se dejó reposando durando cinco minutos. Este procedimiento se repitió dos veces.

Finalmente se volvió a masajear la muestra por 20 segundos más dejándola reposar durante 30 segundos. Concluido este tiempo la mezcla se dejó filtrar a través de un filtro para café durante tres minutos, de manera que se conservara el filtrado descartándose los sólidos presentes en la mezcla.

En el caso del atún ya cocinado y limpio, se colocaron los 10 gramos de la muestra junto a los 90 ml de agua destilada y se licuaron durante dos minutos; este licuado se filtró de la misma manera que las muestras anteriores.

Posteriormente se preparó una mezcla diluida (1/100) de la muestra filtrada al tomarse 100 μ l del filtrado de cada muestra con una micropipeta con punta estéril para cada una y vaciarla sobre un tubo de ensayo en donde previamente se habían agregado 10 ml del Diluyente Buffer del test con una pipeta estéril. La preparación de este diluyente buffer se realizó antes de iniciar la prueba, al disolver el contenido del sobre con el buffer en un litro de agua destilada y agitar hasta tener una mezcla homogénea e incolora.

Seguidamente se tomó la placa de microtitulación marcada de color rojo en el fondo y se procedió a añadirles 100 μ l de cada uno de los controles (con concentraciones entre 0 y 50 ppm) en pozos individuales para cada concentración, asegurándose de cambiar cada punta de la micropipeta por otra estéril al añadir cada control. Además la placa de microtitulación se completó al añadir 100 μ l de la solución diluida del filtrado en el buffer en los pozos de mezcla restantes. Cada una de las placas de microtitulación consta de 12 pozos en donde los seis primeros están destinados a los controles propios del test y los restantes seis son para las muestras a evaluar.

Una vez que los controles y las muestras se colocaron en los pozos de mezcla marcados con rojo se le añaden 100 μ l del conjugado a los pocitos y se mezcla la solución con la micropipeta entre tres y cinco veces. Inmediatamente después de mezclar, se procedió a pasar la solución de la placa de microtitulación a una segunda placa de microtitulación, que contiene pozos cubiertos con anticuerpos, con una micropipeta de doce canales teniéndose el cuidado de que cada una de las puntas sean estériles y se llenen al mismo nivel al recoger la solución.

Las muestras se dejaron incubando durante 10 minutos en la placa de microtitulación con anticuerpos. Pasado este tiempo, se descartó la solución y se realizaron tres lavados con el Wash Buffer del test. Este Wash Buffer se preparó anteriormente al mezclar 40 ml del buffer de lavado concentrado con 960 ml de agua destilada. Esta solución se debe de mezclar lentamente, teniéndose el cuidado de no sacudirla de forma que se pueda evitar la formación de burbujas.

Una vez realizados los tres lavados se debió secar los pozos cuidadosamente dejándolos boca abajo durante tres minutos. Cumplido el tiempo establecido para el secado de los pozos se procedió a verter una cantidad determinada de sustrato en el recipiente específico para el sustrato. Luego se cambiaron las puntas de la micropipeta de doce canales y se midieron 100 µl del sustrato que fueron depositados en cada uno de los pozos cubiertos con anticuerpos y se dejó incubar durante 10 minutos.

Durante este tiempo se vertió la solución Red Stop en el recipiente respectivo. Luego se utilizó una vez más la micropipeta de doce canales, con las mismas puntas que se usaron para añadir el sustrato, y se agregaron 100 µl de esta solución en todos los pozos de la placa de microtitulación.

Finalmente se calibró el lector de las placas de microtitulación, STAT FAX EIA READER, para una longitud de onda de 650 nm. La placa de microtitulación fue colocada inmediatamente después de añadir el Red Stop en el carril correspondiente para la lectura de las muestras. Una vez corrida la placa en el lector se procedió a imprimir el resultado de la prueba de modo que se pudiese comprobar la concentración de histamina en las muestras.

Análisis de *Salmonella* sp

Esta prueba se llevó a cabo durante la recepción de materias primas y constituye uno de los puntos de mayor exigencia para la entrada de atún en la compañía. Su de terminación es importante dado que durante la captura, almacenamiento en el barco y su posterior traslado a la compañía, existe una gran presencia de aves, las cuales se encuentran ligadas a la *Salmonella* spp debido principalmente a sus heces. Además se tiene un antecedente en la compañía en el que hace siete años se encontró *Salmonella* spp en un análisis realizado al atún en las cámaras de almacenamiento de la compañía, por lo que se implantó este análisis como requisito de entrada para la materia prima.

La determinación presuntiva de *Salmonella* sp se llevó a cabo con un kit **Reveal® para *Salmonella*** (anexo 3). Este test consiste en una placa inmunocromática con anticuerpos marcados con oro específicos para *Salmonella* sp en donde la muestra blanco se aplica sobre una ventana redonda que dirige la muestra sobre una membrana de nitrocelulosa, por la cual migra hasta una zona de reacción en donde se encuentran los anticuerpos marcados, tanto para el control como para la muestra. El test utiliza un anticuerpo único y un método de enriquecimiento para asegurar la sensibilidad de 1 UFC de *Salmonella* sp presente en 25g de muestra.

Para su determinación se tomaron dos muestras de carne de atún crudo (de un tamaño aproximado a los 3 cm) procedente del barco atunero y trasladado en buguis (contenedor de 8 m³ de capacidad) durante el descargue. Esta acción se realizó en los tres descargues acontecidos durante la práctica. Por último se tomó una muestra del atún que se encontraba almacenado en la cámara de almacenamiento de CENSA.

Se pesaron 25 gramos de carne cruda y se colocaron en una bolsa estéril en donde previamente se había hidratado todo el contenido del frasco que contenía el medio de pre-enriquecimiento Revive del test, al añadirsele 200 ml de agua destilada. Seguidamente se cierra la bolsa estéril y se incuba a 37 °C durante cuatro horas.

Al cumplirse el tiempo establecido se rehidrató el medio selectivo de enriquecimiento agregándosele 200 ml de agua destilada estéril. Este medio selectivo se añadió a la muestra pre-enriquecida y se dejó incubando durante 16 horas a 43 °C.

Pasadas las 16 horas se sacó la bolsa de la incubadora y se dejó enfriar durante 25 minutos a temperatura ambiente para luego sacar una muestra de un mililitro del caldo enriquecido.

Finalmente se colocan tres gotas del caldo enriquecido en la ventana de la muestra que posee la lámina de ensayo inmunocromática del test. La lectura de los resultados pudo ser determinada visualmente por la presencia o ausencia de una línea coloreada en la zona blanco del microorganismo.

La placa se descartó luego de ser sumergida durante treinta minutos en una solución de cloro a 200 ppm.

Prueba de Listeria sp

Esta prueba se realizó durante el período de descarga y se considera como un punto de control exigido para industrias pesqueras que buscan importar sus productos, ya que en varios países europeos se han tenido problemas en productos pesqueros preservados en salmuera, por lo controlar una posible contaminación de *Listeria sp* en el atún es de gran importancia para la calidad del producto final, a pesar de que las posibilidades de contaminación son mínimas dado que el proceso de producción posee procedimientos térmicos que limitan el crecimiento de *Listeria sp*.

La prueba consistió en la aplicación de un kit **Reveal® para *Listeria sp*** (anexo 3), test de identificación rápida mediante la utilización de una placa inmunocromática con anticuerpos marcados con oro que determinan presuntivamente la presencia de *Listeria sp* mediante la demarcación de dos líneas coloreadas en la zona de reacción del test luego de que la muestra, colocada en la ventana de muestra de la placa, migrara a través de una membrana de nitrocelulosa. La prueba posee la sensibilidad de detectar entre 1-10 UFC en 25 g de una muestra.

Esta prueba se realizó durante el tiempo de descarga y además se realizó una prueba del producto que había en refrigeración en las cámaras de almacenamiento de la compañía.

Todas las pruebas que se realizaron usaron como fuente de muestreo carne fresca de atún, cortándose transversalmente unos tres centímetros de carne cercana a la cola de un atún entero. Se tomaron dos muestras por cada una de las pruebas que se llevaron a cabo.

Para cada una de las muestras se pesaron 25 gramos y se colocaron en una bolsa estéril que contenía el caldo Fraser. Este caldo se preparó al vaciarse el contenido del frasco con el caldo deshidratado en la bolsa estéril, añadiéndose posteriormente 225 ml de agua destilada.

Luego de que se añadiera la muestra se homogenizó la mezcla frotando el trozo de carne vigorosamente contra la bolsa plástica, de manera que se pudiera ir desmenuzando el trozo de atún. Seguidamente se dejó incubando el caldo con la muestra durante 21 horas a 30 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación predispuesto se extrajeron 100 µl de la mezcla y se transfirieron a un recipiente con 10 ml del caldo buffer enriquecido y se volvió a incubar durante 21 horas a 30 °C.

Posteriormente se transfirieron dos mililitros del caldo incubado a un tubo de ensayo y se dejó en un baño maría a 80 °C durante 20 minutos. Al cumplirse este tiempo se dejó enfriar el caldo a temperatura ambiente durante diez minutos.

Luego se tomaron 135 µl del caldo incubado y se adicionaron en la ventana azul del dispositivo de la prueba. Seguidamente se determinó un tiempo de 20 minutos para que se pudiese hacer la lectura de la lámina de ensayo inmunocromática. La lámina se descartó luego de ser sumergida durante treinta minutos en una solución de cloro a 200 ppm.

Determinación de la Concentración de Sal en el Atún Entero

La concentración de sal en el atún preservado en salmuera se debe determinar con el fin de asegurar la calidad del producto terminado en términos de sabor, ya que dependiendo de la concentración de sal promedio del atún recibido en la compañía se prepara parte de los líquidos de gobierno de manera que el sabor del atún enlatado no se vea afectado por una concentración excesiva de sal.

Esta prueba constituye un punto de control en la recepción de materia prima teniéndose un parámetro de salinidad no superior al 2.5% para que se acepte la materia prima.

La cuantificación se realizó con un conductímetro que permitía la cuantificación de iones NaCl en la muestra colocada en el espacio diseñado para la determinación.

Para la prueba se tomaron dos muestras de cada uno de los viajes, procedentes del barco atunero, que entraban en la compañía. Se cortó un trozo de carne cruda del pescado entero y se llevó al laboratorio en donde se pesó 10 g de la muestra obtenida y se licuó en 90 ml de agua destilada durante 60 segundos. Luego se procedió a filtrar el licuado con un filtro para café, dejándose en reposo el licuado durante tres minutos. Posteriormente se tomó el filtrado y se extrajeron 15 ml y se agregaron en el pozo del conductímetro. Inmediatamente se leyó el dato de la concentración de sal en la muestra en la pantalla del conductímetro.

Análisis Microbiológicos y Químico para Aguas de Uso industrial

Este análisis se desarrolló principalmente como un control propio para la compañía, al mismo tiempo que permitió evaluar la calidad del agua utilizada durante la etapa de descongelado del atún, punto crítico del proceso ya que está íntimamente ligado con el cocinado del atún por lo que un error durante esta etapa provocaría una reducción en la calidad del atún cocido, ocasionado por gradientes de humedad en el pescado y la posibilidad de que en el punto frío del atún no se alcance la temperatura exigida al concluir el cocinado(65°C).

Se tomaron tres muestras del agua de tres de los seis tanques de almacenamiento de agua de CENSA para realizarles un análisis microbiológico (tres muestras) y otro químico (una muestra).

Para hacer los análisis microbiológicos se tomaron muestras de los tanques de almacenamiento ubicados debajo de la cámara de almacenamiento de materia prima (tanque#1), debajo de los autoclaves (tanque#5) y debajo del área del callejón (tanque# 2).

El muestreo del agua en el tanque #1 se realizó al tomar 100 gramos del hielo, producido en la cámara diseñada para tal fin y que utiliza agua del tanque antes mencionado, en una bolsa estéril. El hielo se produce en una máquina ubicada en un segundo piso y cae en la cámara donde es almacenado. Se tuvo el cuidado de tomar hielo que recién estaba cayendo y que no hubiese tenido contacto con el suelo, con una pala de acero inoxidable, desinfectada previamente con una solución de cloro a una concentración de 200 ppm.

Para el tanque # 2 se procedió a ubicar una de las fuentes de salida de agua en las pilas de descongelación de la planta y se procedió a desinfectar el tubo. Primeramente se calentó el tubo durante 3 minutos con un mechero. Luego se introdujo un algodón previamente humedecido en una solución de alcohol al 70 % en el tubo. Seguidamente se dio un tiempo de espera de dos minutos y se abrió la llave del agua dejándola correr durante 5 minutos. Finalmente se abrió una bolsa estéril y se tomaron aproximadamente 60 ml de agua para hacer el análisis.

El tanque #5 se muestreó en una de las llaves que conducen al interior del autoclave siguiéndose un procedimiento de desinfección similar al descrito para el tanque #2, tomando aproximadamente 60 ml del agua proveniente de este tanque, en una bolsa estéril.

Previo a cada uno de los muestreos se determinó la concentración de cloro residual (Cl_r) en el agua de cada uno de los tanques muestreados. La determinación se llevó a cabo con un *kit* de Arch Chemicals, utilizado para medir la concentración de cloro residual en piscinas; este kit se basa en la determinación del cloro mediante una reacción con la ortotolidina y su resultado se lee usando un procedimiento comparativo basado en un estándar de color para cloro residual. Este método es bastante sensible para detectar cloro residual de 0.1 a 3 ppm.

Para la determinación del Cl_r se añadieron 5 gotas de la solución de ortotolidina a la muestra de agua colocada en la celda del test y se obtuvo un color amarillo con intensidad proporcional a la cantidad de cloro residual de la muestra a analizar.

Finalmente se tomaron las tres muestras y se colocaron en hielo para mantenerlas durante el transporte y su posterior análisis unas pocas horas después.

Estas muestras se llevaron al laboratorio acreditado CEQIATEC, en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, en donde fueron evaluadas con un recuento total de microorganismos presentes en el agua y una prueba de número más probable (NMP) para la determinación de coliformes totales y fecales, a aquellas muestras a las que se les iba a aplicar un análisis microbiológico.

El protocolo seguido para la evaluación de las muestras fue el contenido en Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th ed.1995 APHA-AWWA-WET.

Análisis Sensorial y Físico del Producto Terminado

Estas pruebas se realizaron a un lote de producción para determinar la conformidad del producto terminado con los estándares determinados por la empresa, al mismo tiempo que se pudo valorar las condiciones del enlatado y las posibles consecuencias que estas podrían tener en el producto terminado.

Se tomaron cuatro latas de atún lomo en trozos 170 g (azul) y otras cuatro latas de atún lomo en trozos 110 g (azulito) obtenidas del lote procesado el día anterior y almacenado en la bodega.

Se procedió a determinar el peso bruto pesando cada una de las latas de ambos productos sin abrir. Luego se determinó el peso neto de las latas de ambos productos al restarle al peso bruto el peso de una lata sellada vacía. Inmediatamente se utilizó el vacuómetro para medir el vacío presente en cada una de las latas y con la ayuda de un pie de rey se midió el espacio libre de la lata (profundidad de la cubeta).

Posteriormente se abrió la lata sin despegar completamente la tapa y se colocó hacia abajo sobre un recipiente, de manera que se permita la filtración del líquido de cobertura (aceite y agua salada) durante tres minutos.

Seguidamente se pesa la lata escurrida y se obtiene el peso escurrido del producto al restar el peso estándar de la lata vacía.

Luego se midieron el aceite y agua contenidos en el líquido de gobierno al transvasar el filtrado del recipiente receptor a una probeta, mirando cuidadosamente la apariencia del líquido de gobierno. Se dejó reposar por dos minutos esperando que las diferencias de densidades en los líquidos sea palpable y se procedió a medir la cantidad de agua obtenida del filtrado del líquido de gobierno, para luego medirse el aceite cuyo dato se obtuvo al leer completamente la cantidad de líquido en la probeta y restarle la cantidad de agua medida anteriormente.

Después de obtenerse el peso escurrido se pasó el atún a través de una criba de 12 mm (1.2 cm) de modo que se retuvieran los trozos de atún y que únicamente pasará el fleco. Se tomaron por aparte los trozos de atún y el fleco para que pudieran ser pesados y reportados como porcentaje.

Después se colocó el atún sobre un plato y se procedió a observar cuidadosamente la apariencia y propiedades del atún para que se pudiese evaluar con los puntos establecidos en la Norma Técnica para el Aseguramiento de la Calidad del Atún Enlatado, propuesta por el Instituto Nacional de la Pesca (México) en diciembre de 1991 y que vela por el aseguramiento de la calidad de los productos de la pesca. Se observó la textura del atún, la compactación de la pastilla, el color, olor y sabor, así como la presencia de materia extraña. Se utiliza esta norma debido a que se fijan parámetros más exigentes que los que existen en el país.

El análisis de cloruros se realizó al tomar 10 gramos de atún, sin importar si era lomo en trozos o fleco, y licuarlos en 90 ml de agua durante un minuto. Luego se filtró el licuado y se tomaron 5 ml para hacer la prueba de cloruros con un conductímetro.

Finalmente se les asignó un valor a cada una de las formas de presentación del atún para que se pudiera reportar en el análisis de los parámetros cuantitativos y cualitativos.

Por su parte las pruebas de vida útil (anaquel) se realizaron al tomar cuatro latas por lote de producción e incubarlas durante 10 días a 37°C. Transcurrido este tiempo se vuelven a incubar, esta vez, a 55°C durante el mismo período de tiempo.

Posteriormente se toman las latas y se evalúa si existe algún tipo de abombamiento o corrosión (externa e interna) en las latas. Asimismo se evalúa si no existen desprendimientos de barniz y posible formación de precipitados (FeS).

Pruebas de Omnipresencia de Microorganismos

Se realizaron pruebas de omnipresencia de microorganismos con el objetivo de verificar la eficiencia de los procedimientos de limpieza utilizados en CENSA, estas pruebas se llevaron a cabo en dos ocasiones en las etapas de limpieza del atún, llenado y sellado principalmente.

Se solicitó a la compañía la compra de 50 unidades de placas Petrifilm con medio de cultivo Agar Estándar, así como de 50 unidades Quick Swab para el frotis de los diferentes sitios seleccionados.

Para iniciar la prueba se seleccionaron los sitios de muestreo. Se determinó que se debía de hacer un muestreo a cada una de las mesas de limpieza (pelado) del atún, a la mesa de fleco, las canastas plásticas de transporte de atún, salas de limpieza y destace, Carruthers (llenadoras), cámara de hielo y manos del personal.

Los muestreos se llevaron a cabo utilizando los métodos de contacto directo, control ambiental y con hisopo (Quick Swab).

Método Contacto Directo: Se procedió a hidratar las placas Petrifilm al añadirse un mililitro de una solución hidratante (caldo de lecitina) sobre la placa y dejando caer la lámina plástica sobre la solución hidratante. Posteriormente, y con mucho cuidado de no esparcir el líquido fuera de la placa, se colocó el difusor y se presionó durante cinco segundos sobre la placa de manera que se pudiese dar la forma redondeada a la placa. Luego se dejó reposar durante una hora, antes de hacer el muestreo.

Una vez que se tenían las placas hidratadas se abrió la placa y se colocó directamente la parte plástica de la placa directamente sobre el sitio de muestreo. Con este método se muestrearon los sitios mesa de fleco, bandas llenadoras de los Carruthers y las manos del personal.

Método de Control Ambiental: Se hidrataron las placas de la misma forma en que se hidrataron para el método de contacto directo y se les dio un tiempo para la hidratación de una hora. Una vez que se cumplió el tiempo se colocó la placa Petrifilm por el lado que une las dos partes de la placa, en una prensa y se abrió extendiendo la parte plástica de la placa hacia atrás, teniéndose el cuidado de no tocar el área circular de crecimiento.

Finalmente se expuso la placa Petrifilm durante un tiempo de 15 minutos. Cumplido el tiempo se retiró la placa del sitio de muestreo.

Método del hisopo (Quick Swab): Se tomó un Quick Swab y se procedió a romper el seguro de la burbuja que contiene caldo letheen, de manera que al presionarse se descendiera el caldo y humedeciera el hisopo de dacrón. Luego se extrajo el hisopo del tubo estéril no sin antes presionarlo en las paredes del tubo para evitar excesos y se procedió a frotar el hisopo lenta y completamente en un área de 20 cm², que se había medido previamente, y se repitió esta operación de tres veces sobre la superficie en direcciones distintas. Seguidamente se regresó el hisopo al tubo con el caldo Lethen y se agitó vigorosamente durante 10 segundos.

Por último se inoculó el contenido del tubo en una placa Petrifilm deshidratada, siguiéndose un protocolo similar al de hidratación de las placas seguido en los pasos anteriores.

Una vez que se tuvieron las muestras, independientemente del método, se rotularon y se colocaron en la incubadora durante 48 horas a 36°C.

Al concluir el tiempo de incubación se realizó un conteo directo de las UFC's presentes en cada una de las placas. En aquellas placas donde se apreció una cantidad considerable de UFC's los conteos se hicieron tomando cuatro cuadrículas de 1 cm² y sacando un promedio de las cuadrículas para poder reportar el dato en UFC's/cm².

RESULTADOS

Prueba de Histamina

Para lograr determinar la concentración de histamina en las muestras de atún crudo y enlatado tomadas en CENSA se calibró el lector de las placas de microtitulación (STAT FAX EIA READER) a una longitud de onda de 650 nm, específica para efectuar la medición de la absorbancia de la histamina. Los resultados de la absorbancia se aprecian en la tabla 3.

Se debe de recordar que los primeros seis datos de cada una de las pruebas indican las pruebas control que permiten reconocer el buen funcionamiento del equipo de lectura de las placas de microtitulación. Se logró observar que en cada una de las pruebas corridas, los controles mostraron las concentraciones esperadas y correctas para cada uno de ellos. La empresa determinó una concentración máxima de histamina de 30 ppm, acorde con la norma propuesta por la Unión Europea, para la recepción de materias primas.

Tabla 3. Absorbancia y concentración de histamina en cuatro diferentes pruebas realizadas a la materia prima para la producción de atún enlatado en CENSA.

Prueba#1 Fecha: 30 de enero

Pozo	Absorbancia	ppm
1 C1	1,934	0,0
2 C2	1,527	2,5
3 C3	1,397	5,0
4 C4	1,04	10,0
5 C5	0,775	20,0
6 C6	0,522	50,0
7	2,057	0,0
8	1,942	0,0
9	1,858	0,02
10	1,85	0,3
11	1,811	0,4
12	1,87	0,2

Prueba # 2 Fecha: 19 de febrero

Pozo	Absorbancia	ppm
1 C1	1,34	0,0
2 C2	0,994	2,5
3 C3	0,834	5,0
4 C4	0,728	10,0
5 C5	0,53	20,0
6 C6	0,453	50,0
7	1,447	0,0
8	1,159	0,0
9	1,371	0,0
10	1,473	0,0
11	1,481	0,0
12	1,598	0,0

Prueba #3 Fecha: 24 de abril

Pozo	Absorbancia	ppm
1 C1	2,268	0,0
2 C2	1,833	2,5
3 C3	1,66	5,0
4 C4	1,22	10,0
5 C5	0,989	20,0
6 C6	0,793	50,0
7	2,18	0,2
8	2,15	0,3
9	2,157	0,2
10	2,141	0,3
11	1,82	2,4
12	1,72	4,3

Prueba comparativa .Fecha: 2 de mayo

Pozo	Absorbancia	ppm
1 C1	1,873	0,0
2 C2	1,593	2,5
3 C3	1,536	5,0
4 C4	1,285	10,0
5 C5	0,867	20,0
6 C6	0,544	50,0
7	1,974	0,0
8	1,963	0,0
9	2,055	0,0
10	1,827	0,4
11	1,767	0,9
12	1,871	0,0

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de CENSA.

En la prueba #1 del día 30 de enero se observa que en dos de las muestras, representadas en los pozos 7 y 8, no se encontró histamina en los tejidos; mientras que la concentración máxima de histamina reportada en esta prueba se encontró en la muestra ubicada en el pozo 11, al revelarse una concentración de 0,4 ppm de histamina. También se pudo observar que para el descargue del día 19 de febrero (prueba #2), no se encontró histamina en ninguna de las seis muestras tomadas. Por su parte en la prueba #3, realizada el 24 de abril, sucedió todo lo contrario a lo mostrado en la prueba #2, mencionada anteriormente, ya que en cada una de las muestras se encontró histamina en una concentración mínima de 0,2 ppm en los pozos 7 y 9, además de una concentración máxima en el pozo 12 al reportarse una concentración de 4,3 ppm de histamina en la muestra.

Finalmente, en la prueba comparativa (prueba #4) se encontró que no había histamina en las tres muestras tomadas del atún almacenado en la cámara de almacenamiento, mientras que para las tres muestras de atún cocinado obtenidas en la sala de limpieza se encontró que dos de las muestras ubicadas en los pozos 10 y 11 revelaron una concentración de 0,4 y 0,9 ppm respectivamente.

Análisis de *Salmonella* sp

Una vez que se agregó la muestra sobre el test para *Salmonella* se esperaron 20 minutos para leer el resultado.

Para cada uno de los tres análisis realizados a la materia prima que se recibió en CENSA, durante las diferentes descargas de atunes enteros del primer semestre del 2002, la prueba inmuno-cromática aplicada reveló que sobre la zona de fijación, únicamente apareció una línea coloreada en el lugar indicado como control, mientras que en la zona blanco para el microorganismo (*Salmonella* en este caso) no se mostró coloración. Igualmente la prueba que se realizó al pescado almacenado en la cámara de almacenamiento se mostró de la misma manera que las anteriores, al marcarse únicamente la línea que indica el control. (Figura 3)

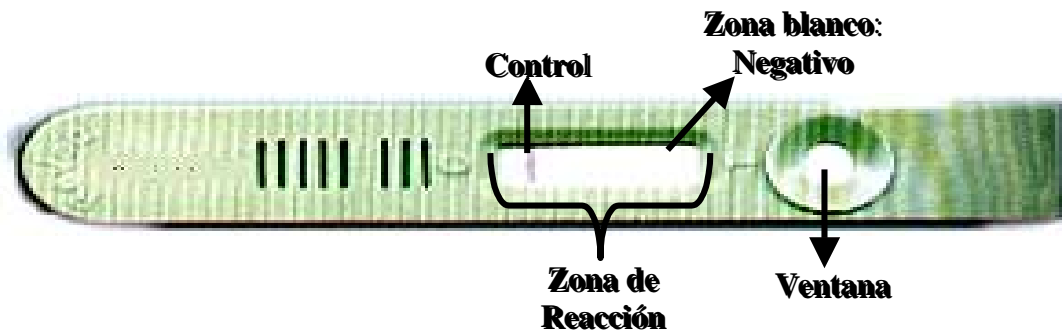


Figura 3. Resultado del test rápido inmuno-cromático Reveal® para *Salmonella* en las cuatro pruebas realizadas en CENSA.

Como se mencionó antes en cada una de las pruebas realizadas las placas inmuno-cromáticas se mostraron tal y como se observa en la figura 3. Al no presentar ambas líneas (la de control y la específica para el microorganismo blanco) se consideró el resultado como negativo.

Pruebas de identificación de *Listeria* sp

Transcurrido el tiempo especificado para el corrido de la muestra en el papel cromático del test **Reveal®** para determinación de *Listeria* sp se reveló de la forma que se aprecia en la figura 4.

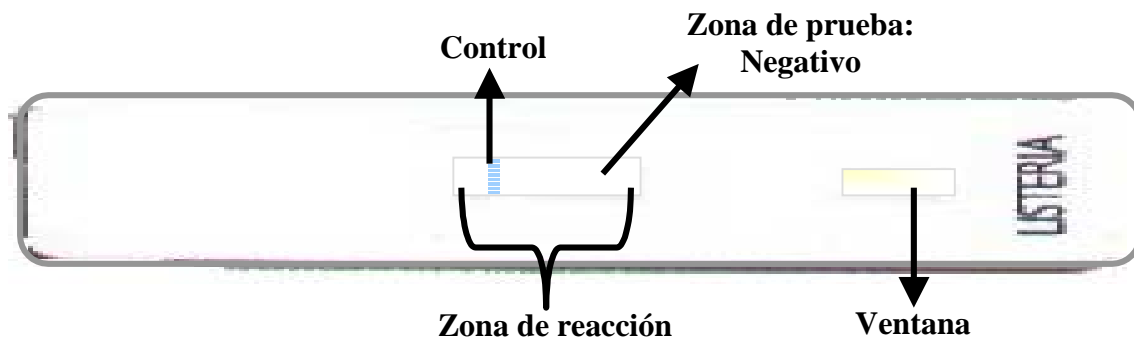


Figura 4. Resultado del test rápido inmunocromático Reveal® para *Listeria* sp en cada una de las pruebas. Únicamente se reveló la relación antígeno-anticuerpo en la zona de control de la placa.

El resultado que se observa en la figura 4, fue el mismo que se obtuvo tanto para las muestras tomadas durante las descargas, como para la muestra obtenida de la cámara de almacenamiento, de manera que para todas las muestras se determinó que el resultado del test fue negativo.

Prueba de Concentración de Sal en la Materia Prima

Las muestras tomadas indicaron concentraciones de sal inferiores al 2.5% exigido por la empresa para permitir la entrada de la materia prima en las cámaras de almacenamiento. En total se trabajaron 48 muestras durante el descargue y únicamente se encontró una muestra con una concentración de 3% en un atún (Figura 5).

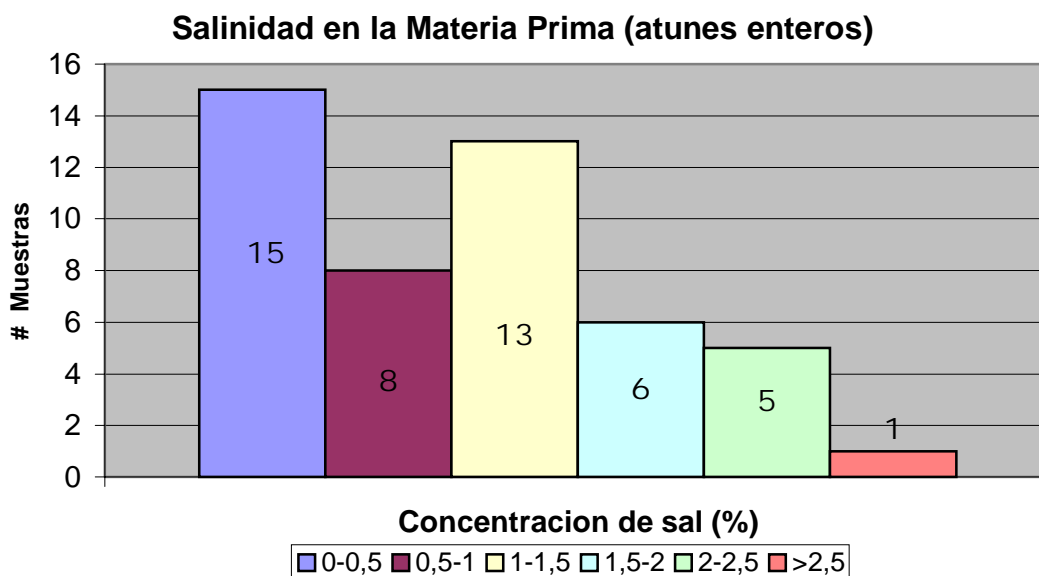


Figura 5. Determinación de concentración de sal en la materia prima. Números de muestras obtenidas en diferentes concentraciones de sal en la materia prima.

Además se observa que la concentración entre 0 y 0.5% de sal en la materia prima es la más común (15 muestras) al presentarse el 31% de las ocasiones. La concentración de 1-1,5% se encontró en 13 ocasiones de modo que se encuentra en el 27% de las muestras tomadas.

Análisis Sensorial y Físico del Producto Terminado

Luego de seleccionar las muestras y de seguir los procedimientos determinados se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Parámetros de control para el análisis cuantitativo y cualitativo durante el análisis sensorial y físico del producto terminado.

Presentación	Lomo en Trozos 307x209				Lomo en Trozos 211x110.5			
# Muestra	M-1	M-2	M-3	M-4	M-1	M-2	M-3	M-4
Peso Bruto (g)	218	209	211	210	134	133	135	134
Peso Neto (g)	185	176	178	177	110	109	111	110
Peso Drenado (g)	130	125	127	126	82	81	83	84
Aceite (ml)	29	32	24	30	12	17	16	15
Agua (ml)	31	28	30	33	17	16	14	14
Vacio	3	5	4	6	3	4	3	4
Espacio Libre	8,0	7,5	9,0	10,0	5,0	7,0	6,5	8,5
Traslape	1,02	1,03	1,08	1,1	0,81	0,81	0,95	0,84
p.H	6 - 7	6 - 7	6 - 7	6 - 7	6 - 7	6 - 7	6 - 7	6 - 7
% Lomo	76	62	74	71	73	72	86	86
% Fleco	24	38	26	29	27	28	14	14
Líquido de gobierno								
Apariencia	0	0	0	0	0	0	0	0
Came de atún								
1) Cloruros	2	2	2	2	2	2	2	2
2) Textura	0	0	0	0	0	0	0	0
3) Pastilla	0	0	0	0	0	0	0	0
4) Color	0	0	0	0	0	0	0	0
5) Olor	0	0	0	0	0	0	0	0
6) Sabor	0	0	0	0	0	0	0	0
7) Materia Extraña	0	0	0	0	0	0	0	0
Calificación Total	98	98	98	98	98	98	98	98

Al aplicársele un análisis de correlación entre los datos de cada una de las muestras del atún lomo en trozos 307x109, se encontró que los datos se relacionan en un 99% de manera que no se percibe ningún sesgo en el llenado de las latas, pues en lo que se refiere a los pesos bruto, neto y escurrido la diferencia es muy reducida mostrándose únicamente una diferencia en la muestra M-1 (8 gramos de diferencia en promedio frente a las demás).

El porcentaje de correlación entre los datos de cada parámetro fue igualmente del 99% para las muestras del atún lomo en trozos 211x110,5.

También se hizo un análisis de varianza ($g.l = 3; \alpha = 0.05$) para ambos productos obteniéndose, como resultado, que no existen diferencias significativas entre los datos de cada una de las muestras al ser tratados de manera general. Sin embargo al analizarse los parámetros individualmente, si se encontró que existen diferencias significativas en los pesos (bruto, neto y escurrido) de la muestra M-1 frente a las otras tres muestras. Además se encontraron diferencias significativas entre los traslapes de las muestras M-1 y M-2 frente a las muestras M-3 y M-4; estas diferencias se presentaron en el atún 307x109.

Por su parte en la presentación de 211x110,5 únicamente se presentaron diferencias significativas en el traslape entre la muestra M-3 y las restantes tres muestras.

En las pruebas de vida anaquel no se encontró ninguna evidencia de alteración, física o química, en ambos productos.

Análisis Microbiológico del Agua de Uso Industrial

En la tabla 5 se observan los resultados obtenidos para los tanques muestreados en CENSA.

Tabla 5. Resultados del análisis microbiológico de tres tanques de almacenamiento de agua.

Análisis Microbiológicos				
Lugar de Muestreo	Recuento total (UFC/ml)	Cloro residual Cl_r (ppm)	Coliformes 100ml	
			Totales	Fecales
<i>Callejón (Tanque #2)</i>	9.0×10^4	N.D	920	49
<i>Hielo (Tanque #1)</i>	190	0.5	<2	<2
<i>Autoclaves (Tanque #5)</i>	3.0×10^2	0.5	2.0	<2

Fuente: Análisis microbiológico de Aguas de Proceso CEQUIATEC. Cartago, abril 2002.

Como puede observarse en la tabla 5 específicamente en la parte relacionada al análisis microbiológico hay una presencia bastante considerable de coliformes totales (920) y coliformes fecales (49) en el agua tomada del callejón. Mientras que en los otros puntos de muestreo el dato de los coliformes, tanto totales como fecales, se mantiene en el valor mínimo de reporte (<2) con excepción del agua del autoclave en donde se encontró 2 coliformes totales en 100 ml.

Por otra parte el punto del callejón mostró la mayor cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC's) con 9.0×10^4 por mililitro, mientras que en el hielo se encontró la menor cantidad de UFC's al encontrarse únicamente 190 UFC/ml.

Pruebas de Omnipresencia

Luego de transcurrido el tiempo de incubación se procedió a sacar las muestras de las incubadoras y hacer el conteo de las UFC's/cm² en cada una de las placas Petrifilm. Finalizado el conteo se obtuvieron los datos que se agrupan en la tabla 6.

Tabla 6. Prueba de Omnipresencia de Microorganismos en diferentes áreas del proceso de enlatado de atún en la Compañía Enlatadora Nacional, Puntarenas.

LUGAR DE MUESTREO	# DE MUESTREOS	TIPO DE MUESTREO	CÓDIGO	UFC/CM²	
Área de Destace	1	Ambiental	DTC 04	199	161
Mesa de Fleco	2	Contacto Directo	MFC 01	130	36
			MFC 02	159	51
Mesas de Limpieza	3	Quick Swab Húmedo	MLZ 01	160	119
			MLZ 02	152	91
			MLZ 03	50	59
Canastas Plásticas	2	Quick Swab Húmedo	CPF	MNPC	127
			CPL	136	128
Carruthers (bandas)	2	Contacto Directo	CTB 01	MNPC	MNPC
			CTB 02	MNPC	MNPC
Carruthers (tanques)	2	Quick Swab Húmedo	CTL 01	121	110
			CTL 02	188	MNPC
Sala de Limpieza	2	Ambiental	SLZ 01	154	3
			SLZ 02	179	4
Cámara de Hielo	1	Ambiental	CH	160	69
Manos del Personal	2	Contacto Directo	MP 01	160	81
			MP 02	173	118
Atún Cocinado	2	Dilución 1/10	LM 01	N.D	21
			FC 01	N.D	44
Botas	1	Quick Swab Húmedo	BT 01	N.D	139

En las ocasiones en donde se reporta el dato de las UFC como N.D indica que la prueba de omnipresencia no se realizó en esa ocasión. Esto ocurrió en las pruebas de atún cocinado y botas que sólo se realizaron en la segunda ocasión.

Asimismo se utilizó el criterio de MNPC, que es el acrónimo para *Muy Numeroso Para Contar* cuando fue imposible contar las UFC en la placa Petrifilm por la distribución de las colonias por toda la placa observándose una coloración rosada y sin grumos.

❖ **Pruebas utilizando el Método de Contacto Directo:**

Estas pruebas se realizaron a la mesa de fleco, manos del personal y las bandas de los Carruthers. En la figura 6 se observó que existió una reducción significativa en el conteo de UFC's/cm² entre la prueba #1 y la prueba #2.

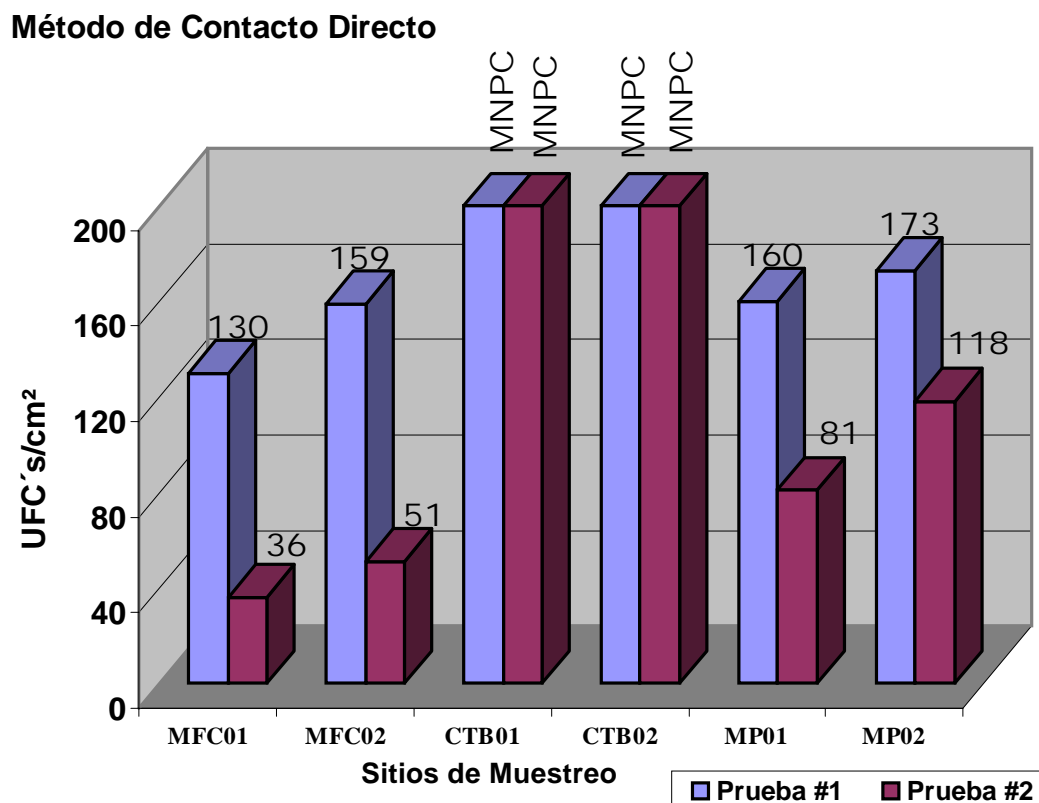


Figura 6. Pruebas de Omnipresencia por el método de contacto directo. Conteo de UFC's/cm² en diferentes sitios de la compañía Enlatadora Nacional.

Para las placas obtenidas en las bandas de los Carruthers de las líneas 1(CTB 01) y 2(CTB 02) se observó que el conteo de UFC's/cm² no se pudo llevar a cabo debido a que el crecimiento bacteriano fue muy numeroso para contar (MNPC).

Asimismo el resultado de las placas mostradas en la figura 6 reveló para el primer muestreo en la mesa de fleco (MFC01) una reducción de 94 UFC/cm² entre la primera y la segunda prueba, al pasar de 130 a 36 UFC's/cm², de manera que se logró obtener un valor que entró en el rango de 10-100 UFC's/cm² que determina un sitio limpio.

En la placa MFC 02 se contaron 159 UFC's/cm² en la primera prueba; mientras que para la segunda prueba el conteo se disminuyó hasta 51 UFC's/cm² para una reducción de 108 UFC's/cm² con respecto al conteo de la primera prueba.

Las pruebas codificadas como MP 01 y MP 02 se refieren a un muestreo realizado a las manos de la primera y la última persona que ingresó a la planta procesadora, luego de un recreo respectivamente, esto con el objetivo de verificar si el amonio utilizado para el lavado de las manos mantenía su acción desinfectante al entrar la última persona. Para la primera persona que ingresó a la planta luego del recreo, se contaron 160 UFC's/cm² y 81UFC's/cm² en la primera y segunda prueba respectivamente.

Para las muestras tomadas a la última persona que entró a la planta se contaron 173 UFC's/cm² en la primera prueba y 118 UFC's/cm² en la segunda. Con este resultado se determinó que el sitio no se puede identificar como un sitio limpio ya que sobrepasa el límite de 100 UFC's/cm² permitido.

❖ **Pruebas utilizando el Método de Control Ambiental**

En las pruebas de control ambiental se encontró, para la segunda prueba, una diferencia significativa con respecto a la primera prueba, principalmente en el área de limpieza en donde se contaron 154 y 179 UFC's/cm², en los sitios SLZ 01 y SLZ 02 respectivamente. Mientras que en los mismos sitios se contaron 3 UFC's/cm² en SLZ 01 y 4 UFC's/cm² en SLZ 02. (Figura 7)

Pruebas de Omnipresencia: Método Control Ambiental

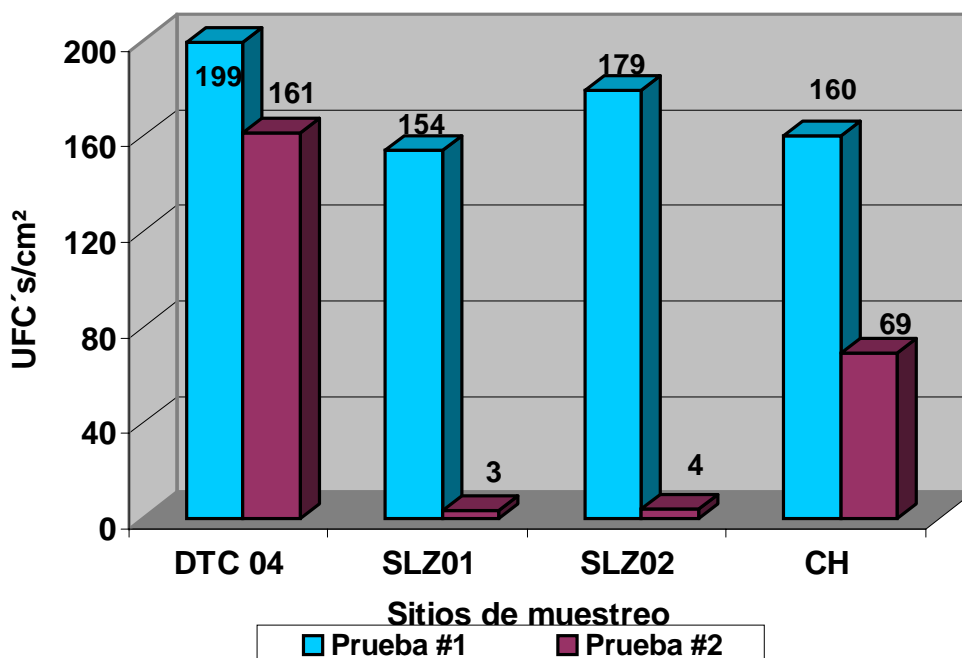


Figura 7. Pruebas de Omnipresencia por el método control ambiental. Conteo de UFC's/cm² en diferentes sitios de la compañía Enlatadora Nacional.

Para los muestreos ambientales realizados en el área de destace y cámara de hielo se encontraron 199 y 160 UFC's/cm², respectivamente, en la primera prueba. Este dato se redujo en el área de destace al contarse 161 UFC's/cm², sin embargo se sigue considerando como un sitio sucio. Asimismo en la cámara de almacenamiento se contaron 69.5 UFC's/cm² en la segunda prueba, lo cual significó una reducción en los conteos de ese sitio.

✧ Pruebas utilizando el Método del Hisopo (Quick Swab)

En los sitios en que aplicó esta prueba mostraron que no existió una reducción general en el conteo de UFC en las placas Petrifilm (Figura 8) esto porque se observó que mientras en unos sitios se disminuyó el conteo, por ejemplo en dos de las tres mesas de limpieza, canastas plásticas y el tanque de un Carruther, sin embargo esta reducción no fue tan significativa como se observó en los otros métodos. Además se observó que en dos sitios se incrementó el conteo de UFC, en una de las mesas de limpieza y en el tanque de uno de los Carruther.

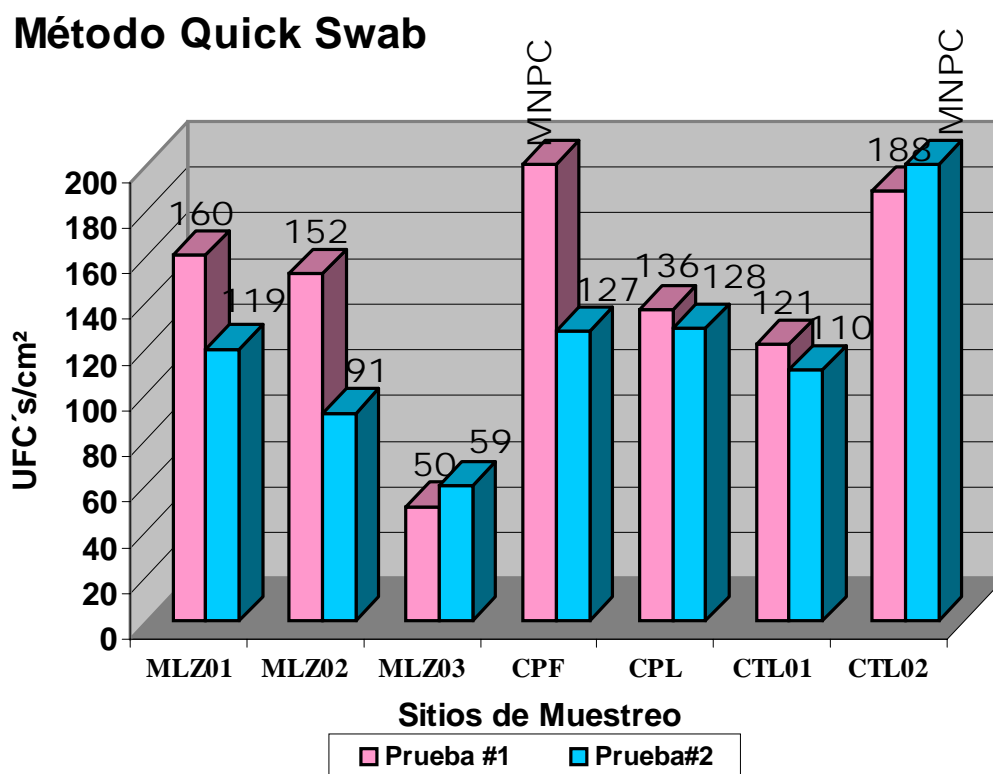


Figura 8. Pruebas de Omnipresencia por el método Quick Swab. Conteo de UFC's/cm² en diferentes sitios de la compañía Enlatadora Nacional.

En la figura 8 se indica el crecimiento de microorganismos en las canastas plásticas para atún cocinado y limpio. El dato más representativo se da en la canasta de fleco en donde se pasó de un conteo bacteriano MNPC, en la prueba #1, a 127 UFC's/cm² en la prueba #2. Para las canastas de lomo la diferencia fue de 8 UFC entre la primera prueba (136 UFC's/cm²) y la segunda (128 UFC's/cm²), diferencia que no es significativa pues es muy reducida además de que de todas maneras se mantiene fuera del rango de un sitio limpio.

Se pudo comprobar que la mesa de limpieza 3 (MLZ 03) es la que menos crecimiento de UFC's/cm² presenta en las placas para ambas pruebas, al contarse 50 UFC's/cm² en la primera prueba y 59 UFC's/cm² en la segunda prueba. Si bien aumentó el conteo para la segunda prueba, este siempre se mantuvo en el rango de un sitio limpio.

Contrariamente, en la mesa de limpieza 1 (MLZ 01) se reporta el mayor crecimiento bacteriano al contarse 160 UFC's/cm² y 119 UFC's/cm² en las pruebas #1 y #2 respectivamente, manteniéndose fuera de los límites establecidos para identificarse como un sitio limpio.

Finalmente en las muestras tomadas al lomo de atún y fleco limpio, se obtuvo un crecimiento de 21 UFC's/cm² para el lomo atún y de 44 UFC's/cm² para el fleco limpio. También se hizo un muestreo Quick Swab a las botas y se obtuvo un crecimiento de 139 UFC's/cm².

DISCUSIÓN

Concentración de Histamina

Precisar la concentración de histamina en la materia prima que entra a la empresa constituye un punto de control muy importante para el Aseguramiento de la Calidad de un producto alimenticio, ya que al conocer este dato es posible predecir el grado de alteración que puede alcanzar la materia prima durante el almacenamiento, al conocerse las condiciones de refrigeración de la empresa (RACCACH, 1989). Además de que se puede reducir la posibilidad de alguna reacción de hipersensibilidad inmediata en los posibles consumidores del producto terminado, en este caso, atún enlatado.



Figura 9 Coloraciones de los controles para la determinación de la concentración de histamina. La coloración azul indica que el conjugado se adhirió completamente en los sitios de unión de los anticuerpos. La degradación del azul al color rosado supone un aumento en la concentración de histamina en la muestra.

Al realizar las pruebas para determinar la concentración de histamina del pescado que entró a CENSA durante las descargas, se encontró que los controles con concentraciones de 0, 2.5, 5, 10, 20 y 50 ppm estuvieron bien en cada una de las pruebas, confirmando el buen funcionamiento del equipo (Figura 9). Dichas concentraciones están especificadas de esa manera para que sirvan de parámetro para generar una curva estándar, basándose en sus distintas densidades ópticas.

La prueba se llevó a cabo utilizando el *kit* Veratox[®] para Histamina que consiste en un análisis ELISA directo, en donde la histamina competirá con un conjugado (solución de histamina ligada químicamente a una enzima marcada) por los anticuerpos presentes en una placa de microtitulación, comprobándose la especificidad de los anticuerpos y la actividad catalítica de las enzimas para producir complejos coloreados a partir de un sustrato.

Esta prueba se considera ELISA directo competitivo, porque va orientada hacia la identificación de los antígenos, de manera que el antígeno se adhiera a los anticuerpos de la placa de microtitulación y se considera competitiva porque la histamina de la muestra debe competir contra el conjugado por los sitios de unión en el antígeno.

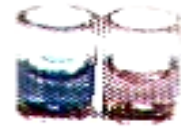


Figura 10. Pozos de microtitulación. Pozo de color más azul indica menor histamina, coloración rosada indica mayor concentración de histamina en la muestra

La histamina en la muestra es extraída por medio del diluyente buffer y es llevada a los primeros pozos para ser homogenizada junto al conjugado. Luego se llevó a la placa de microtitulación recubierta con anticuerpos específicos para detectar la histamina y el conjugado

El lavado con el wash buffer se hizo con el fin de deshacerse del conjugado y de la muestra que no lograron adherirse a los sitios de unión o que simplemente no encontraron sitios de unión libres.

Nuevamente se comprueba que la relación entre la absorbancia y la concentración de los controles genera un buen punto de referencia para obtener la concentración de histamina en las muestras.

Al añadirse el sustrato se comprobó la actividad de la enzima del conjugado para producir un compuesto coloreado de color azul, cuando se encuentra presente en la mayoría de los sitios de unión de los anticuerpos. Mientras que la solución Red Stop se aplica para dar color a aquellos pozos en los que hay cierta concentración el antígeno en los sitios de unión por lo que el compuesto azul producido por la actividad enzimática del conjugado con el sustrato es de menor intensidad, tornándose de un color rosado (Figura 11) de manera que el color va a ser proporcional a la cantidad de conjugado que logró unirse a los anticuerpos.

Se observó que en la prueba #1, llevada a cabo el 30 de enero, se encontraron concentraciones de histamina bastante bajas (<1 ppm) inclusive se logró determinar la ausencia total de histamina en los pozos 7 y 8. En este ensayo se comprueba que la

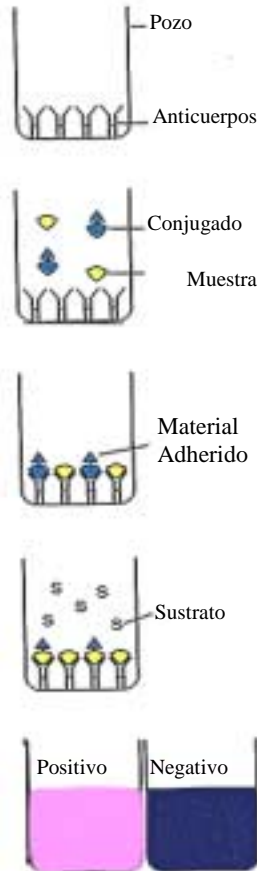


Figura 11. Método ELISA directo competitivo. Conjugado y muestras compiten por los sitios de unión al antígeno.

relación absorbancia-concentración de histamina de los controles va a permitir determinar la concentración de histamina de las muestras, esto por cuanto en esta prueba la absorbancia para el control con 0 ppm de histamina fue de 1.934, de manera que valores superiores a esa absorbancia obtenida en el control mostrarán una concentración de 0 ppm de histamina. Esto explica porque en los pozos 7 y 8 de esta prueba se reveló la ausencia de histamina (0 ppm) ya que tuvieron una absorbancia de 2,057 y 1,942 respectivamente.

Igualmente se puede observar como al obtenerse un valor de absorbancia menor al del control de 0 ppm, la concentración de histamina va en aumento. Tal es el caso de los pozos 9 y 12 que presentaron una concentración de 0,2 ppm con absorbancia entre los 1, 858 y 1,87; asimismo el pozo 10 reveló una absorbancia de 1,850 para una concentración de 0,3 ppm, mientras que el pozo 11 tuvo una concentración de 0,4 ppm para una absorbancia de 1,811.

Por otra parte en la prueba #3 se obtuvo la mayor concentración de histamina reportada durante la práctica al revelarse en el pozo 12 una concentración de 4,3 ppm con 1,72 de absorbancia, muy cercana a la absorbancia de 1,66 que se tuvo en el control de 5 ppm, comprobándose nuevamente que la relación entre la absorbancia y la concentración de los controles genera un buen punto de referencia para obtener la concentración de las muestras.

En la prueba #2 efectuada el 19 de febrero, se encontró que la totalidad de las muestras tomadas presentaron una concentración de 0 ppm. Esta situación pudo deberse a tres factores:

- El almacenamiento en el barco atunero fue muy eficiente y no permitió que la actividad enzimática y microbiana alcanzara al músculo estéril.
- Una mala preparación de las muestras.
- Talla del pescado.

Para la primera situación se explica la ausencia de histamina debido a que el primer sitio en el que se produce la histamina es detrás de las agallas del atún y es específicamente ese lugar desde donde se dispersa por todo el tejido muscular al progresar la descomposición del pescado. Además se debe mencionar que la zona cercana a la cola es en la que se produce gran cantidad de glucógeno, que posteriormente se convierte en ácido láctico, promoviendo un ambiente ideal para la formación de histamina.

Según Aguilar (1985), el atún vivo mantiene menos de 0.1 miligramos de histamina en sus agallas y manifiesta que la formación de histamina depende directamente de la temperatura, de manera que a 32 °C se produce el mayor grado de histamina, mientras que la formación de este compuesto decrece al bajar la temperatura, de modo que a 10 °C la formación de histamina en los tejidos es muy lenta.

Sabemos que por la época en el que se realizó la captura y la distribución de los cardúmenes, que el atún ingresado a la planta en el mes de febrero se encontraba en aguas del Océano Pacífico alrededor de los 17 °C (según distribución descrita en por Joseph *et al*; 1993), temperatura a la que la concentración de histamina aumenta lentamente.

Se podría inferir que los procedimientos de captura estuvieron bien dirigidos y muy probablemente utilizaron técnicas que incluyen una reducción en el tiempo de arrastre (posiblemente < a 2 horas), una muerte rápida una vez dentro del barco y un inmediato almacenamiento en condiciones de refrigeración y congelación, de forma que se pudiese reducir la temperatura del atún a -2°C en menos de una hora.

Al reducirse la temperatura se tiene una muy baja actividad tanto enzimática como microbiana, que pudo evitar la transferencia de la histamina desde las agallas hasta los tejidos musculares, al no existir una descomposición progresiva del pescado.

Cabe señalar que las muestras se obtuvieron del punto más cercano de la cola por lo que constituyen el punto más alejado de la zona de concentración máxima de histamina en el atún (agallas). Sin embargo por la gran cantidad de ácido láctico que se produce durante la muerte del pescado, esta zona se convierte en una buena fuente para determinar la concentración de histamina, ya que se forma un ambiente que permite la acción de aquellas bacterias responsables de esta reacción (principalmente *Proteus* sp).

Aguilar (1985) cita que durante un experimento realizado a un atún capturado y mantenido a 25 °C, se encontró que la concentración de histamina se mantuvo invariable durante 6 horas. Este experimento fue llevado a cabo por dos grupos distintos y ambos obtuvieron este mismo resultado, aunque difirieron en la rapidez con que aumenta la concentración de histamina a partir de las 12 horas a la misma temperatura.

Esta conclusión obtenida en este experimento podría justificar la ausencia de histamina en el atún muestreado en el mes de febrero, ya que permite inferir que se pudieron haber cumplido con los procedimientos descritos anteriormente y si se sabe que la concentración de histamina será invariable por aproximadamente seis horas, los esfuerzos por lograr almacenar a bajas temperaturas el atún en un tiempo menor, permitirán obtener más resultados como el de la prueba #2, siempre que no se presenten roturas o golpes en el pescado.

La otra situación que podría explicar la ausencia de histamina en las muestras es la mala preparación de estas. Esto pudo haber sucedido al pasar el filtrado a la solución diluyente buffer donde se pudo haber transferido una cantidad menor a la especificada (100 µl) lo que hubiese diluido aún más la muestra, aunado a que posiblemente la concentración presente en las muestras era muy baja.

También podríamos explicar que la cantidad de histamina presente en el pescado no era la suficiente para competir con el conjugado por los sitios con los anticuerpos de manera que durante el lavado se hayan desechado la poca histamina que pudo haber contenido cada una de las muestras.

En lo que respecta a la talla del pescado, la ausencia de histamina pudo deberse al tamaño del pescado que se utilizó para la prueba, ya que durante el descargue se tomaron muestras de atunes enteros de una talla >10 kg. Como para la prueba se toma el tejido más interno del trozo de carne extraído de un pescado entero, la concentración de histamina puede ser nula, ya que el tejido muscular -en condiciones naturales- es estéril para concentraciones de histamina y debido a lo grueso del pescado se retrasa la diseminación de histamina por todo el músculo del pescado.

En la prueba comparativa se observó que las muestras de atún cocinado presentaron mayor concentración de histamina, frente a las muestras de atún crudo. Esto se explica al saber que la concentración de histamina aumenta con la temperatura y va ligado a los cambios o alteraciones del pescado al ir saliendo de la rigidez cadavérica. Se observó como en el atún almacenado se encontró la ausencia de la histamina en esos tejidos, mientras que el atún ya limpio empezó a dar signos de desarrollo histamínico al presentar concentraciones de 0,4 y 0,9 ppm. Además se reportó una concentración de 0 ppm en el pozo 12, pozo que fue muestreado con atún limpio.

El aumento de la concentración de histamina en los pozos 10 y 11 se debe a que el atún pasa por un proceso de descongelación muy largo y en agua, que como se verá más adelante, está contaminada con coliformes fecales. Durante este período la actividad microbiana se hace más notable contribuyendo a la degradación de la histidina promoviendo así la formación de histamina.

Actualmente la Unión Europea establece un máximo permitido de 100 ppm, mientras que la FDA lo ha fijado en 50 ppm. Por otra parte en el Codex Alimentarius se establece una concentración de 20 ppm como máximo en cualquier muestra tomada.

Análisis de Salmonella y Listeria

Estos dos métodos se tratarán al mismo tiempo ya que tienen el mismo fin y la determinación de ausencia o presencia presuntiva de cualquiera de estos dos microorganismos están basados en el mismo principio. Para ambos casos la determinación se llevó a cabo mediante un test rápido para la determinación cualitativa de *Listeria sp* y *Salmonella sp* Reveal[®].

El test Reveal[®] es una prueba inmunocromática que posee una ventana redonda en donde se coloca la muestra a evaluar, de manera que pueda migrar a través de una membrana de nitrocelulosa hacia una zona de reacción que posee anticuerpos marcados con oro, específicos para cada uno de los microorganismos blanco. (Figura 12)

Ambas pruebas se basan en una técnica que permite la detección genérica del patógeno, *Salmonella* o *Listeria*, en materias primas y producto terminado. Primero se tiene una fase de pre-enriquecimiento, donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* o *Listeria* dañadas a una condición fisiológica estable. Esta función la cumple el medio REVIVE en la prueba para *Salmonella sp*, mientras que en la prueba para *Listeria*, el preenriquecimiento es llevado a cabo con el caldo Fraser (ver composición en el Anexo 4).

Seguido al pre-enriquecimiento, se lleva a cabo un enriquecimiento con un medio selectivo empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de interés, e inhibir otros organismos presentes en la muestra. De modo que para *Salmonella* se utilice el medio Rappaport Vassiliadis o Selenito Cistina (composición en el anexo 4), siendo el primero, el más recomendado para productos pesqueros. Mientras que el medio BLEB (acrónimo en inglés de Buffered *Listeria* Enrichment Broth) cumple la función de medio selectivo en la prueba para *Listeria*.

Finalmente se lleva a cabo la detección genérica por inmunocromatografía al utilizar anticuerpos específicos tanto para *Salmonella* como para *Listeria*.

En las pruebas realizadas a las materias primas durante el descargue se encontró que las muestras eran, presuntivamente, negativas para *Salmonella* spp y *Listeria* sp. Se llegó a esta conclusión al mirar el resultado de las placas inmunocromáticas en donde solo se marcó una línea en la zona de reacción, correspondiente al control agregado de la prueba y que permite comprobar el buen funcionamiento de la placa.

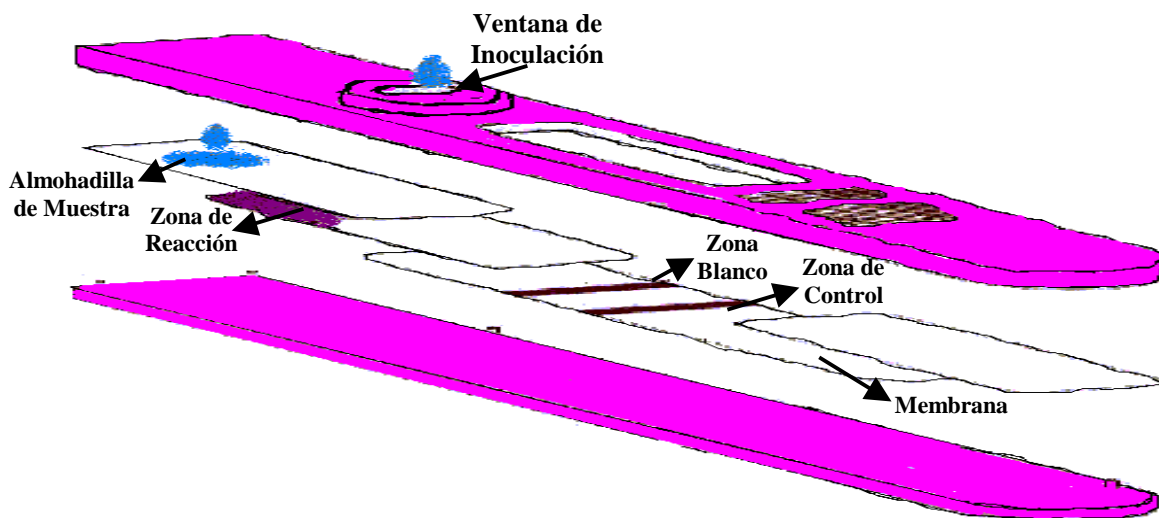


Figura 12. Descripción de los componentes que forman parte de una placa de ensayo inmunocromático.

El mismo resultado se obtuvo para aquellas muestras tomadas del atún que se encontraba en la cámara de almacenamiento.

En este tipo de prueba la muestra enriquecida se coloca en la ventana de inoculación desde donde llega a la zona de reacción que contiene anticuerpos específicos para el patógeno blanco (*Listeria* o *Salmonella*) conjugados con partículas coloreadas. Si el organismo blanco está presente, sus antígenos se unirán a los anticuerpos conjugados.

Esta unión provoca la formación de un complejo antígeno-anticuerpo que migra por toda la membrana desde la zona de reacción. En la membrana existe una zona de anti-anticuerpos del organismo blanco que captura el complejo y muestra una coloración visible. Se recuerda que esto es lo que sucede si el organismo blanco está presente.

El resto de la muestra continúa la migración hasta el fin de la membrana pasando por la zona de control que se presenta visible al pasar la muestra.

Análisis Sensorial al Producto Terminado

Este tipo de análisis permite determinar que se estén cumpliendo los parámetros de producción del producto, además tiene la ventaja de ser económico y rápido. (AGUILAR, 1985)

Estos parámetros se controlan por su importancia no solo en el ámbito de salud, sino también a nivel estético y económico del producto. (anexo 5)

El parámetro de espacio libre es muy importante pues va a permitir que el producto tenga suficiente espacio para dilatarse según las diferentes temperaturas a la que es sometido durante el proceso de elaboración. El vacío va ligado a este parámetro y es muy importante para evitar presiones internas excesivas en las latas en la autoclave, ya que esto deforma los sellos, lo que aumenta el potencial de deterioro por infiltración.

El traslape se midió ya que de él depende la eficiencia con que se está llevando a cabo el doble cierre de las latas y que les confiere hermeticidad. Un traslape muy bajo pondrá en peligro la hermeticidad de los envases.

También se evaluó la concentración de sal (NaCl) en el líquido de gobierno y en la carne de atún mediante el uso de un conductímetro que permite determinar la concentración de sal en las muestras. Una concentración de sal óptima es aquella que tendrá entre 1 y 1,5%, ya que esta es una concentración que permite reducir la actividad del agua (A_w) del alimento sin alterar considerablemente el sabor del producto. Además le confiere al alimento una propiedad bacteriostática, que es la capacidad de la sal de inhibir el crecimiento de microorganismos, por disminución de la solubilidad del oxígeno en el agua, eliminando la posibilidad del desarrollo de bacterias aerobias y contribuye a que se produzca la plasmólisis de la célula bacteriana.

Para esta prueba se obtuvo una concentración de sal menor al 1% en todas las muestras razón por la cual se otorgó un valor de 2 puntos en la calificación del parámetro por no cumplir con la concentración ideal de sal (ver anexo 5). Se restan estos dos puntos de la calificación total ya que al no cumplir con el parámetro propuesto se reduce el efecto, anteriormente descrito, de la sal en el producto terminado.

La textura, se refiere a si la carne del producto enlatado es firme, blanda o pastosa, de modo que puede comprobarse que cumpla con la presentación del atún enlatado. La forma o estructura de la pastilla de atún al ser sacada de la lata también es evaluada, ya que un atún que al ser sacado de la lata presenta un alto porcentaje de carne desmenuzada, indica que se le ha agregado mucho fleco al producto o que la carne probablemente se encontraba un poco disgregada desde el mismo momento en que se enlató. En este punto se unifican la textura y forma de la pastilla para verificar que el producto terminado, está en buenas condiciones.

Otros parámetros de control son el olor y el sabor, estos parámetros son muy importantes ya que indican el grado de alteración o contaminación que el producto pudo haber sufrido durante su elaboración. Se pudo determinar que no existieron variaciones en la presentación normal del producto como lo serían un sabor amargo, picoso, quemado o muy salado y un olor desagradable que indicara contaminación o una alteración del producto.

De igual forma se verificó la presencia de material extraño en cada una de las latas muestreadas. Con este parámetro se evalúa la eficiencia con que se están llevando a cabo las labores de limpieza del atún, por lo que se buscó cualquier material ajeno al producto y que constituyera una fuente de contaminación física.

Algunos ejemplos de material extraño que podrían caer en el producto son trozos de piel y espinas, sin embargo dadas las condiciones en que se trabaja en CENSA, también se podría encontrar materia extraña proveniente de fragmentos de las canastas plásticas, en las que se lleva el atún pelado a las llenadoras, así como fibras de las esponjas pulidoras utilizadas para el lavado de los equipos de llenado, que quedan retenidas en las parrillas de las llenadoras y que eventualmente podrían caer en los alimentos.

Se observó al hacer un análisis de correlación que las diferencias en los pesos de las muestras no son significativas en el llenado y a pesar de que son variables, se mantienen cerca del peso predeterminado en la etiqueta; que para la presentación del atún “azulito” (lomo en trozos 110g) se establece un peso neto de 110 g y un peso escurrido de 82 g. En el caso del peso neto se observó que se cumple en un 100% ya que al promediar las cuatro muestras tomadas (110 –109 – 111 – 110) se obtuvo un peso de 110 gramos, mientras que en el caso del peso escurrido al promediarse los pesos de las muestras (82-81-83-84) se obtuvo un promedio de 82,5 g, de manera que se puede inferir que la producción de ese día tendría un +/- 0,5 g de diferencia con respecto a lo especificado en la etiqueta.

Por su parte en la presentación de atún “azul” (lomo en trozos 307x209) el peso escurrido se ha establecido en 125 g, un poco más bajo que el de las muestras en las que se obtuvo un peso promediado de 127 g. En el caso del peso neto este se ha señalado en 170 g, peso que no pudo ser cumplido en el lote muestreado, ya que todas las muestras sobrepasaron ese peso en una diferencia promediada de 9 g, con una diferenciación máxima de 15 g y una mínima de 6 g, valores muy por encima de los aceptados por la Norma Técnica de Aseguramiento de la Calidad para Atún Envasado, que establece que para la presentación de 307x109 se permite una variación máxima de 3.5 g en el peso neto.

Se pudo observar que el peso escurrido se mantuvo dentro de lo establecido en la norma antes mencionada (variación máxima de 3,5 g), por lo que la gran variación en el peso neto no se debió exclusivamente al añadir más carne de la cuenta, sino que pudo deberse a que se agregó una mayor cantidad de los líquidos de gobierno en las latas.

Este aumento en el peso neto trae consigo una pérdida económica para la empresa al utilizar mucho más insumos de los que se necesitan, además otras implicaciones de tipo estético para las latas, ya que estas se ven más llenas y se observan como abombadas, por lo que en centros de distribución no son aceptadas por prevención, ya que no existe una certificación que indique que dicho abombamiento se debe a que se agregó mucho más producto. De manera que se tienen que desechar gran cantidad de producto innecesariamente.

Este llenado excesivo también reduce el espacio libre y el vacío en las latas con la consecuente alteración de los cierres debido a las presiones internas a las que se somete la lata en el autoclave, aumentando la posibilidad de que exista contaminación por infiltración. (GARCÍA, 1992)

Finalmente la calificación total indica el grado de calidad del producto según la Norma Técnica de Aseguramiento de la Calidad para Atún Envasado propuesta por el Instituto Nacional de la Pesca (anexo 5), ya que según esta norma existen tres grados de calidad que son los siguientes:

1^{era} Calidad: 90 – 100 puntos.

2^{da} Calidad: 80 – 89 puntos.

3^{era} Calidad: 75 – 79 puntos.

De modo que la calificación total obtenida para cada una de las muestras (98) permite asegurar que el producto producido es de primera calidad, ya que todas sus características son muy buenas.

Concentración de Sal en la Materia Prima

La concentración de sal en la materia prima es un punto de control que permite la recepción o rechazo de los atunes enteros provenientes del barco. El límite establecido por la compañía es de 2,5% de concentración de sal.

La penetración de la sal es progresiva debido a gradientes de potencial osmótico entre los tejidos musculares del pescado y el entorno que los circunda durante su almacenamiento, de manera que la concentración de sal es mayor en la piel y en las primeras capas musculares; es por eso que para las pruebas se extrajo el tejido más cercano a la columna vertebral del atún.

El pescado grande (talla >10 kg) posee menor área de superficie por kilogramo, mientras que el pescado pequeño (talla 2-3½ kg) posee una mayor área de superficie por kilogramo. De manera que el contenido de sal por kilogramo es mayor en el pescado pequeño. (AGUIRRE, 1988)

En los resultados se observa que hay 15 muestras en la concentración de 0 – 0,5% de sal, de las cuales 13 corresponden a atunes de talla >10 kg; mientras que solo 2 muestras correspondieron a pescado pequeño.

Por el contrario la única muestra que superó la concentración de sal permitida fue obtenida de un pescado pequeño de la especie conocida como skipjack o barrilete.

La razón por la que este pescado poseía una concentración tan elevada de sal pudo deberse a lo manifestado por Aguirre (1988), de que a menor tamaño mayor concentración de sal en el tejido muscular, pero también pudo deberse a que quizás fue de los últimos pescados en ser sacados del contenedor y estos siempre presentan concentraciones altas de sal como consecuencia de que la sal precipita y se va acumulando en el fondo por lo que los últimos pescados se ven sometidos a un estrés osmótico mucho mayor.

Análisis Microbiológicos Para Aguas de Uso Industrial

Los análisis de recuento total solicitados al laboratorio certificado CEQIA TEC se hicieron para verificar la calidad del agua que se utiliza en puntos importantes del proceso de enlatado de atún. Los análisis solicitados incluyen aguas que se utilizan en los procesos de descongelado, enfriamiento y producción de hielo.

La muestra tomada del área del callejón es utilizada en el proceso de descongelación del atún y es sacada del subsuelo (pozo). Se encontró que la muestra contenía 9.0×10^4 microorganismos en el recuento total, de los cuales se determinó la existencia de 920 coliformes totales y 49 coliformes fecales.

Este dato es muy preocupante ya que a estos valores se le debe de agregar que es un agua no potable y que tampoco es clorada.

Esta condición del agua empleada en CENSA es claramente censurada en la sección de Higiene de los Alimentos del Codex Alimentarius (Vol I, 1991) en donde se establece como principio general que “*en la manipulación de los alimentos solo deberá utilizarse agua potable...*” .

El problema es que el atún congelado es colocado en las pilas de descongelación durante aproximadamente 8 horas, tiempo suficiente para que se inicie un proceso de descomposición del pescado al salir de la fase de *rigor mortis* y pasar a la fase de *post-mortis* en donde se producen alteraciones como consecuencia de la reactivación de las actividades enzimáticas y microbianas. El aumento de la temperatura del pescado induce la formación lenta de histamina a través de los tejidos musculares.

Sin embargo esto no es tan crítico ya que el atún, alcanza una temperatura máxima de 4°C, luego de transcurrido el tiempo de descongelación, temperatura en que la velocidad de las reacciones es muy lenta por lo que no se observan alteraciones palpables en el atún; pero tampoco debe de obviarse que el agua del callejón constituye un riesgo para la salud, por la gran cantidad de coliformes presentes en el agua.

Por otro lado la prueba al agua de los autoclaves y que se utiliza en el enfriamiento de las latas mostró un resultado de 3.0×10^2 en el recuento total, a pesar de que esta es agua potable obtenida del alcantarillado público y almacenada en un tanque en la empresa. Se dedujo que la contaminación del agua utilizada para el enfriamiento proviene, en gran parte, del tanque de almacenamiento.

Según RACCACH (1989) el agua de enfriamiento es la responsable inmediata de la contaminación microbiológica causada por infiltración en un alimento enlatado, por lo que es importante que el agua utilizada en el enfriamiento no esté contaminada para reducir la probabilidad de infiltraciones en el producto terminado.

Se encontró que el agua de enfriamiento posee 300 UFC/ml, lo cual implica que en una gota de agua hay 15 UFC, ya que se acepta que en un mililitro hay 20 gotas de agua. Bajo esta condición, los sellos de los envases deben de proteger contra la entrada de 1/15 parte de una gota de agua para evitar la contaminación bacteriana del producto.

Se pudo inferir que si las latas son llenadas excesivamente, como pudo apreciarse en el análisis sensorial del producto terminado, se puede llegar a tener problemas de contaminación por infiltración, sin embargo esto nunca ha sucedido ya que todos los lotes de producción han logrado pasar eficientemente la cuarentena de 10 días predeterminada por la empresa, lo que indica que de existir contaminación por infiltración esta no contempla bacterias formadoras de gas ya que no se observaron indicios de hinchazón.

Tampoco se debe de descartar la posibilidad de que la contaminación incluya bacterias del tipo “flat sour” resistentes al calor y que provocan un aplanamiento en las latas.

Pruebas de Omnipresencia

Esta prueba se realizó con el objetivo de evaluar los procedimientos de limpieza de la empresa y el uso de los químicos utilizados para la desinfección de los equipos y del personal. El recuento de las UFC se realizó con un sistema de dos lupas, la primera con un aumento de 4X y la segunda con un aumento de 2,45X.

Se consideró el parámetro establecido por la *International Technical Foods Services* en el que se especifica que un sitio limpio es aquel que se encuentra en un rango de 10-100 UFC/cm².

Se realizaron pruebas de omnipresencia utilizando el método de contacto directo, a aquellos puntos en donde el sitio entra en contacto directo y constantemente con las manos del personal. Se incluyó la banda del Carruther que es en donde los empleados colocan manualmente el atún y lo van compactando de manera que lo tocan con las manos en todo momento. El otro punto fue la mesa de revisión de fleco que es en donde se limpia el fleco de carne oscura y espinas, por lo tanto entra en contacto directo con las manos del personal. Finalmente se muestrearon las manos del personal.

Estos muestreos se llevaron a cabo con el método directo porque permiten recoger datos más representativos de la zona muestreada de una manera más rápida y segura de que se obtenían todos los microorganismos que se encontraban en el área designada para el muestreo (20 cm² que era el diámetro de la placa)

El método de control ambiental se llevó a cabo en tres áreas muy importantes para el proceso como lo son el área de limpieza, el área de destace y la cámara de hielo.

Se escogió este tipo de muestreo en estos sitios para determinar el grado de contaminación al cual están expuestas las materias primas en distintos momentos del proceso y que podrían considerarse como lugares de riesgo ante contaminantes externos.

Por último se usó el método Quick Swab en aquellos puntos difíciles de muestrear o que presentaban irregularidades en la superficie, de manera que se permitiera obtener un recuento completo del área seleccionada (20 cm²)

Las pruebas se realizaron inmediatamente después de haber concluido la limpieza preoperacional en la compañía, con el objetivo de que se pudiera observar una reducida cantidad de UFC al haberse desinfectado recientemente y que se cumpliera con el parámetro óptimo de limpieza, 10- 100 UFC/cm² en un lugar limpio.

Para la primera prueba se encontró que en la banda de los Carruthers el crecimiento microbiano fue muy numeroso para contar (MNPC) un dato que revela lo poco eficientes que son los procedimientos de limpieza en CENSA, ya que la muestra se tomó inmediatamente después de concluir el preoperacional en donde al equipo se le aplicó vapor durante ocho minutos, se lavó con jabón y abundante agua y se le añadió una cantidad imprecisa de amonio cuaternario. Además los operarios todavía no habían tenido contacto con la banda pues todavía no habían empezado a laborar.

Se consideró la posibilidad de que la carga bacteriana en la banda del Carruther sea tan alta que no se haya podido reducir al mínimo, sin embargo dadas las condiciones y la aplicación que se hace de vapor se considera que esta posibilidad es bastante remota como para que se haya dado este resultado.

Asimismo se debe mencionar que las bandas son de un material poroso que dificulta las labores de limpieza, favoreciendo el desarrollo microbiano en esa área.

El muestreo realizado al tanque del Carruther mostró que el número de UFC's/cm² se mantuvo por encima del parámetro establecido para un lugar limpio (CTL 01: 121 UFC's/cm², CTL 02: 188 UFC's/cm²). Este caso es un poco distinto al anterior ya que en este el hisopo se colocó en un caldo letheen, el cual permite el desarrollo bacteriano e inhibe la actividad desinfectante del amonio cuaternario, mientras que para las bandas del Carruther al ser un muestreo directo se recogían residuos del amonio que hubieran reducido el crecimiento microbiano, sin embargo esto no se dio.

Se presume que la razón por la que el crecimiento es tan alto en las bandas de ambos Carruthers es porque los operarios no aplican directamente vapor sobre la banda, sino que se concentran en los rotadores y tanque de los Carruther, de manera que se limita el efecto esterilizante del vapor debido a las altas temperaturas. Sin embargo esta justificación no explicaría porqué el tanque tiene un conteo tan alto de UFC en las muestras.

La respuesta podría enfocarse hacia la eficiencia del amonio cuaternario utilizado como desinfectante, ya que como se mencionó antes, este amonio no tuvo un efecto residual en la prueba a las bandas de los Carruther ya que no limitó el crecimiento bacteriano en un muestreo directo en el que además de los microorganismos también se recogen los residuos del desinfectante empleado, en este caso el amonio.

Lo anterior nos hace suponer que el amonio cuaternario no está siendo eficaz, esto podría deberse a varias situaciones; la primera de ellas involucraría la concentración del amonio cuaternario que se usa ya que este se agrega en una cantidad no medida en un recipiente de 14 litros para hacer el lavado, de manera que es casi un hecho que la concentración de amonio no alcanza los 700 ppm que requieren para la desinfección de equipos.

Otra situación podría deberse a que no se le está dando un tiempo prudencial para que el amonio pueda reaccionar y mantener su actividad desinfectante, se menciona esto porque los operarios lavan con agua el amonio tres minutos después de haberlo aplicado.

Finalmente se determinó que es el tipo de amonio cuaternario el que es ineficiente para esta industria, ya que durante el tiempo de práctica se utilizó Cloruro de Benzalconio, un desinfectante activo contra bacterias grampositivas, pero que presenta la desventaja de ser inactivo contra esporas y de inactivarse en presencia de materia orgánica y jabones aniónicos.

La inconveniencia de usar dicho amonio se extiende a que no debe de aplicarse a instrumentos de metal ya que es corrosivo para este tipo de instrumentos, además se contamina fácilmente con bacterias gramnegativas, de modo que posiblemente sea una fuente de contaminación para los equipos en lugar de evitar el crecimiento bacteriano. Además el almacenamiento en la planta es en un sitio muy caliente, condición que afecta considerablemente las propiedades del compuesto. Finalmente se considera como un desinfectante de uso hospitalario para pisos y otras áreas comunes por lo que su uso en la industria alimentaria es completamente inútil.

La ineficacia del amonio se extiende a las manos del personal, ya que parte de los procedimientos de limpieza para la entrada a la planta involucran sumergir las manos en la solución con amonio cuaternario, debido a esto se realizó una prueba para verificar si el amonio perdía su acción desinfectante entre la primer persona que entró a la planta frente a la última que paso por el lavamanos.

El resultado obtenido (MP 01: 160 UFC's/cm², MP 02: 173 UFC's/cm²) no reveló una diferencia significativa que comprobara la hipótesis propuesta, pero comprobó una vez más que el amonio no funciona ya que las personas muestreadas se separaron 5 minutos para que pusieran sus dedos en la placa.

Las pruebas a las mesas de limpieza mostraron que, con excepción de la mesa #3, no se encuentran dentro del parámetro de un sitio limpio al sobrepasar las 100 UFC's/cm² permitidas.

La razón por la que la mesa #3 se mostró como un sitio limpio (MLZ03: 50 UFC's/cm²) podría deberse a que en ella casi no trabajan personas en la labor de pelado, por lo que la carga bacteriana puede ser reducida, contrario a las otras mesas en donde la desinfección, realizada con agua y jabón, no logra bajar la carga completamente.

En lo que respecta a las canastas plásticas se encontró que esta labor es muy deficiente ya que únicamente se lleva a cabo con agua y jabón sin aplicar ningún otro desinfectante y se comprobó al observar que en una canasta de fleco recién lavada se encontró la placa con crecimiento bacteriano MNPC. Estas canastas son usadas para contener el fleco y pueden pasar en esas canastas casi dos horas por lo que resulta crítico que antes de iniciar el proceso se encuentren con una concentración alta de microorganismos en la canasta.

En las pruebas de control ambiental se observó que se sobrepasó el límite de un lugar limpio en los tres sitios muestreados (destace, limpieza y cámara de hielo).

Los muestreos en el área de destace y sala de limpieza se realizaron en un momento en el que se encontraba el mayor pico de actividad en esas áreas por lo que resulta comprensible la movilidad de gran cantidad de microorganismos en el aire.

Se observó que en el muestreo SLZ02 se reportaron 179 UFC's/cm² mientras que en SLZ01 se contaron 154 UFC's/cm²; esta diferencia pudo deberse a que el muestreo SLZ02 se ubicó cerca del área de sellado en una zona en donde la temperatura es más alta y hay gran movimiento de personas de una sala a otra, por lo que esto influyó en el crecimiento bacteriano en las placas.

La cámara de hielo obtuvo un valor muy alto, 160 UFC's/cm² pero pudo deberse a que en ese momento habían personas dentro de la cámara de hielo, además de que una de las compuertas se encontraba abierta. Estos eventos pudieron haber afectado el conteo en un sitio en donde, se supone, debería de haber poco desarrollo microbiano en el aire debido a la poca circulación de aire y baja temperatura.

Para la segunda prueba se hicieron ciertas medidas correctivas para intentar mejorar los procedimientos de limpieza, sin embargo en las pruebas a los Carruther no se observó ninguna diferencia con respecto a la primera prueba, por el contrario se empeoró en el caso de los tanques.

Se observó que se produjo una reducción significativa en los muestreos a la mesa de limpieza en donde las mesas #2 y #3 se reportó un conteo de UFC en el rango de 10 –100 UFC's/cm² indicando que el sitio está limpio.

Igual resultado se observó en la mesa de fleco en donde el conteo se redujo en casi un 300% con respecto a la primera prueba, además de que se encuentran dentro del rango de un sitio limpio (*MFC01*:365UFC's/cm², *MFC02*:51 UFC's/cm²).

En lo que corresponde al control ambiental, se observó una reducción bastante significativa en la sala de limpieza ya que se pasó de 153 UFC's/cm² en la primera prueba a 3 UFC's/cm² en la segunda, esto pudo deberse a que en la segunda prueba el muestreo se realizó apenas una hora después de haber empezado a laborar por lo que el movimiento de las personas y el constante desplazamiento de una sala a otra no había sido tan constante, reduciendo el movimiento de aire en la sala de limpieza.

Para finalizar se realizaron pruebas a lomo y fleco de atún haciendo una dilución 1/10 en donde se observó que para el lomo de atún se contaron 21 UFC's/cm², mientras que con el fleco se llegaron a contar 44 UFC's/cm².

La diferencia existente para el conteo de UFC, entre el lomo y fleco, se debe principalmente a la manipulación extra a la que es sometido el fleco al ser revisado para limpiarlo de carne oscura, espinas y piel.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ✧ Las prácticas de aseguramiento de la calidad protegen la salud del consumidor, minimizan las pérdidas económicas que se producen como consecuencia del deterioro de los alimentos y aumentan la vida útil del producto.
- ✧ Se encontró que el kit Veratox® utilizado para la determinación de histamina mediante un ELISA competitivo directo, permite que este inmunoensayo se realice con gran rapidez y de forma rutinaria a un precio relativamente bajo.
- ✧ La coloración de los pocitos en la prueba de histamina está proporcionalmente relacionada con la concentración de histamina. Entre más alta es la concentración se produce una coloración rosada. Si la concentración es baja el color es azul ya que el conjugado logró ocupar una mayor cantidad de puntos de unión a los anticuerpos, por lo que la enzima conjugada puede reaccionar con el sustrato.
- ✧ Se considera necesario realizar pruebas de histamina una vez a la semana al pescado que se encuentra almacenado en las tres cámaras de la compañía, para prevenir posibles aumentos en la concentración de histamina por fallos en el control de las temperaturas de almacenamiento de las materias primas en la compañía.
- ✧ En lo posible se debería de solicitar un reporte en el que se indique los procedimientos de captura y almacenamiento en frío empleados en el barco, de manera que se tenga un punto de referencia que permita inferir la etapa post-mortem en la que se encuentra el pescado.
- ✧ Se deberían de tomar muestras de las agallas ya que este es el punto, según la literatura, en donde se encuentra la mayor cantidad de histamina en el pescado.
- ✧ La máxima concentración de histamina fue de 4,3 ppm muy por debajo del parámetro máximo admitido que es de 20 ppm para las materias primas.
- ✧ El test para la identificación rápida de microorganismos patógenos Reveal® es efectivo para determinar la presencia presuntiva de *Salmonella* spp y *Listeria* sp utilizando anticuerpos específicos para cada uno de esos microorganismos.

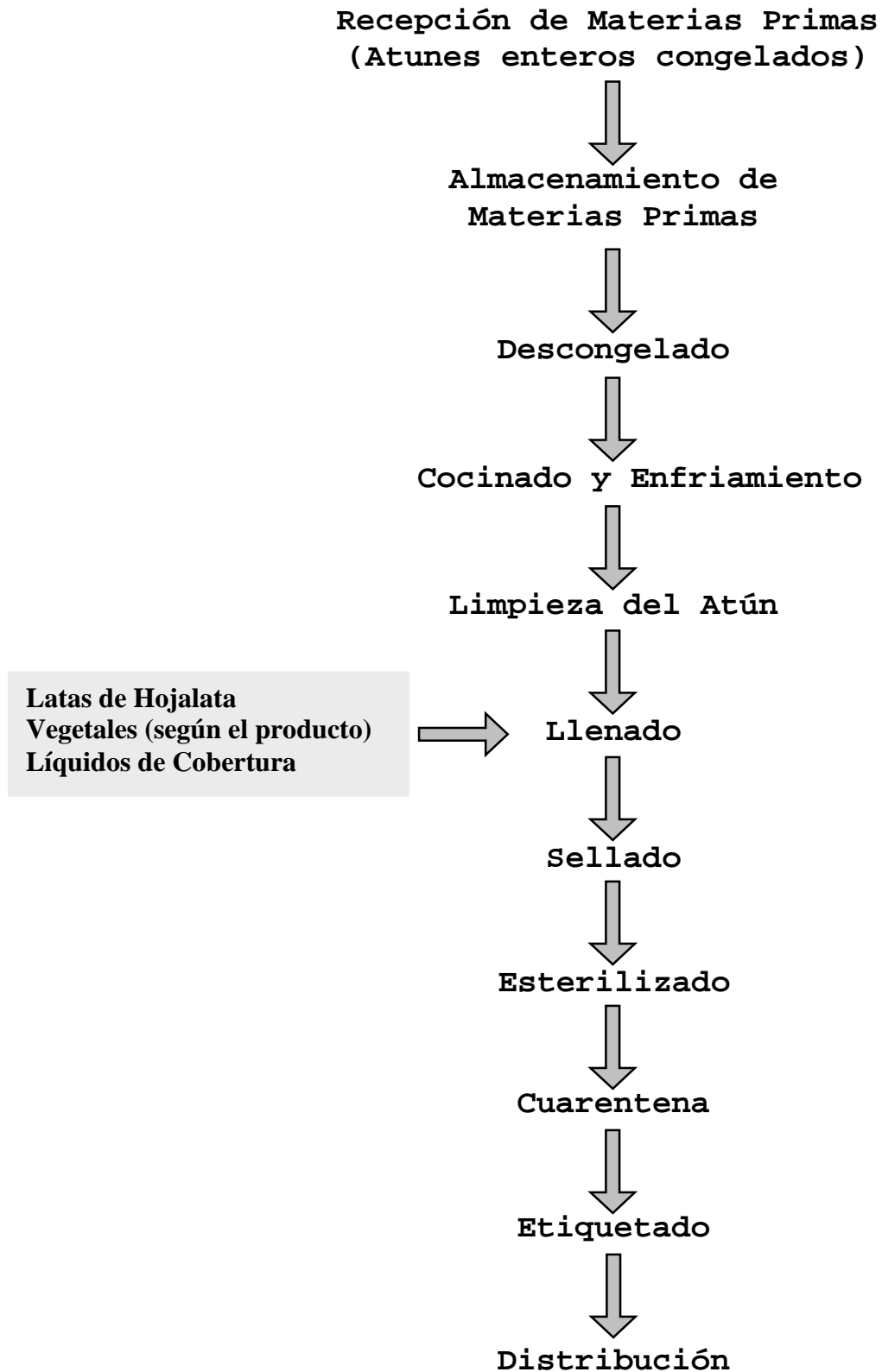
- ✧ Este tipo de test son bastante útiles en la industria dadas las condiciones que presenta el laboratorio de la compañía, ya que su eliminación es fácil y su lectura no requiere de mucha interpretación.
- ✧ La sencillez de la preparación, la rápida interpretación del resultado, la facilidad con la que se pueden descartar y el poco espacio que ocupan al almacenarse, hacen de las placas inmunocromáticas un elemento valioso para realizar pruebas de determinación de patógenos en la industria de alimentos.
- ✧ Todas las pruebas inmunocromáticas resultaron negativas para los organismos blanco que se querían determinar.
- ✧ Las pruebas presuntivas de *Listeria* sp y *Salmonella* spp podrían eliminarse como requisito indispensable para aprobar la recepción de materias primas, ya que el riesgo por contaminación con estos microorganismos se ve minimizado gracias al tratamiento térmico que posee el proceso.
- ✧ El agua empleada para llenar las pilas de descongelación constituye un riesgo para la salud dada la cantidad de microorganismos y coliformes fecales encontrados en un análisis microbiológico.
- ✧ El agua utilizada para el enfriamiento debe de ser clorada para mantener un residuo de cloro mensurable al final del enfriamiento (0.3 ppm como mínimo).
- ✧ La preservación segura de los alimentos enlatados depende de (a) la aplicación de calor hasta un nivel necesario que asegure la esterilidad comercial, esto se comprueba mediante la realización de curvas de penetración de calor que deberán de realizarse trimestralmente, (b) el uso de un doble sello en el envase que evite la reentrada de microorganismos y (c) el uso de procedimientos en el manejo de los envases que protejan su integridad una vez procesado el producto ya que el manejo rudo del envase puede ser la mayor causa de contaminación por infiltración.

- ✧ Se debe de calibrar el sensor de la llenadora para evitar variaciones en los pesos y el llenado excesivo de las latas, con el fin de reducir la posibilidad de alteraciones físicas en las latas debido a las presiones internas que se producen en el autoclave y que se ven afectados por la reducción en el vacío dentro de la lata.
- ✧ Se debe de proponer un protocolo para el lavado de los tanques de almacenamiento de agua en el que se incluya la frecuencia con que se deben de limpiar (quincenalmente) así como el detalle de los desinfectantes que se utilizarán, con el fin de evitar una mayor contaminación del agua de enfriamiento.
- ✧ Las pruebas de vida útil se realizan a cada lote de producción al colocar una muestra de cuatro latas en incubación a 37°C durante 10 días. Posteriormente se incuban por el mismo período de tiempo a 55°C.
- ✧ El análisis sensorial del producto terminado permite comprobar que la producción se llevó a cabo de la manera prevista, de manera que el producto terminado cumpla con todas las especificaciones de la empresa.
- ✧ Se determinó que las cargas bacterianas en las áreas de proceso de CENSA son muy altas y los procedimientos de limpieza son poco efectivos para reducir esa carga.
- ✧ El número y los tipos de microorganismos presentes en un alimento enlatado al entrar al procesamiento térmico dependen de (a) la materia prima, (b) el equipo utilizado para manipular el atún, (c) el agua de la planta que tiene contacto con el alimento y (d) la transferencia de microorganismos por manipulación directa del alimento.
- ✧ El compuesto de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, utilizado en la compañía es completamente ineficiente para la desinfección de los equipos de llenado y manos del personal, por lo que es necesario dejar de utilizarlo inmediatamente en todos los procedimientos de limpieza de la compañía.
- ✧ Los operadores de las máquinas deben de usar guantes y tapabocas durante sus labores para reducir la posibilidad de contaminación en el producto.

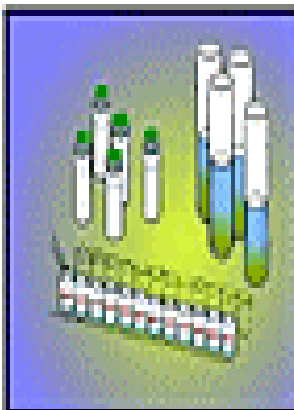
- ✧ Las bandejas plásticas deben de ser limpiadas con un desinfectante, además del agua y jabón empleados, para poder bajar la carga bacteriana. También se deberían de sumergir en agua caliente (90-95°C) para contribuir a reducir la carga bacteriana.
- ✧ Se propone que se utilice gluconato de clorhexidina para la desinfección de las manos del personal, ya que este posee un nivel de acción alto por su condición de antiséptico y su efecto residual.
- ✧ Se consideró necesario la aplicación correcta del vapor en todo el Carruther, específicamente en las bandas, para disminuir la carga bacteriana, antes del lavado y aplicación del desinfectante. Además se deben de cambiar las bandas de los Carruther ya que esta es de material poroso, lo cual favorece la permanencia de microorganismos en la banda, dificultando la limpieza en esa área.
- ✧ Se requiere la implementación de un programa de muestreos a los principales sitios del proceso para poseer un punto de control exigente para verificar y optimizar los procedimientos de limpieza.
- ✧ Las placas Petrifilm son un excelente instrumento para realizar pruebas de omnipresencia de microorganismos porque su utilización es muy sencilla, fácil de aprender y sobre todo puede descartarse rápidamente. Dadas las condiciones de trabajo existentes en la compañía son quizás el mejor método que se puede utilizar.
- ✧ Se recomienda el uso permanente de placas Petrifilm específicas para coliformes, estreptococos, hongos y levaduras para hacer mucho más específica la identificación de los microorganismos y así poder dirigir acciones correctivas específicas.
- ✧ Las placas Petrifilm presentan la desventaja que no permite una adecuada dispersión de una muestra alrededor de una placa y mucho menos el aislamiento de colonias, por lo que el dato de Muy Numeroso Para Contar se presenta con mucha frecuencia, por lo que este tipo de análisis, deberá ser utilizado, únicamente para control preventivo, ya que el conteo de UFC es difícil y muy poco preciso.
- ✧ En caso de utilizar este sistema, se recomienda reducir el área de muestreo para que se facilite el conteo de las colonias en las placas.

ANEXOS

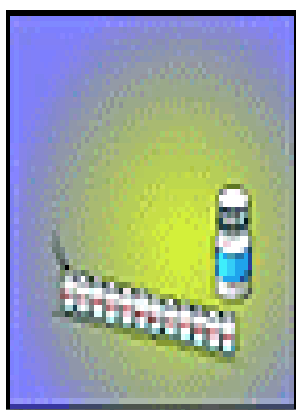
Anexo 1. Diagrama de Flujo para la Elaboración de Atún Enlatado.



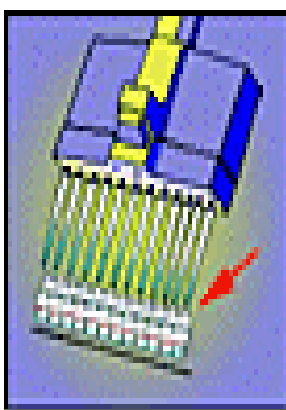
Anexo 2. Metodología de la prueba Veratox[®] para Histamina



Se agregó 100µl de cada uno de los controles y de las muestras diluidas en el buffer en sus respectivos pozos.



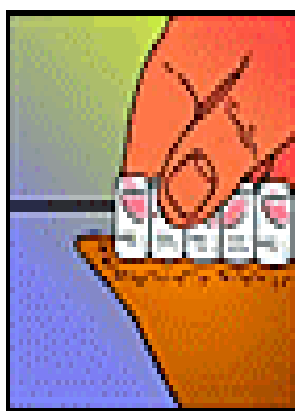
Se añadieron 100µl del conjugado en los pocitos de la placa de microtitulación marcada con el fondo rojo.



Se mezcló y se transfirieron 100µl a la placa de microtitulación con pozos recubiertos con anticuerpos. Se incubó por 10 minutos.



Se descartó el líquido de los pozos con anticuerpos y se hicieron tres lavados con el Wash Buffer.



Cuidadosamente se volteó la placa de microtitulación para desechar los remanentes de líquido en los pozos.



Se agregó 100µl del sustrato en los pozos con anticuerpos, usando una pipeta de 12 canales y puntas estériles. Se dejó incubando 10 minutos



Se transfirió 100µl de Red Stop a los pozos recubiertos con anticuerpos.



El resultado se leyó usando el lector de la placa de microtitulación con un filtro a 650 nm.

Anexo 3. Metodología de las Pruebas con Placas Inmunocromáticas

Prueba Reveal® para *Listeria* sp.



En una bolsa esteril se agregó la muestra al caldo de pre-enriquecimiento Fraser. Se homogenizó e incubó a 30°C por 21 horas



Se llevó 100 µl del caldo a 10 ml de BLEB y se incubó a 30°C por 21 horas



Se transfirieron 2ml del caldo de enriquecimiento a un tubo de vidrio



Se colocó el tubo en baño maría a 80 °C durante 20 minutos



Se enfrió la muestra a temperatura ambiente y se añadió 135 µl a la ventana del dispositivo de prueba.



Se deja reposar la placa durante 20 minutos. Si se observan dos líneas el test es positivo, si solo aparece una la prueba es negativa.

Prueba Reveal® para *Salmonella* sp.



Se rehidrató el medio de pre-enriquecimiento REVIVE



Se adicionó la muestra y se incubó a 37 °C durante cuatro horas



Luego se rehidrató el medio selectivo de enriquecimiento.



Adicionar el medio selectivo a la muestra preenriquecida e incubar a 43 °C durante 16 horas



Se obtuvo una muestra de líquido después del período de enriquecimiento y enfriarlo a temperatura ambiente durante 25 minutos



Se colocaron 3 gotas en la ventana de la placa



Leer los resultados visualmente 20 minutos después.

Anexo 4. Medios de Enriquecimiento Selectivo

Descripción y composición química de algunos de los medios de cultivo utilizados en las pruebas inmunocromáticas.

✧ Rappaport Vassiliadis (RV) para *Salmonella* sp.

Es un medio de enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra blanco. Este medio es recomendado cuando se trabaja con productos de pescado tales como harinas, pescado crudo, cocido o enlatado.

Fórmula de Preparación:

SOLUCIÓN A	Solución B	Solución C
Triptona 5,0 g	Cloruro de magnesio hexahidratado 400 g	Oxalato de verde de malaquita 0,4 g
Cloruro de sodio 8 g	Agua destilada 1000 ml	Agua destilada 100 ml
Fosfato de potasio dihidrogenado 1,6 g		
Agua destilada 1000 ml		

PREPARACIÓN

Disolver los componentes en agua por calentamiento cercano a 70°C	Disolver el cloruro de magnesio en agua. Como esta sal es muy higroscópica es conveniente disolver el contenido entero de cloruro de magnesio, tal modo que la concentración de la solución sea de 0,4 g/ml. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente	Disolver el oxalato de verde de malaquita en agua. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente
-------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------

Medio Completo

Adicionar 1 000 ml de la solución A, 100 ml de la solución B y 10 ml de la solución C. Ajustar el pH si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de 5,2. Distribuir antes de usar dentro de tubos en cantidades de 10 ml. Almacenar en refrigeración.

❖ **Selenito-Cistina (SC) para *Salmonella* sp.**

Es un medio de enriquecimiento selectivo, que se utiliza para incrementar las poblaciones de *Salmonella*, al mismo tiempo que inhibe el crecimiento de otros microorganismos. Este se podría usar en la prueba, sin embargo su uso es principalmente recomendado en productos lácteos, carnes procesadas (res, cerdo, etc.) y avícolas.

El selenito inhibe el crecimiento de coliformes y enterococos. La adición de L-cistina fue propuesta por la FDA para el aislamiento de *Salmonella* en productos alimenticios incrementando la recuperación por reducción de la toxicidad del selenito.

Fórmula (g/l)	Preparación
<i>Peptona</i>5,0	Suspender 23 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución completa. Evite el calentamiento excesivo y no esterilice en autoclave.
<i>Lactosa</i>4.0	
<i>Fosfato de sodio</i>10.0	
<i>Selenito de sodio</i>4.0	
<i>L-Cistina</i>0.01	
<i>PH final:</i>7.0 ± 0.2	

❖ **Caldo Fraser para *Listeria* sp.**

Es un medio selectivo de enriquecimiento que permite aumentar el número de microorganismos pertenecientes al género de *Listeria*, inhibiendo el crecimiento de otros géneros bacterianos al suministrar los nutrientes y condiciones de incubación apropiados para el crecimiento de *Listeria* sp.

Fórmula (g/l)	Preparación
<i>Peptona</i>5.0	Disuelva 27.4 g del caldo de <i>Listeria</i> Fraser 500ml de agua destilada. Hierva la solución completa y autoclave el medio hasta los 121 °C por 15 minutos y deje enfriar a temperatura ambiente. Luego agregue al caldo el suplemento de citrato de amonio férrico, previamente reconstituido con 5 ml de agua destilada estéril. Disuelva bien y distribuya en tubos estériles para hacer la prueba.
<i>Triptona</i>5.0	
<i>Extracto de carne molida</i>5.0	
<i>Extracto de levadura</i>5.0	
<i>Cloruro de Sodio</i>20.0	
<i>Anhidro Fosfato bibásico de Sodio</i>9.5	
<i>Fosfato monobásico de Potasio</i>1.35	
<i>Esculina</i>1.0	
<i>Cloruro de litio</i>3.0	
<i>Ácido Nalidissico</i>0.02	
<i>Acriflavina</i>0.024	
<i>Citrato de amonio férrico</i>0.25	
<i>pH final</i>7.2 +/- 0.2	

Anexo 5 Análisis Sensorial y Físico: calificación por deducción por puntos[◇]




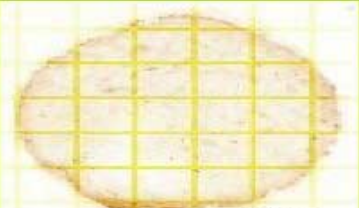
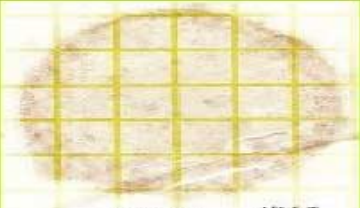
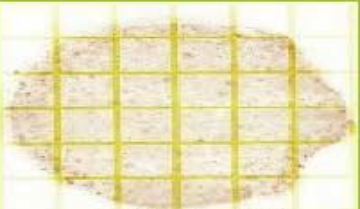


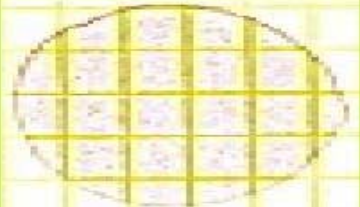



Líquido de Gobierno	Deducción
1) <i>Apariencia</i>	
Apariencia Característica	0
Apariencia Desagradable	5
Carne de Atún	
1) <i>Cloruros (NaCl)</i>	
del 1% al 1,5%	0
< del 1%	2
del 1,6% al 2%	2
del 2% al 2,5%	4
del 2,6% al 3%	8
> al 3%	16
2) <i>Textura</i>	
Firme y característica del producto	0
Ligeramente blanda o seca	4
Moderadamente seca o blanda	8
Pastosa o masuda	26
3) <i>Pastilla</i>	
Compacta o < al 10% de fleco	0
Del 11% al 20% de fleco	6
> del 21% de fleco	11
4) <i>Color</i>	
Hasta un 1% de carne oscura entre la blanca	0
Del 1,1% al 5% de carne oscura entre la blanca	6
> al 5% de carne oscura entre la carne blanca	26
Coloraciones verdosas o extrañas por alteración	26
5) <i>Olor</i>	
Característico del atún	0
Ligeramente diferente al característico	4
Desagradable por alteración	26
6) <i>Sabor</i>	
Característico	0
Ligeramente más fuerte, sabor amargo o a quemado	4
Desagradable por descomposición o picoso	26
7) <i>Materia Extraña</i>	
Ausencia	0
c/espina < a 2cm, descontar 1 punto	
Presencia de espinas no desintegrables > 1cm	26
Restos de piel con superficie de 1 cm	6
Presencia de insectos o partes de estos	26

Nota: Se considera "espina no desintegrable" toda aquella espina dura que no se rompe al presionarla ligeramente con los dedos después del proceso de cocción y esterilización, que puede ocasionar daños en la salud del consumidor.

[◇] Según la Norma Técnica de Aseguramiento de la Calidad para atún enlatado. Instituto Nacional de la Pesca. Sistema de Aseguramiento de la Calidad de productos de pesca. Mexico. Diciembre, 1991.

Anexo 6 Pruebas de Omnipresencia de Microorganismos en el área de procesado de atún en la Compañía Enlatadora Nacional S.A.

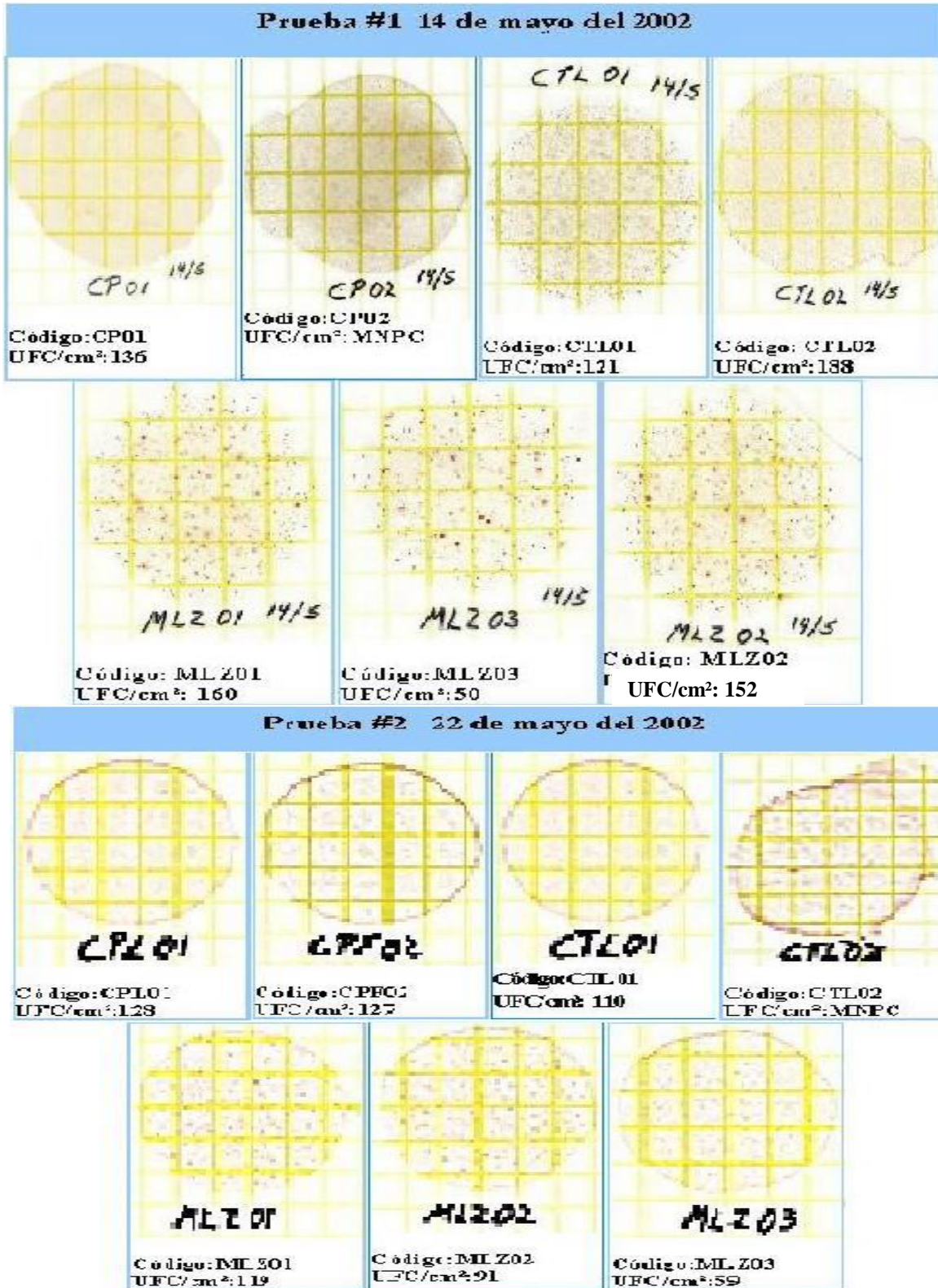
✧ Método de Contacto Directo

Prueba #1 14 de mayo del 2002		
 <p><i>MFC 01 14/5</i> Código: MFC01 UFC/cm²: 130</p>	 <p><i>MFC 02 14/5</i> Código: MFC02 UFC/cm²: 159</p>	 <p><i>CTB 01 14/5</i> Código: CTB01 UFC/cm²: MNPC</p>
 <p><i>CTB 02 14/5</i> Código: CTB02 UFC/cm²: MNPC</p>	 <p><i>MP 01 14/5</i> Código: MP01 UFC/cm²: 160</p>	 <p><i>MP 02 14/5</i> Código: MP02 UFC/cm²: 172</p>
Prueba #2 22 de mayo del 2002		
 <p><i>MFC 01</i> Código: MFC01 UFC/cm²: 36</p>	 <p><i>MFC 02</i> Código: MFC02 UFC/cm²: 118</p>	 <p><i>CTB 01</i> Código: CTB01 UFC/cm²: MNPC</p>
 <p><i>CTB 02</i> Código: CTB02 UFC/cm²: MNPC</p>	 <p><i>MP 01</i> Código: MP01 UFC/cm²: 81</p>	 <p><i>MP 02</i> Código: MP02 UFC/cm²: 118</p>

Continúa

(Continuación anexo 6)

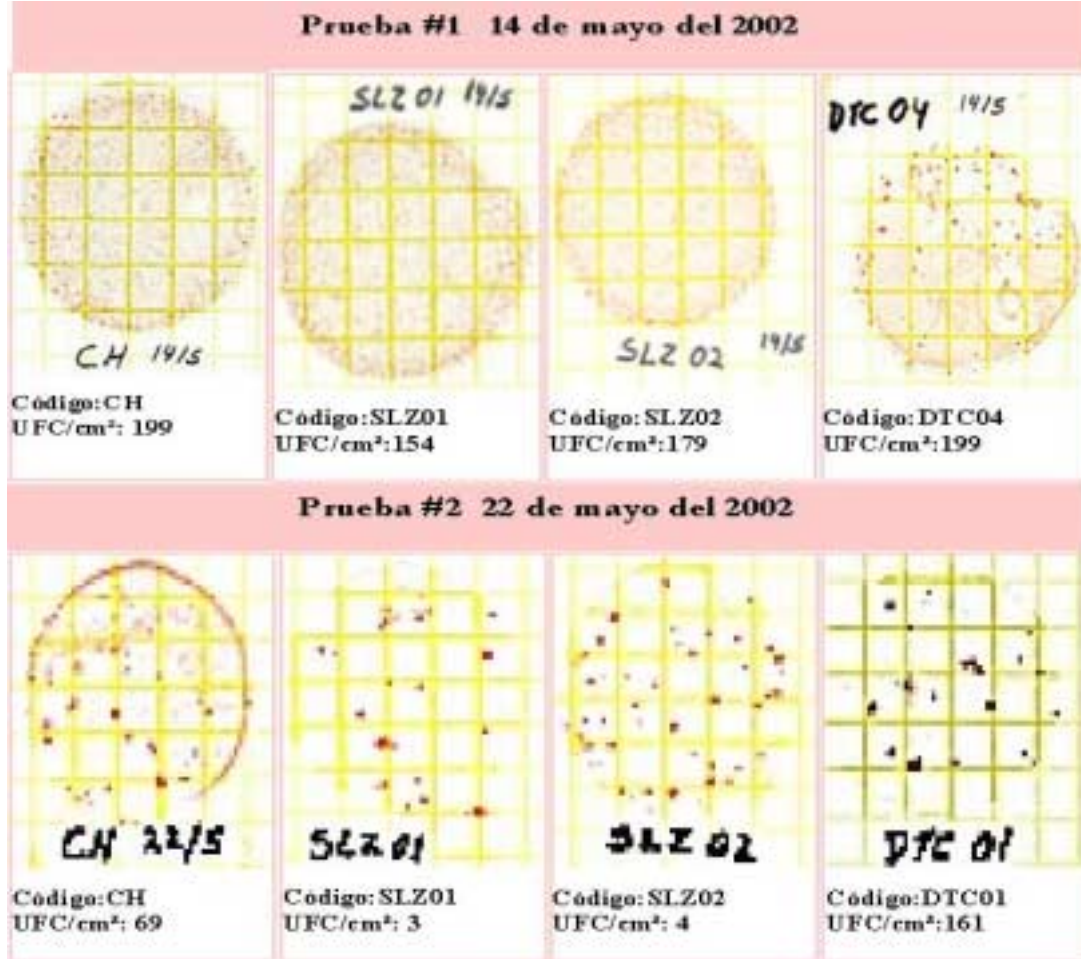
❖ Método del Quick Swab



(Continúa)

(Continuación anexo 6)

❖ Método de Control Ambiental



❖ Pruebas a botas y producto limpio y cocinado



Anexo 7. Condiciones que permiten determinar la posible causa de deterioro en enlatados

Condición de las latas.	Olor	Apariencia	Gas CO ₂ -H ₂	pH	Tinción	Cultivos	Diagnóstico
<i>No hay vacío. Latas abombadas</i>	Normal	Normal	No hay H ₂	Normal	Negativa Número de organismos moderado	Negativos	Vacío insuficiente causado por: 1) Daño incipiente. 2) Mal vacío 3) Mal escaldado 4) Mal enfriado 5) Sobrellenado
<i>Latas planas o vacío normal</i>	Ácido o medicinal	Líquido normal. A veces turbio	Negativo	Poco o definitivamente bajo lo normal	Bacilos posiblemente granulares en apariencia	Crecimiento sin gas a 50°C y posiblemente a 30° C Crecimiento en agar termo-ácidurans	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>Latas planas o vacío normal</i>	Normal o ácido	Líquido normal o turbio. Tal vez, mohoso.	Negativo	Poco. Definitivamente bajo lo normal	Cultivo puro o mixto de bacilos, cocos u hongos	Crecimiento aerobio o anaerobio a 30 °C y posiblemente a 50 °C.	Fugas o microfugas
<i>Abombada algunas veces sin abombar</i>	Ácido butírico	Espumoso, mucho gas	CO ₂ -H ₂	Definitivamente bajo lo normal	Bacilos que se tiñen bipolar. Posiblemente esporas.	Gas-anaeróbicamente 30 °C. Olor a ácido butírico	Sub-proceso, anaerobio productor de ácido butírico.
<i>Abombada</i>	Normal o metálico	Normal o espumoso. Lata corroida	>20% normal H ₂	Normal	Negativo o microorganismos ocasionales	Negativo	Abombamiento por hidrógeno
(continuación anexo 7) <i>Abombada</i>	Ácido	Espumoso. Posiblemente líquido de gobierno viscoso	Principalmente CO ₂	Bajo lo normal	Cultivo puro o mixto de bacilos, cocoides cocos hongos o levaduras	Crecimiento aeróbico y/o anaeróbico a 30°C y posiblemente 50°C	Fugas
<i>Abombada</i>	Ácido	Espumoso. Posiblemente líquido de gobierno viscoso. Partículas del alimento firmes, parecen crudas	Principalmente CO ₂	Bajo lo normal	Cocos o levaduras	Crecimiento aeróbico y/o anaeróbico a 30°C y posiblemente a 50 °C. Vacío alto sólo se recuperan esporulados.	No se les dio proceso

(continúa en la siguiente página)

<i>Abombada</i>	Normal o quesooso ácido	Espumoso	CO ₂ -H ₂	Poco o definitivamente bajo lo normal	Bacilos generalmente granulares. Rara vez se ven esporas	Gas, anaeróbicamente a 50 °C y posiblemente lento a 30°C	Abuso de la temperatura post proceso. Anaerobios termofílicos
<i>Abombada</i>	Quesoso a Pútrico	Usualmente espumoso con desintegración de las partículas sólidas	Principalmente CO ₂ y posiblemente algún H ₂	Poco o definitivamente Bajo lo normal	Bacilos generalmente esporas presentes	Gas anaeróbicamente a 30 °C	Sub proceso. Anaerobios mesofílicos. Posibilidad de <i>Clostridium botulinum</i> .
<i>Abombada</i>	Posiblemente amoniacal	Normal	Negativo	Poco o definitivamente bajo lo normal.	Bacilos. Ocasionalmente esporas	Crecimiento aeróbico y/o anaeróbico a 30°C y posiblemente 50°C	Sub proceso tipo <i>Bacillus subtilis</i> .
<i>Sin vacío o latas abolladas</i>	Normal	Normal	No hay H ₂	Poco o definitivamente bajo lo normal.	Negativo o un número moderado de organismos	Negativo	Vacío insuficiente por: 6) Daño incipiente. 7) Mal vacío 8) Mal escaldado 9) Mal enfriado Sobrellenado
<i>Latas planas, vacío normal</i>	Normal o ácido	Normal o líquido turbio	Negativo	Poco o definitivamente bajo lo normal.	Bacilos, generalmente de apariencia granular, rara vez se ven esporas	Crecimiento sin fugas a 50°C. Formación de esporas en agar nutritivo	Abuso de temperatura post proceso.
<i>Latas planas, vacío normal</i>	Normal o ácido	Normal o líquido turbio. Posiblemente mohoso	Negativo	Poco o definitivamente bajo lo normal.	Cultivos puros o mixtos de bacilos, cocos u hongos	Crecimiento aeróbico a 30°C y posiblemente a 50°C	Fugas

Anexo 8. Criterios para la evaluación organoléptica de la calidad del atún fresco.

Factor	Excelente	Bueno	Marginal	Rechazable
<u>Apariencia</u>				
<i>Agallas</i>	rojo brillante	rojo pálido a café	amarillo-café a café oscuro	amarillo-blanco
<i>Ojos</i>	claros, brillantes y protuberantes	sumisos, con nube blanca	blancos opacos o rojos estallados	perdidos
<i>Piel</i>	lustre normal, color claro y brillante	opaca sin brillo aparente, medio desteñida	color normal, pálida y músculo visible	decoloración masiva, piel descompuesta
<u>Olor:</u>				
<i>Agallas y panza</i>	fresca, típica de pescado recién capturado	plana y ligeramente con olor a pez	fuerte olor a pez, sin estar rancio	amargo, pútrido, olores extraños
<u>Daño Físico:</u>				
	Sin mutilación y deformidad	deformaciones o mutilaciones pequeñas	ligeramente roto o apachurrado	panza quemada y grandes mutilaciones
<u>Firmeza del músculo y panza:</u>				
	firme y elástico	sin elasticidad y firmeza	blando	muy blando y pulposo

BIBLIOGRAFÍA

- AGUILAR, J. 1985. **Evaluación de Calidad: Pruebas Organolépticas**. Ciudad de la Habana, Cuba. Editorial Pueblo y Educación. sp.
- BERTULLO, V. 1990. **Tecnología de los Productos de la Pesca**. Ciudad de La Habana, Cuba. Editorial Pueblo y Educación. 352 p.
- BIOPSIKOLOGÍA. 2002. **Histamina**. Consultado en: http://www.biopsicologia.net/fichas/page_132.html > 24 de mayo del 2002.
- BURNS, F. 1994. **Manejo y refrigeración del atún en los buques de CERCO**. Living Marine Resources, Inc. San Diego, California. USA. 90 p.
- CEQIA TEC. 2000. **Microbiología Industrial Seguridad Microbiológica y Calidad**. Cartago, Costa Rica. s.p
- FERNANDEZ, P.R. 1993. **Microbiología general de los alimentos**. Ciudad de la Habana, Cuba. Editorial Pueblo y Educación. 120 p.
- FERNANDEZ, P.R. 1989. **Prácticas de Laboratorio**. Ciudad de la Habana, Cuba. Editorial Pueblo y Educación. 48 p.
- FERNANDEZ, P.R.; GONZÁLEZ, R. 1991. **Estudio y procesamiento de los peces**. Ciudad de la Habana, Cuba. Editorial Pueblo y Educación. 208 p.
- GARCÍA, H. 1992. **Principios de Procesamiento Térmico**. Ciudad de la Habana, Cuba. Editorial Pueblo y Educación. 326p.
- Grupo OCEANO. 1988. **Enciclopedia Autodidáctica Océano**. Vol. III. Navarra, España. Ediciones Océano S.A. 487 p.
- JAY, J. 1996. **Microbiología moderna de los alimentos**. I^{da} Edición. Traducido por: José María Tarazona. ACRIBIA. Zaragoza, España. 491 p.
- JOSEPH, J; KLAWE, W; MURPHY, P. 1993. **Tuna and Billfish**. Inter-american tropical Tuna Commission. Lajolla, California. 46 p.

- LASSEN, S.1989. **Manual de prácticas de Refrigeración en buques atuneros.** California Fish Cannery Association, Terminal Island, California USA. 135 p.
- LEE, J. 1999. **Aseguramiento de la Calidad.** San José, Costa Rica. Instituto Nacional de Aprendizaje. s.p.
- MADIGAN, et. al. **Biología de microorganismos.** 8ª edición. México. Prentice-Hall.1998.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1990. **Manuales para el control de la calidad de los alimentos: Introducción a la toma de muestras de alimentos.** Roma, Italia.
- RACCACH, M. 1989. **Principios de Enlatado de Productos Agroindustriales.** San José, Costa Rica. 129 p.
- REDVY, 2001. **Alteraciones en el Pescado en Refrigeración.** Accesado en: <www.redvya.com/veterinarios/veterinarios/especialidades/alimentacion/Especialista/Articulo10.htm> 24 de mayo del 2002.
- RODRÍGUEZ, J. 2000. **La Histamina, un Riesgo Evitable.** Accesado en: <<http://www.consumaseguridad.com/riesgos/agentes/object.php?o=1390>> 24 de mayo del 2002.
- YASSIN, S. 1997. **Guidebook for the Preparation of HACCP Plans: Book II.** Internacional Technical Food Services. U.S.A. 244 p.