ENSAYO PRELIMINAR DE LA FURANONA COMO APLICACIÓN PARA EL CONTROL BACTERIANO EN CARNES DE CERDO

NATALI ELIZABETH ARÉVALO MORENO

UNIVERSIDAD EAN

FACULTAD DE INGENIERIA

INGENIERIA AMBIENTAL

2013

ENSAYO PRELIMINAR DE LA FURANONA COMO APLICACIÓN PARA EL CONTROL BACTERIANO EN CARNES DE CERDO

NATALI ELIZABETH AREVALO MORENO

Monografía para optar al título de

INGENIERA AMBIENTAL

Directora

DIANA VARELA

UNIVERSIDAD EAN

FACULTAD DE INGENIERÍA

INGENIERÍA AMBIENTAL

BOGOTÁ D.C.

2013

Nota de aceptación:

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma del presidente del jurado

_____

Firma del jurado

_____

Firma del jurado

Bogotá D.C.,

"A mi familia,

Con ellos aprendí

a valorar las cosas

grandes y pequeñas de la vida"

AGRADECIMIENTO

Debo agradecer a mi familia por siempre apoyarme de muchas maneras, a mis padres a los cuales quiero llenar siempre de orgullo, agradezco a mi padre por inculcar en mí el deseo de conocimiento, a mi mamá por su cariñosa disciplina, a cada una de las personas que a lo largo de mi carrera han ayudado para que hoy este finalizando este siclo, con palabras de aliento, con tiempo dedicado en mí, o incluso con solo su amistad, han hecho de mi lo que soy ahora, a mis hermanos por su apoyo, mi pequeña hermana que llena mi vida con detalles hermosos, y a una amiga que quiero como a una hermana más, Cindy Velasco, siempre has sido y eres la voz de mi conciencia gracias por siempre estar conmigo y querer lo mejor para mí, Daniel Alba con su gran amistad sé que podre contar toda mi vida, a los profesores que he tenido desde mi querido colegio, La Presentación de Zipaquirá, y en mi universidad, EAN, algunos los recuerdo más que a otros, pero la mayoría enseñándome de la mejor manera posible, agradezco a mi tutora de tesis Diana Varela por creer en mí y siempre estar con una sonrisa para lo que necesitara, a mi profesor de sistemas biológicos que apoyo de muchas maneras la realización de esta tesis, agradezco a Dios por permitirme vivir mi vida de la manera que ha sido, con alegrías, tristezas, orgullos, decepciones, altas y bajas por que cada una de esas situaciones me han enseñado a ser mejor persona

1. TABLA DE CONTENIDO

Contenido

ENSAYO PRELIMINAR DE LA FURANONA COMO APLICACIÓN PARA EL CONTROL BACTERIANO EN CARNES DE CERDO 1

AGRADECIMIENTO 5

1. TABLA DE CONTENIDO 6

2. LISTA DE TABLAS 10

3. LISTA DE FIGURAS 10

4. LISTA DE ANEXOS 16

5. RESUMEN 1

PALABRAS CLAVES 2

6. ABSTRACT 3

7. GLOSARIO 4

8. INTRODUCCION 5

9. PROBLÉMA 8

10. JUSTIFICACION 12

11. OBJETIVOS 14

11.1 OBJETIVO GENERAL 14

11.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS 14

12. ALCANCE 15

13. MARCO TEORICO 16

13.1 CONTAMINACIÓN 16

13.2 ILEGALIDAD 17

13.3 PELIGRO QUÍMICO 21

13.4 DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE FURANONAS Y LACTONAS 21

13.5 EFECTOS SOBRE LA SALUD Y MEDIO AMBIENTE DE LA FURANONA 2 (5H) 24

13.6 ANTECEDENTES 26

13.6.1 El uso de la detección de quórum inhibidor furanona C-30 para interferir con la formación de biofilm por Streptococcus mutans y sus Luxs cepa mutante 26

13.6.2 La compañía biotecnológica australiana Biosignal y el Instituto para la Investigación de ojos han recibido la aprobación ética para el estudio clínico en humanos de recubrimiento antibacterial lentes de contacto 27

13.6.3, Furanona 2 (5H) una estrategia de prospectiva de contaminación biológica en la inhibición de la membrana biofilm de bacterias quórum sensing 29

14. MARCO LEGAL 32

15. METODOLOGIA 34

15.1 Materiales 34

15.2 Ensayos 39

15.2.1 Obtención de la solución tampón, figura 28, con esta se preparaban los agares 39

15.2.2 Ensayo número1 40

15.2.3 Ensayo número 2: 41

15.2.4 Ensayo número 3: 42

15.2.5 ENSAYO 4: 44

16. RESULTADOS 45

16.1 RESULTADOS DE LA ENSAYO NÚMERO 1: 45

16.2 RESULTADOS DE ENSAYO NÚMERO 2 46

16.3 RESULTADOS DE ENSAYO NÚMERO 3: 49

16.4 RESULTADOS ENSAYO 4: 52

TINCION DE GRAM 54

17. CONCLUCIONES 57

17.1 RECOMENDACIONES 59

18. BIBLIOGRAFIA 61

ANEXO A **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

ANEXO B **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

ANEXO C **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

2. LISTA DE TABLAS

Bacterias que puede tener la carne Tabla 1 _____ 17

Plantas de sacrificio reportadas por el INVIMA resolución 2008031445, modificada por resolución 2009006158 y 2003006159 (5 de marzo de 2009) Tabla 2 _____ 18

Sacrificio nacional de cabezas de porcino por departamento, Enero a Diciembre 2007- 2008 área económica, asociación Colombiana Porcicultores Tabla 3 _____ 19

3. LISTA DE FIGURAS

Sacrificio de ganado porcino entre los años 1998-2008, medido en el número acumulado de cabezas sacrificadas entre enero-diciembre de cada año figura 1 _____ 9

Resultado de muestras positivas a salmonella con “sólo limpieza” del camión figura 2 __ 10

Estructura química de las diferentes Furanonas figura 3 _____ 22

Estructuras químicas y fórmulas de lactonas inhibidoras figura 4 _____ 23

Estructuras químicas de Furanonas comerciales figura 5 _____ 23

Estructura química de la furanona 2(5H) figura 6 _____ 24

Síntesis de la Furanona figura 7 _____ 24

Tabla de resultados estudio “El uso de la detección de quórum inhibidor furanona C-30 para interferir con la formación de biofilm por Streptococcus mutans y sus Luxs cepa mutante” figura 8 _____ 27

Lentes de contacto recubiertos de furanona Biosignal, AOS sintéticos biofilm anti-compuestos figura 9 _____ 29

2(5H) Furanona interfiriendo con la acción de AHL molecular e inhibición QS figura 10 31

Cajas de Petri figura 11 _____ 34

Mortero figura 12 _____ 35

Vasos de precipitado figura 13 _____ 35

Pinzas figura 14 _____ 35

Pipeta figura 15 _____ 35

Vidrio de reloj figura 16 _____ 35

Probeta figura 17 _____ 36

Tubos de ensayo figura 18 _____ 36

Agitador figura 19 _____ 36

Asas figura 20 _____ 36

Plancha figura 21 _____ 37

Centrifuga figura 22 _____ 37

Bascula digital figura 23 _____ 37

Carne de cerdo figura 24 _____ 37

Medios de cultivo: plate cont (MERCK KGaA) Ref. 1.045463.0500.(agar peptona de caseína-glucosa-extracto de levadura para microbiología) y potato dextrose agar (SCHARLAU) Ref. 01-483, figura 25 _____ 38

Furanona 2(5H) SIGMA –ALDRICH (número del producto 283754-1) Singapore Science figura 26 _____ 38

Diagrama de flujo obtención de solución tampón figura 27 _____ 39

Diagrama de flujo de procedimiento experimental figura 28 _____ 41

Diagrama de flujo evaluación número 2 figura 29 _____ 42

Diagrama de flujo evaluación 3 figura 30 _____ 43

Diagrama de flujo evaluación 4 figura 31 _____ 44

Caja de Petri con cultivo nutritivo figura 32 45

Caja de Petri con cultivo más Furanona figura 33 Fuente: autor 45

Comparación de los cultivos figura 34 46

Vista de cultivo con Furanona figura 35 46

Comparación de los cuatro cultivos figura 36 47

Caja de Petri con materia orgánica figura 37 47

Cultivo con gotas de Furanona figura 38 48

Cultivo con sensidisco figura 39 48

Cultivo solo con el agar figura 40 Fuente: autor 48

Cultivos en incubadora a 27°C plate count (izquierda) potato dextrosa agar (derecha) figura 41 49

Cultivo plate count, estrias figura 42 49

cultivo plate count M.O. figura 43 49

Cultivo potato dextrosa agar, estrias figura 44 50

Cultivo potato dextrosa agar M.O. figura 45 50

Comparación cultivos con materia orgánica plate count(derecha) potato dextrose agar(izquierda) figura 46 50

Comparación de cultivos con líquido de agua y carne de cerdo plate count y potato dextrose figura 47 51

Resultados primera caja de Petri figura 48 52

Resultados segunda caja de Petri figura 49 52

Resultados tercera caja de Petri figura 50 53

Resultados cuarta caja de Petri figura 51 53

Caja 3 comparación parte con Furanona y sin Furanona figura 52 53

Vista de microscopio a resultado de tinción de Gram de cultipo en agar plate coun y solución tampón de carne de cerdo figura 53 54

Staphylococcus aureus figura 54 55

Streptococcus agalactiae figura 55 55

Lactococcus lactisfigura 56 55

Listeria monocytogenes figura 57 55

Lactobacillus acidophilus figura 58 55

Bacillus cereus figura 59_____ 55

Escherichia coli figura 60 _____ 56

Vista ampliada de las bacterias Gram positivas y Gram negativos de los cultivos realizados figura 61 _____ 56

4. LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: El estudio Ranking the Risks: The 10 Pathogen-Food Combinations with the greatest Burden on Public Health realizado por (EPI, por sus siglas en inglés) y uno de los autores J. Glenn Morris, director del Instituto de Patógenos Emergentes de la Universidad de Florida (adjunto)

ANEXO B: Especificaciones de la 2(5H) Furanona

ANEXO C: Especificaciones agar plate coaunt (MERCK KGaA) Ref. 1.05463.0500

5. RESUMEN

Esta investigación toma inspiración del concepto de Biomimesis (Benyus, 1997) que sostiene que los procesos evolutivos en los sistemas biológicos han creado mecanismos sofisticados y ambientalmente sostenibles, que pueden ser replicados o utilizados para la solución de problemas actuales. Ejemplo de esto es el mecanismo utilizado por algunas algas rojas (Rhodopyta: *Delicea pulchra*) para el bloqueo en la comunicación entre las bacterias usando un grupo Lactona llamada Furanona; esta estrategia tiene la ventaja de no generar resistencia bacteriana, al contrario de lo que sucede con antibióticos convencionales (Benyus)

La implementación de la Furanona en el control bacteriano de las carnes de porcino, podría ser una solución eficaz y ambientalmente sostenible, por lo que en esta investigación el objetivo fundamental es realizar ensayos donde se observara si la Furanona ejerce un control bacteriano, desde una concentración del 2%, en medio de cultivo plate count, y como sustrato de carne de cerdo, con el fin de reducir poblaciones bacterianas que afecten la salud humana. Analizando los estudios realizados con la Furanona 2 (5H) nos muestran resultados satisfactorios en el control bacteriano de instrumentos de odontología y recubriendo prótesis plásticas, pero sin comprobar con el paso de los años si puede existir una afectación negativa sobre la salud humana.

Los resultados que arrojaron las evaluaciones, nos muestran cuantitativamente una disminución de las bacterias que pueden crecer en el medio de cultivo plate count como son

Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Lactococcus lactis, Listeria monocytogenes, Lactobacillus acidophilus, Bacillus cereus, y Escherichia coli con la Furanona 2 (5H), desde una concentración de 0,2 mL en 10 mL de agua.

Esta investigación se llevó a cabo en los laboratorios de la Universidad EAN dentro del marco de proyectos de grado de los estudiantes de pregrado de la Facultad de Ingeniería, apoyados en las Ciencias Básicas.

PALABRAS CLAVES

Furanona, porcinos, inhibición, bacterias, contaminación, sustentabilidad.

6. ABSTRACT

This research takes inspiration from the concept of Biomimicry (Benyus, 1997) holding that evolutionary processes in biological systems have created sophisticated and environmentally sustainable mechanisms that can be replicated or used for solving current problems. Example of this is the mechanism used by some red algae (Rhodopyta: Delicea pulchra) for blocking communication between bacteria using a lactone group call Furanone, this strategy has the advantage of not generating bacterial resistance, unlike what happens with conventional antibiotics (Benyus)

The implementation of the control Furanone bacterial pig meat could be an effective and environmentally sustainable solution, so that in this research the objective is testing where observed if bacterial Furanone exercises control from a concentration 2% in culture medium plate count, and as a substrate of pork, in order to reduce bacterial populations affecting human health. Analyzing studies with Furanone 2 (5H) show satisfactory results in controlling bacterial dental instruments and plastic stent coating, but check with the passage of time if it can be a negative affection on human health.

The results yielded the evaluations, we quantitatively show a decrease of bacteria that can grow in the culture medium plate count such as Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Lactococcus lactis, Listeria monocytogenes, Lactobacillus acidophilus, Bacillus cereus, and Escherichia coli with furanone 2 (5H), since a concentration of 0.2 mL in 10 mL of water.

7. GLOSARIO

Biopelícula: es una comunidad de microrganismos que crecen embebidos en una matriz autosecretada de exopolisacáridos y proteínas,que le permite adherirse a superficies inertes o vivas.

Furanona: Es un compuesto orgánico heterocíclico, clasificado como Lactona

Lactona: Es un compuesto orgánico de tipo éster cíclico, se caracteriza por la presencia de un anillo cerrado con dos o más átomos de carbono y un único oxigeno endocíclico acoplado a la cetona.

Porcicultura: Es la cría de ganado porcino con fines industriales generalmente para alimentación humana,

POES: Es un sistema de gestión de calidad para producción agroalimentaria, resumido en un conjunto de procedimientos operativos estandarizados de saneamiento, que describe los procesos que se deben seguir durante la producción.

8. INTRODUCCION

A lo largo de la historia, epidemias y pandemias de origen microbiano han causado incontables muertes e inversiones onerosas para mitigar sus consecuencias o prevenir su expansión, “en los pasados 400 años, las epidemias de influenza han sido reportadas en muchos países. Las epidemias desde el siglo XVI en Inglaterra y la del siglo XVIII en USA” (Talavera, 1999)

Las enfermedades transmitidas por lo alimentos en malas condiciones, son el factor de mayor riesgo sobre los seres humanos, tienen su origen en el ineficiente control sanitario de los alimentos durante cualquier etapa del proceso de producción. Las bacterias que alteran la carne pueden tener acceso a la misma por infección del animal vivo (infección endógena) o por contaminación de la carne post-mortem (infección exógena), (microbiologia de la carne).

Hoy en día, las medidas para prevenir la contaminación de los alimentos son prácticas sencillas y aunque pueden ser aplicadas de manera exitosa, son medidas que dependen del usuario final, como por ejemplo seleccionar los alimentos de mejor calidad, lavarlos y cocinarlos adecuadamente antes de consumirlos. Pero durante la cadena productiva se cuenta con pocos métodos (Ej: Empaque al vacío) y aun no existe una metodología que

permita tener un mejor control de calidad desde el momento del sacrificio, (extracción, corte y empaque) hasta la distribución del producto.

En los frigoríficos las medidas de prevención actuales, se centran en desinfectantes químicos para los utensilios, pero ya que la desinfección completa de la herramienta en el producto toma alrededor de 10 segundos, los trabajadores deben usar más de un elemento (Ej. Cuchillos, lo cual genera retrasos en la cadena de producción) comento trabajador, en visita del autor al de frigorífico de Zipaquirá, en el año 2012, la utilización de estos químicos como el hipoclorito de sodio, puede generar problemas de salud tanto a los empleados como la consumidor si se tiene un uso excesivo de estos o si la concentración del producto es muy elevada.

Algunos patógenos de la carne pueden ser "La *Campylobacter*, La *Salmonella*, la *Liateria*, el toxoplasma y el *norovirus*. La *Campilobacteria*, que contamina con gran frecuencia a los pollos, intoxica a más de 600.000 personas al año y cuesta 1,3 mil millones de dólares al año. En segundo lugar está el toxoplasma que se anida en la carne de cerdo: causa pérdidas por 1,2 mil millones de dólares al año. (Michael B. Batz, 2011), evidenciando a través de estudios el impacto, económico, social, de salud, y ambiental que genera la contaminación de los productos cárnicos, debemos encontrar alternativas para reducir este inconveniente una solución a esto podría ser la Furanona.

La Furanona se extrae de las algas *Delicea pulchra* y se puede aplicar a diferentes materiales como superficies, elementos o incluso a los alimentos y realizará el proceso de

bloquear las comunicaciones entre bacterias, así no formaran un biofilm y no contaminaran. La Furanona químicamente es una lactona, tiene formula molecular C4H4O2

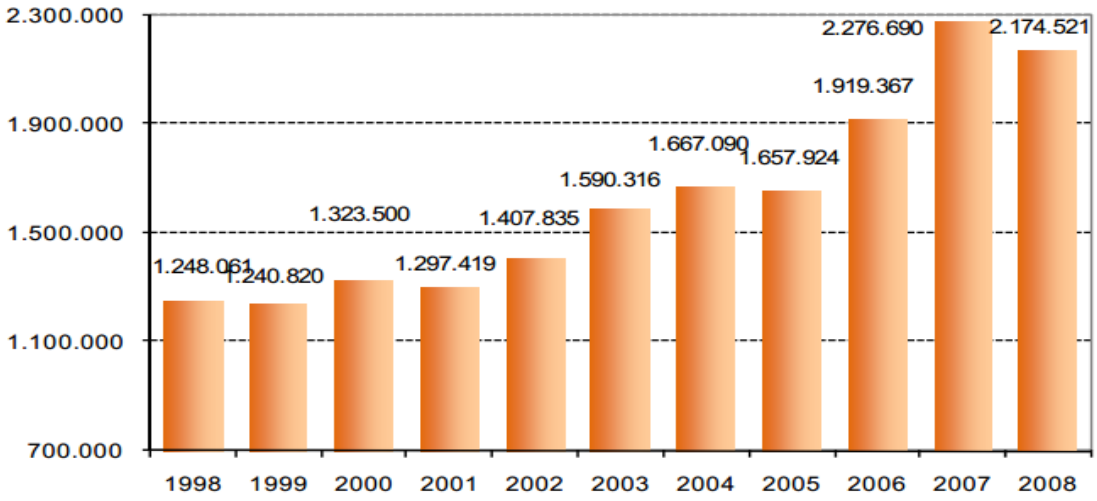
La implementación de la Furanona en el control bacteriano de las carnes de porcino, seria solución eficaz, evitando la formación de biofilms y sostenible ya que es orgánica y disminuiría el uso excesivo del recurso hídrico durante los procesos de despostaje, empacado y transporte, por lo que en este trabajo el objetivo fundamental será estudiar el efecto inhibidor de bacterias, que posee la Furanona 2 (5H), en bacterias asociadas a las carnes de porcino y que puedan proliferar en el agar seleccionado.

9. PROBLÉMA

Actualmente en Colombia se cuenta con el hipoclorito de sodio como un agente de control bacteriano, en la desinfección de equipos de despostaje y camiones de repartos de las carnes de porcino, pero este trae implicaciones toxicas para el consumidor final, se utiliza porque es económico y es letal para varios microorganismos, virus y bacterias vegetativas, pero es menos efectivo contra esporas bacterianas, hongos y protozoarios, la actividad del hipoclorito se ve reducida en presencia de iones metálicos, (Hipoclorito de sodio como agente desinfectante, 2008) para asegurar a los consumidores que las carnes se encuentran libres de patógenos contaminantes, se emplean químicos perjudiciales para la salud humana, como el hipoclorito de sodio ya mencionado, para el fin de proporcional al consumidor un producto con riesgos mínimos es necesario implementar controles de desinfección que no sean nocivos, también que ayuden a mejorar las condiciones de gastos del proceso productivo como en el caso del recurso hídrico donde se utilizan grandes cantidades de agua para tratar de que el producto se encuentre limpio, generando lixiviados, que contaminaran más tardes fuentes hídricas, y al final ni el uso de químicos fuertes ni el uso excesivo de agua son una solución eficaz ni amigable con el ambiente.

"En Colombia existen muchos lugares de sacrificio de porcino que no cumplen con los requisitos y operan de manera no autorizada alrededor de un 40%, lo cual nos dará un sacrificio anual de prácticas formales e informales de 3.500.000 cerdos en Colombia", este dato para el 2008, (Velasco "problemática del sacrificio de porcinos en Colombia" 11 de mayo del 2009, Bogotá D.C. Asociación Colombiana de Porcicultores de Colombia -

fondo nacional de porcicultura recuperado el 06 de marzo de 2013) por lo que se generan impactos en varios niveles, siendo el más crítico la salud pública, ya que genera riesgos en la salud de los consumidores de carnes contaminadas en la figura 1 se muestra el crecimiento gradual del sacrificio de las cabezas de porcino en Colombia, entre los años 1998 y 2008.



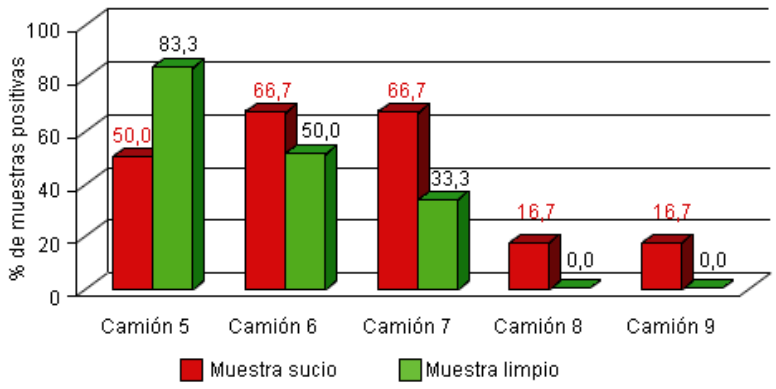
Sacrificio de ganado porcino entre los años 1998-2008, medido en el número acumulado de cabezas sacrificadas entre enero-diciembre de cada año *figura 1*

Fuente: Área de PPC

El cerdo es un animal sensible al estrés y no encontrarse en un ambiente adecuando se produce un aumento en la secreción de glucocorticoides, lo cual moviliza aminoácidos y

reduce la disección proteica e interfiere con algunos mecanismos de inmunidad frente a enfermedades infecciosas, afectando negativamente al consumidor

"El transporte es una etapa importante para la transmisión de Salmonella en la cadena alimentaria. En ambientes altamente contaminados, una infección inicial en tonsilas, puede diseminarse por vía linfática y alcanzar colon y recto en tan solo 2 horas, es decir, los cerdos se infectan al exponerse en menos tiempo que lo que duran el transporte y espera en matadero. Los cerdos infectados son portadores durante mucho tiempo y en situaciones de estrés pueden eliminar Salmonella por heces en cualquier momento" (Enric Marco, 2012), en la figura 2 se muestran los resultados de salmonella positiva a las carnes que se transportaron en un camión en el cual solo se le realizó una limpieza superficial, mostrándonos que es necesario un protocolo y una limpieza más especializada en esta etapa del producto de la carne de cerdo



Resultado de muestras positivas a salmonella con "sólo limpieza" del camión *figura 2*

Fuente: Pedro Rubio 2001

Un segundo impacto de gran importancia es la afectación ambiental por manejo inapropiado de lixiviados y desechos de alto riesgo microbiano (El Área de Desarrollo Sostenible y Salud Ambiental de la Organización Panamericana de la Salud (OPS)) los lixiviados que se generan en la parte final de la cadena de producción (transporte de carne porcina a carnicerías locales) no se maneja adecuadamente ya que la ven como un problema menor por ser agua con sangre, pero la sangre de estos animales puede generar patógenos de gran riesgo, estos son vertidos en las alcantarillas, y el volumen de esta agua es significativo ya que el lavado de camiones expendedores y vitrinas de exhibición lo hacer con grandes cantidades de agua, agotando el recurso hídrico y contaminando las fuentes hídricas a donde van a parar estos lixiviados.

Dados estos problemas es de vital importancia preguntarse ¿Cómo contribuiría la Furanona como agente de control bacteriano en la carne porcina en Colombia?

10. JUSTIFICACION

La aplicación de Furanona sobre los equipos de sacrificio de porcinos, y los equipos de transporte evitará que las bacterias se comuniquen y formen biopelículas que pueden desencadenar infecciones en los consumidores, se espera que esta información sea utilizada para mejorar las condiciones sanitarias del proceso productivo de las carnes de porcino.

Un agente de control bacteriano para este tipo de productos, impedirá la intoxicación y muerte de seres humanos, por ingestión o por la utilización de químicos fuertes que afectan la salud de los empleados de los lugares de sacrificio, y a los consumidores finales, junto con los costos asociados en la cura y/o control de estas enfermedades, lo cual se ahorrara dinero, tiempo y otros recursos de gran importancia que se gastan con estos acontecimientos.

Esta investigación quiere demostrar la conveniencia de utilizar mecanismos biomiméticos que la naturaleza ha desarrollado a través de millones de años en su proceso evolutivo, para solucionar nuestros problemas cotidianos, como la Furanona, está al ser un mecanismo de producción limpia genera un impacto negativo ambiental bajo, es naturalmente sostenible y revolucionaría la industria porcina, dándole al mercado un valor agregado, donde los consumidores pueden confiar que el producto que se manipuló con implementos impregnados con Furanona, es apto para el consumo humano, minimizando riesgos de epidemias, hace reducir costos al productor en el uso exagerado de agua en algunas partes del proceso haciendo uso eficiente del recurso hídrico ya que se tendrá la seguridad de una

descontaminación en el producto, así minimizara los lixiviados en el proceso de sacrificio y entrega de las carnes de cerdo. Incluyendo la Furanona en los procesos de POES (Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento) estipulado por el INVIMA y que deben ejecutar los lugares de sacrificio, también se brindaría una alternativa económicamente viable, que estimule aquellos centros de sacrificio ilegal o con normativa vencida a vincularse al sistema nacional y cumplir la normativa progresivamente de estos procesos.

11. OBJETIVOS

11.1 OBJETIVO GENERAL

Ensayo preliminar de la Furanona como agente de control bacteriano en carnes de porcino.

11.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Seleccionar el medio de cultivo más adecuado para el crecimiento poblacional de bacterias asociadas a la carne de cerdo, disponibles en los laboratorios de la Universidad EAN, entre palte count agar y potato drextrosa agar,

2. Realizar ensayos experimentales para determinar la acción inhibidora, en las bacterias que crecen en el agar seleccionado, asociado a las carnes de porcino, de la Furanona 2(5H).

3. Determinar experimentalmente la concentración y cantidad de la Furanona en el cual ejerce una disminución en el crecimiento poblacional de bacterias, en el medio de cultivo seleccionado asociado a bacterias de la carne de cerdo.

12. ALCANCE

Se realizaron las investigaciones preliminares para determinar las empresas que están trabajando con Furanona, los productos que están generando, que empresas venden a nivel mundial y los diferentes tipos de Furanonas, los estudios realizados a nivel mundial utilizando diferentes Furanonas, También se realizó la visita al frigorífico de Zipaquirá, su proceso se encuentra bajo el decreto 2278, se identificaron puntos críticos en el proceso de sacrificio.

En el laboratorio de la Universidad EAN se desarrollaron la selección del agar para realizar las pruebas experimentales para el crecimiento bacteriano y determinar si se reduce el crecimiento bacteriano utilizando la Furanona seleccionada, los cultivos se realizan con carnes de porcino de diferentes fuentes.

Los resultados experimentales se documentan y analizan para determinar el grado de control bacteriano, demostrando si la Furanona es adecuada en el control bacteriano de la carne de porcino.

13. MARCO TEORICO

13.1 Contaminación

La contaminación por Salmonella de camiones antes de la carga es frecuente, con el riesgo de infecciones o re-infecciones para cerdos procedentes de granjas no infectadas. Esta situación no es aceptable sanitariamente, pero en la práctica tenemos limitaciones:

El diseño del vehículo no tiene en cuenta la limpieza.

El “descanso” del vehículo (inactividad) resulta caro.

Necesidad instalaciones de lavado adecuadas.

Las variaciones climáticas afectan los resultados del desinfectante.

Debemos formar el personal.

Necesitamos supervisar y verificar. (Escobet, 2012)

No solo la *Salomonella* representa un peligro en la contaminacion de las carnes de porcino otras bacterias como las que se muestras en la tabla 1 pueden invadir la carne generando problemas de salud al consumidor que las ingiera.

Bacterias que puede tener la carne *Tabla 1*

Alterantes

• *Bacterias lácticas*

• *Levaduras Y Mohos*

• *Enterobacterias*

• *Pseudomonas*

Patógenos

• *Salmonella*

• *Escherichia coli*

• *Staphylococcus aureus*

• *Listeria monocytogenes*

• *Clostridium botulinum*

• *Bacillus cereus*

• *Campylobacter*

• *Yersinia*

(Fuente: microbiología de la carne)

"Por definición, la carne y los pollos son productos de alto riesgo, y si se están contaminando en los lugares de sacrificio, aumenta el riesgo de los consumidores finales" (Tucker Foreman, CFA miembro del Instituto de Política Alimentaria de la Federación de Consumidores de América)

13.2 Ilegalidad

El seis de noviembre del 2008 EL ESPECTADOR, publica una noticia que se titula “Sellados 40 expendios de carne por no cumplir con normas sanitarias” donde se evidencia la preocupación por los mataderos clandestinos, aquellos “ no cumplen con las condiciones higiénico sanitarias, no cumplen con manejo de agua potable, ni con adecuada disposición

de aguas residuales" declara Zambrano, secretario de salud (Sellados 40 expendios de carne por no cumplir normas sanitarias, 2008) en la tabla 2 INVIMA, registra las plantas y mataderos de sacrificio porcino que cumplen con la norma.

Plantas de sacrificio reportadas por el INVIMA resolución 2008031445, modificada por resolución 2009006158 y 2003006159 (5 de marzo de 2009) *Tabla 2*

No.	Razón Social	Municipio	Departamento	Cód.
85	Empresa Industrial Y Comercial Frigorifico Y Plaza De Ferias Zipaquira	**Zipaquira**	Cundinamarca	004P
86	Planta De Sacrificio Y Faenado De Porcinos Chia	**Chia**	Cundinamarca	028P
87	Planta De Sacrificio Y Faenado De Porcinos San Bernardo	**San Bernardo**	Cundinamarca	031P
88	Alcaldia Muinicipal De Anolaima	**Anolaima**	Cundinamarca	104P
89	Frigorifico Guadalupe Bogota	**Bogota**	Cundinamarca	184P
90	Frigorifico San Martin Bogota	**Bogota**	Cundinamarca	185P
91	ICTA Bogota	**Bogota**	Cundinamarca	307P
92	Matadero Municipal De Fosca	**Fosca**	Cundinamarca	310P
93	Matadero Municipal De Gacheta	**Gacheta**	Cundinamarca	311P
94	Matadero Municipal De Ubate	**Ubate**	Cundinamarca	320P
	Total 2008	**10**	**FUNCIONANDO**	**7**
1.2.3	Matadero Municipal Tocaima	Tocaima	Cundinamarca	123P
2.3.96	Matadero Municipal Agua De Dios	Agua De Dios	Cundinamarca	244P
2.3.97	Matadero Municipal El Peñón	El Peñon	Cundinamarca	308P
2.3.98	Empresas De Servicios Varios Municipales De Facatativa	Facatativa	Cundinamarca	309P
2.3.99	Matadero Municipal Fusagasugá	Fusagasuga	Cundinamarca	142P
2.3.100	Alcaldia Municipal De Granada	Granada	Cundinamarca	186P
2.3.101	Planta De Beneficio Las Ceibas	La Mesa	Cundinamarca	313P
2.3.102	Matadero Municipal La Palma	La Palma	Cundinamarca	314P
2.3.103	Alcaldia Municipal De la Vega	La Vega	Cundinamarca	315P
2.3.104	Municipio De Manta	Manta	Cundinamarca	393P
2.3.105	Matadero Municipal de Pulí	Puli	Cundinamarca	316P
2.3.106	Matadero Municipal Quipile	Quipile	Cundinamarca	317P
2.3.107	Planta De Beneficio Las Ceibas	Supata	Cundinamarca	318P
2.3.108	Matadero Municipal Tausa	Tausa	Cundinamarca	319P
2.3.109	Matadero Municipal Vergara	Vergara	Cundinamarca	321P

Fuente: www.invima.gov.co

Fuente: INVIMA

Son muy pocos los frigoríficos certificados bajo el Decreto 2278 de 1982 y se considera que al entrar en vigencia el Decreto 1500 del 2007, que contiene aún más regulaciones para este tipo de procesos, la mayoría de lugares que prestan los servicios de sacrificio no poseerán recursos para cumplir toda la normativa, así buscarán apoyo económico gubernamental, o se volverán clandestinas o simplemente fracasarán, la figura 3 muestra el número de cabezas de ganado sacrificadas en lugares clandestinos y legales por departamentos en el periodo de tiempo 2007- 2008.

Sacrificio nacional de cabezas de porcino por departamento, Enero a Diciembre 2007- 2008 área económica, asociación Colombiana Porcicultores *Tabla 3*

Sacrificio porcino nacional y por departamentos (Cabezas): Enero - Diciembre

Departamento	2007	2008	Part (%)	Tasa de Crecimiento
Antioquia	957.283	976.103	44,9%	2,0%
Bogotá, D.C.	520.203	489.453	22,5%	-5,9%
Valle del Cauca	257.953	247.477	11,4%	-4,1%
Risaralda	66.384	85.708	3,9%	29,1%
Caldas	76.105	72.395	3,3%	-4,9%
Nariño	43.816	38.418	1,8%	-12,3%
Atlántico	32.612	37.659	1,7%	15,5%
Quindío	40.649	33.690	1,5%	-17,1%
Tolima	47.782	30.142	1,4%	-36,9%
Huila	36.209	29.001	1,3%	-19,9%
Santander	31.268	24.094	1,1%	-22,9%
Meta	31.133	23.646	1,1%	-24,0%
Boyacá	26.344	16.435	0,8%	-37,6%
Cundinamarca	42.227	14.948	0,7%	-64,6%
Otros	66.722	55.352	2,5%	-17,0%
Total Nacional	**2.276.690**	**2.174.521**	**100%**	**-4,5%**

Fuente: sistema nacional de recaudo, asoporcicultores – FNP

La figura tres nos refleja que en los departamentos de más sacrificio de porcinos es Antioquia, Bogotá, y el valle del cauca, pero la tabla 3 nos muestra que las plantas y mataderos legales se encuentran en su gran mayoría en Cundinamarca, esto quiere decir que la mayoría de las cabezas de porcinos están siendo sacrificadas ilegalmente, Siendo la congelación uno de los pocos procesos de control bacteriano permitido en Colombia, donde el agua de la carne se congela entre -1 °C y 5 °C (Garcia) y aunque algunos lugares ofrecen la opción del empaque al vacío, ambas opciones son costosas y pocos productores están

dispuestos a pagar por ellas,(Empleado de frigorífico de Zipaquirá comenta en visita realizada por el autor en el año 2012.)

13.3 Peligro químico

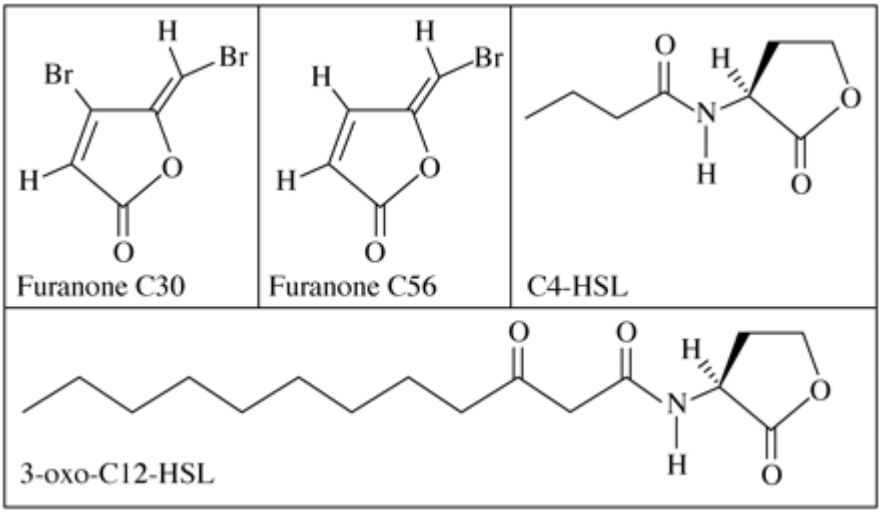
Un punto de gran importancia y que se ha dejado de lado es el uso de químicos, por ejemplo, los empleados de los frigoríficos están expuestos no solo a los cerdos que pudieran estar contaminados sino a los fuertes químicos que se utilizan en estos lugares, afectando la salud de los empleados, también en algunas ocasiones las instalaciones, camiones y locales de venta los lavan con cloro el cual no dosifican correctamente y también puede llegar a perjudicar el producto que es la carne de cerdo y enfermar así a sus consumidores y operarios por la exposición a estos desinfectantes.

13.4 Diferencias estructurales entre Furanonas y Lactonas

Profesores de la Universidad de Nueva Gales del Sur (UNSW) Peter Steinberg y Staffan Kjelleberg, descubrieron mientras buceaban en las costas del sur de Australia un alga marina roja (la *Delicea pulchra*) a la que no habían colonizado las bacterias siendo el océano es un "nido" de bacterias; Peter y Staffan se dieron cuenta de que la forma de comunicarse de las algas bloqueaba las conexiones entre las bacterias, los científicos conocen esto como química inhibidora de los sentidos (QSI). Si las bacterias no pueden comunicarse entre ellas, es imposible que se coordinen y menos aún que invadan al

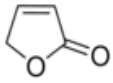
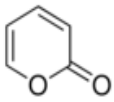
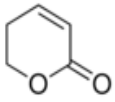
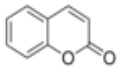
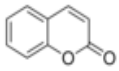
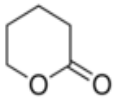
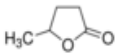
anfitrión. Ambos profesores patentar este mecanismo de defensa desarrollado a lo largo de millones de años, la Furanona es la lactona de esta alga que posee el QSI. (Pauli, 2010)

Se ha informado sobre la inhibición de la enzima de zinc de la anhidrasa carbónica (CA, CE 4.2.1.1) con (tio) cumarinas. (Maresca et al., J. Am.. Chem.. Soc. 2009) Aquí se demuestra que una serie de lactonas también actuar como mecanismo de base, profármaco inhibidores de tipo CA, similares a las cumarinas (tio). A través de la actividad esterasa de CA, estos compuestos se hidrolizan in situ a los ácidos hidroxi / ceto / mercapto correspondientes, que a partir de entonces actúan como inhibidores. Inhibidores de la Isoforma CA, pueden tener aplicaciones interesantes, por ejemplo, para inhibir selectivamente el tumor asociada CA IX, un objetivo contra el cáncer (Oxfordjournals)



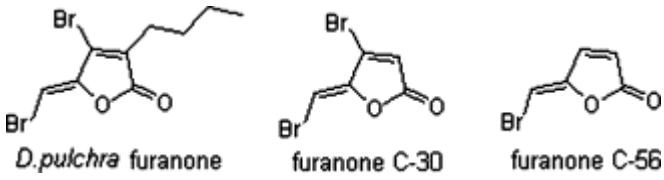
Estructura química de las diferentes Furanonas *figura 3*

Fuente: Oxford journals.

Product #	Image	Description	Molecular Formula
283754		2(5*H*)-Furanone, 98%	$C_4H_4O_2$
463159		2*H*-Pyran-2-one, 90%	$C_5H_4O_2$
262102		5,6-Dihydro-2*H*-pyran-2-one, technical grade, 90%	$C_5H_6O_2$
C4261		Coumarin, ≥99% (HPLC)	$C_9H_6O_2$
W526509		Coumarin, Chinese	$C_9H_6O_2$
389579		δ-Valerolactone, technical grade	$C_5H_8O_2$
W310301		γ-Valerolactone, ≥98%, FCC, FG	$C_5H_8O_2$

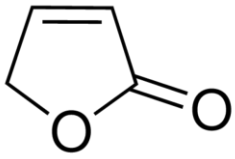
Estructuras químicas y fórmulas de lactonas inhibidoras *figura 4*

Fuente: catalogo sigma 2013



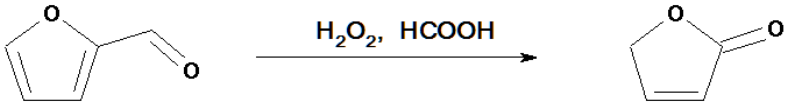
Estructuras químicas de Furanonas comerciales *figura 5*

Fuente: sciencedirect.com



Estructura química de la furanona 2(5H) *figura 6*

Fuente: catalogo sigma 2013



Síntesis de la Furanona *figura 7*

Fuente: Wikipedia

Se debe hacer la aclaración de que existen furanonas para los usos alimenticios estas son saborizantes furaneol, conocido como furanona, furanona piña, furanona fresa, 2,5-dimetil-3-hidroxy-4-oxo-4,5-dihidrofurano. Presencia natural en fresa, piña, café, uva, malta, mango, frambuesa, palomitas y grosella (quiminet) Las cuales no tienen las propiedades inhibidoras de la lactona

13.5 efectos sobre la salud y medio ambiente de la Furanona 2 (5H)

En las especificaciones de la Furanona 2 (5H) determina la información.

Información toxicológica

Toxicidad aguda: sin datos disponibles

Corrosión/irritación cutánea: sin datos disponibles

Serio daño o irritación ocular: sin datos disponibles

Sensibilidad cutánea o respiratoria: sin datos disponibles

Mutagenicidad en células germinales: sin datos disponibles

Carcinogenicidad: ningún componente de este producto presenta niveles mayores o iguales a 0,1 % de identificación, probable, posible o confirmado de carcinogenicidad por IARC

Riesgo de aspiración: sin datos disponibles

Efectos potenciales de salud: puede ser nocivo si se inhala, se ingiere, se aplica directamente en la piel u ojos.

Información ecológica

Toxicidad: sin datos disponibles

Persistencia y degradación: sin datos disponibles

Bioacumulacion potencial: sin datos disponibles

Movilidad en suelo: sin datos disponibles

Otros efectos adversos: sin datos disponibles

Al no tener información de muchos aspectos de la sustancia, no se puede determinar la afectación a la salud humana en corto mediano o largo plazo.

13.6 ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento de la Furanona en la costa de Sídney, concluyeron que las algas rojas *delicea pulcha* no poseían la película de microorganismos que poseen naturalmente los organismos marinos, se han adelantado productos con los beneficios de inhibir el crecimiento de biofilms para usarlos en hospitales y centros médicos.

También alrededor de mundo se han realizados estudios con diferentes Furanonas incluida la 2(5H) demostrando que es efectiva en la reducción de biofilm o población bacteriana, de instrumentos quirúrgicos, prótesis, e instrumentos de odontología, algunos de estos estudio se encuentran a continuación

13.6.1 **El uso de la detección de quórum inhibidor furanona C-30 para interferir con la formación de biofilm por Streptococcus mutans y sus Luxs cepa mutante**

“Jasjit Baveja y sus colaboradores del Cooperative Research Center for Eye Research and Thecnology, en Sidney, han encontrado que algunas sustancias denominadas "furanonas",

impiden en un 90% que la bacteria "*Staphylococcus epidermis*" produzca las sustancias que conglomeran el biofilm. Ya hace algunos años que se había descrito que las furanonas eran el agente que permitía a las algas rojas "*Delisea pulchra*" mantenerse libres de bacterias y otros organismos marinos…Por ello han planeado iniciar los ensayos destinados a prevenir las infecciones en los trasplantes de metales en humanos" (Baveja, 2002)

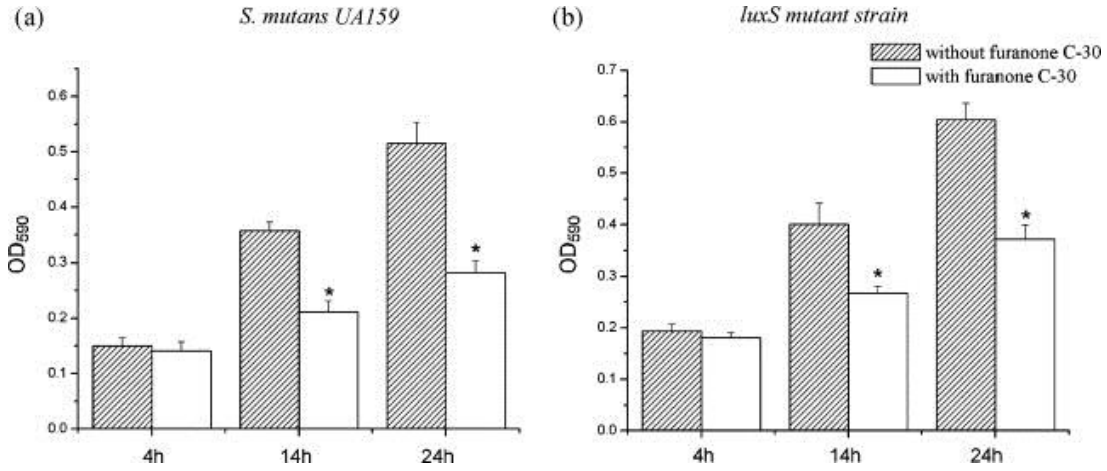


Tabla de resultados estudio "El uso de la detección de quórum inhibidor furanona C-30 para interferir con la formación de biofilm por *Streptococcus mutans* y sus Luxs cepa mutante" *figura 8*

Fuente: Cooperative Research Center for Eye Research and Thecnology, en Sidney

13.6.2 **La compañía biotecnológica australiana Biosignal y el Instituto para la Investigación de ojos han recibido la aprobación ética para el estudio clínico en humanos de recubrimiento antibacterial lentes de contacto**

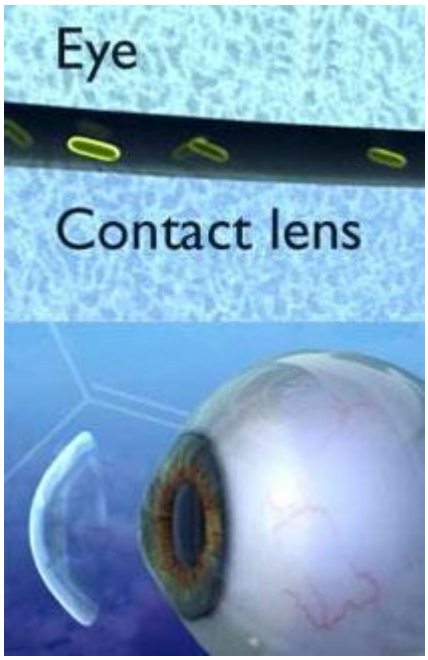
La Universidad de Nueva Gales del Sur, donde la mayor parte de la investigación sobre la tecnología antibacteriana furanona se realizó, explica que el núcleo de Biosignal,

plataforma AOS, extensa red IP, es una serie de nuevos compuestos, conocidos como furanonas. Estas moléculas actúan como antagonistas en vías de señalización de bacterias, lo más importante es la prevención de biopelículas altamente resistentes que se forman en las superficies, incluyendo superficies biológicas.

La tecnología Biosignal no mata las bacterias pero, Äújams, Äù señala que detiene la colonización bacteriana, por lo tanto la resistencia bacteriana y no posee impactos ambientales que negativos y otra ventaja es el hecho de que furanonas son biodegradables.

Las bacterias mutar y generar resistencia como resultado de confrontar presión selectiva. Esta presión es alta cuando la supervivencia del organismo se ve amenazada por un biosida. La presión ejercida por Biosignal, AOS anti-biofilm compuestos, es baja, ya que las bacterias no invaden una superficie particular. El alga que se descubrió que posee este mecanismo, primero utiliza los compuestos de origen natural para prevenir la colonización superficie bacteriana, esto ha sido eficaz durante millones de años sin causar resistencia bacteriana.

Con compuestos como estos Biosignal, AOS sintéticos biofilm anti-compuestos, podría tener amplias aplicaciones comerciales. (Ovstrovsky, 2006)



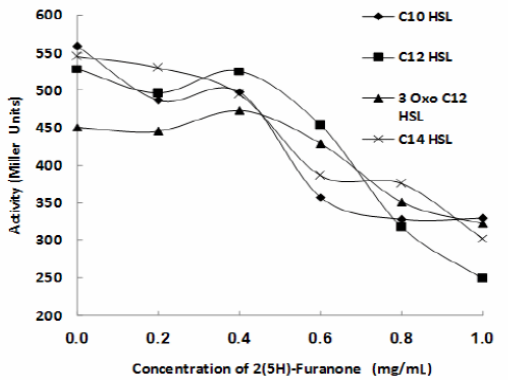
Lentes de contacto recubiertos de furanona Biosignal, AOS sintéticos biofilm anti-compuestos *figura 9*

Fuente: med gadget

13.6.3, **Furanona 2 (5H) una estrategia de prospectiva de contaminación biológica en la inhibición de la membrana biofilm de bacterias quórum sensing**

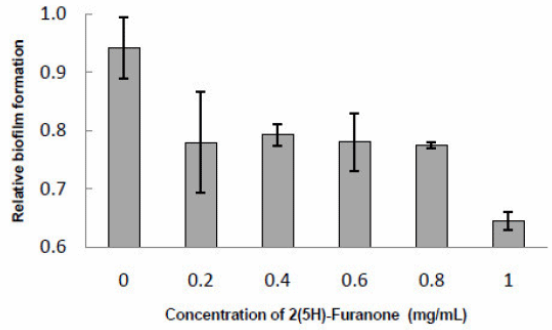
“La contaminación biológica de las membranas exige costosos una sostenible solución ecológica para el mantenimiento no está disponible y sería de gran interés para muchos. Como la formación de biopelículas complejas por cepas ambientales es la causa principal de la contaminación biológica y la formación de biopelículas en la mayoría de los casos son controlados por N-Acylhomoserine lactona (AHL) -mediada por Quorum Sensing (QS). Se

hizo un esfuerzo para comprender la pertinencia de 2 (5H)-furanona, para usarla contra la contaminación biológica de las membranas. Actividad de inhibición de QS por 2 (5H)-furanona se estudió utilizando cepas bioindicadores y AHLS conocidas de diferentes longitudes de cadena de acilo. La inhibición de la biopelícula se estudió por análisis del crecimiento en la placa de poliestireno de Aeromonas hyrdrophila, una cepa aislada biofilm a partir de una membrana de ósmosis inversa bio-ensuciado (RO). Los resultados mostraron una actividad de inhibición de QS contra una amplia gama de AHL y también la formación de biopelículas por 2 (5H)-furanona, que se cree que actúa como un potencial agente de inhibición de quórum en una comunidad biofilm bacteriana" (Hwayang-Dong)



Propiedades de inhibición de la Furanona 2 (5H) en largas cadenas AHLs en agrobacterias tumefaciens NTL-4 *figura 10*

Fuente: Department of Environmental Engineering, Konkuk University, 1 Hwayang-Dong, Gwangjin Gu, Seoul, 143-701, Republic of Korea.



2(5H) Furanona interfiriendo con la acción de AHL molecular e inhibición QS *figura 10*

Fuente:Department of Environmental Engineering, Konkuk University, 1 Hwayang-Dong, Gwangjin Gu, Seoul, 143-701, Republic of Korea.

Furanonas se han utilizado ampliamente para el control de biopelículas en catéteres médicos y otros diversos campos. Puede ser una alternativa posible para las actuales estrategias de control de químicos para el control de la contaminación biológica en sistemas de membranas… los resultados mostraron que la furanona 2 (5H) inhibida comportamientos mediados por detección de quórum por interferencia con diversos compuestos de señales AHL de diferentes longitudes de cadena de acilo.” (Kannan Ponnusamy)

14. MARCO LEGAL

¬El decreto 2278 (2 de agosto de 1982) reglamenta parcialmente el título V de la ley 09 de 1979 en cuanto al sacrificio de animales de abasto público para consumo humano y el procesamiento, transporte y comercialización de su carne.

¬ El artículo 245 de la ley 100 de 1993 ordena la creación del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos INVIMA que regulara lo asociado con la producción, importación, comercialización de productos alimentarios. Desde la evaluación de las condiciones de salud del animal por parte de un profesional veterinario, hasta el procesamiento y almacenamiento y consumo en condiciones de salubridad.

¬El decreto de 2011reglamenta el acceso a los recursos genéticos, sus productos derivados, los conocimientos tradicionales asociados y la distribución justa y equitativa de beneficios derivados de su utilización y se dictan otras disposiciones

POES (PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS DE SANEAMIENTO)

¬DECRETO NÚMERO 1500 DE 2007 (Mayo 4) Por el cual se establece el reglamento técnico a través del cual se crea el Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la Carne, Productos Cárnicos Comestibles y Derivados Cárnicos Destinados para el Consumo Humano y los requisitos sanitarios y de inocuidad que se deben cumplir en su producción primaria, beneficio, desposte, desprese, procesamiento, almacenamiento, transporte, comercialización, expendio, importación o exportación

¬DECRETO 2278 DE 1982(Agosto 02). Derogado por el art. 98, Decreto Nacional 1500 de 2007 Por el cual se reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 09 de 1979 en cuanto al sacrificio de animales de abasto público o para consumo humano y el procesamiento, transporte y comercialización de su carne.

15. METODOLOGIA

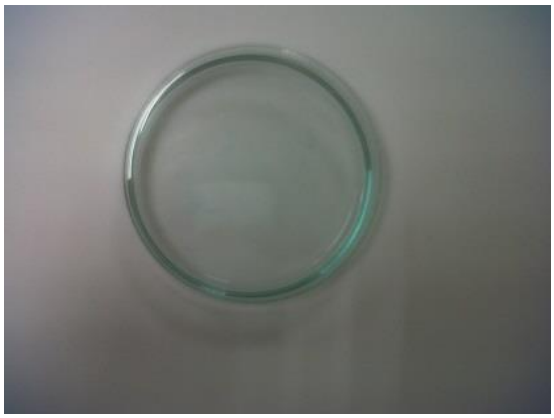
Se llevó a cabo uno ensayos preliminares para cualificar la acción bactericida de la Furanona en procesos metabólicos microbianos

Posteriormente, se importó la Furanona seleccionada que fue la Furanona 2 (5H), se realiza el plan de acción en el cual se experimentara con la Furanona seleccionada para el trabajo, los materiales necesarios para las pruebas fueron

15.1 Materiales

Fuente: autor

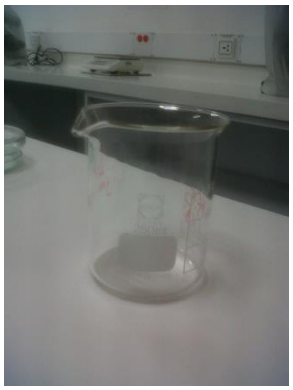
.



Cajas de Petri *figura 11*

Mortero *figura 12*

Fuente: autor



Vasos de precipitado *figura 13*

Fuente: autor

Pinzas *figura 14*

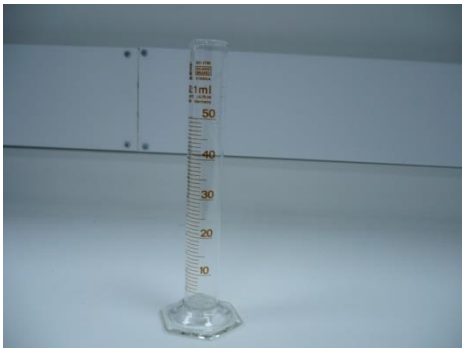
Fuente: autor

Pipeta *figura 15*

Fuente: autor

Vidrio de reloj *figura 16*

Fuente: autor



Probeta *figura 17*

Fuente: autor

Tubos de ensayo *figura 18*

Fuente: autor

Agitador *figura 19*

Fuente: autor

Asas *figura 20*

Fuente: autor

Plancha *figura 21*

Fuente: autor

Centrifuga *figura 22*

Fuente: autor

Bascula digital *figura 23*

Fuente: autor

Carne de cerdo *figura 24*

Fuente: autor

Medios de cultivo: plate cont (MERCK KGaA) Ref. 1.045463.0500.(*agar* peptona de caseína-glucosa-extracto de levadura para microbiología) y potato dextrose agar (SCHARLAU) *Ref. 01-483, figura 25*

Fuente: autor

Furanona 2(5H) SIGMA –ALDRICH (número del producto 283754-1) Singapore Science *figura 26*

Fuente: autor

15.2 Ensayos

Partiendo del interés de evaluar la acción de la Furanona para el control bacteriano en las carnes de porcino, se realizó un estudio preliminar para evaluar el crecimiento bacteriano en diferentes medios.

Los medios de cultivo que fueron seleccionados para realizar las pruebas son el plate count ya que es para crecimiento de *staphylococcus epidermidis* y *escherichia coli* (MAST Grup LTD.) y potato dextrose agar el cual permite crecimiento de *Aspergillus niger, Candida albicans Penicillium roquefortii , Trichophyton mentagrophytes* (acumendia), los dos agares son utilizados para pruebas de crecimiento bacteriano de productos alimenticios.

La realización del presente trabajo comprendió varias etapas:

15.2.1 Obtención de la solución tampón, figura 28, con esta se preparaban los agares

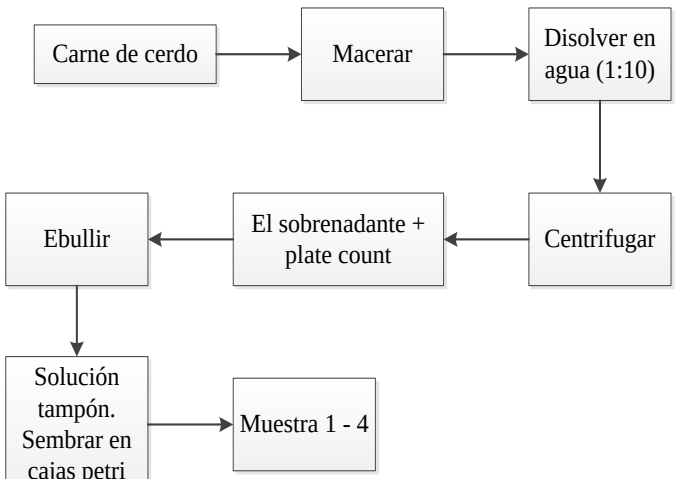


Diagrama de flujo obtención de solución tampón *figura 27*

Fuente: autor

Se utilizó características de carnes diferentes, incubación de las muestras con diferentes concentraciones y cantidades de solución de Furanona adicionadas, análisis de los resultados en cuanto al crecimiento de bacterias y al control de las mismas, de acuerdo a la eficiencia de la Furanona.

15.2.2 Ensayo número1

Se realizan cultivos bacterianos con carne de cerdo de un supermercado de cadena de la ciudad de Bogotá, se utiliza la solución tampón, para crear una alta concentración de sustrato, luego se adiciona este líquido (20 ml) con el agua (80ml) y la cantidad del agar plate count requeridos según concentraciones indicadas en el frasco (22.5 g por 1L de agua) se hierve y se dosifica en las cajas de Petri, para preparar el medio de cultivo lo que se busca con esto es asegurar el crecimiento de bacterias específicas de la carne de cerdo ya que tendrían la primera nutrición con el plate count este cumpliría con los requerimientos nutritivos y como segunda nutrición la sustancio proteínica de la carne de porcino que se encuentra en la sustancia tampón, luego se adiciona en una cajas de Petri el medio de cultivo, se deja enfriar , luego se destapa y se adicionan gotas de una solución de Furanona, en vez de un solo día a la temperatura de cultivo que seria 37°C, todas se voltean y se Incubaron a temperatura ambiente ya que la incubadora tenía otros cultivos con esta temperatura y se deja por 3 días, como se muestra en la figura 29.

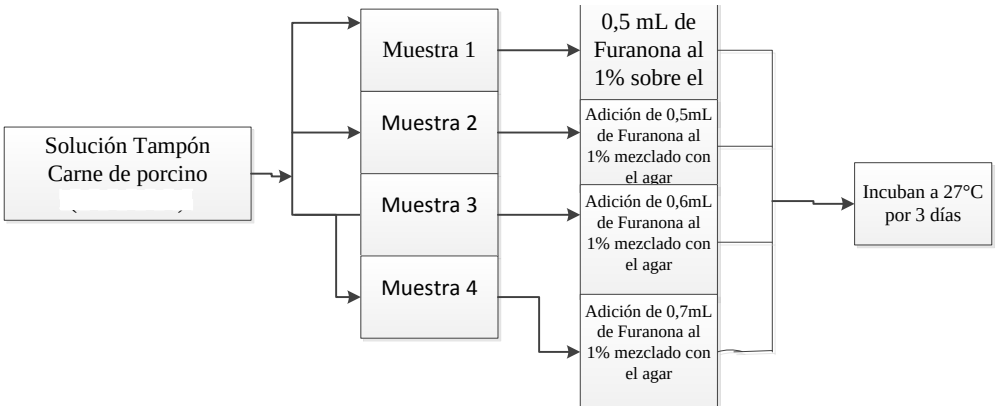


Diagrama de flujo de procedimiento experimental *figura 28*

Fuente: autor

15.2.3 Ensayo número 2:

Se realiza por segunda vez el laboratorio con la misma metodología del primero ya que una de las posibilidades de la falla fue que se utilizó carne de cerdo de la línea de supermercados y este almacén adiciona agentes preservarte a sus cárnicos, así pues se utiliza carne de un lugar de sacrificio ilegal del municipio de Cogua.

Como se muestra en la Figura 30

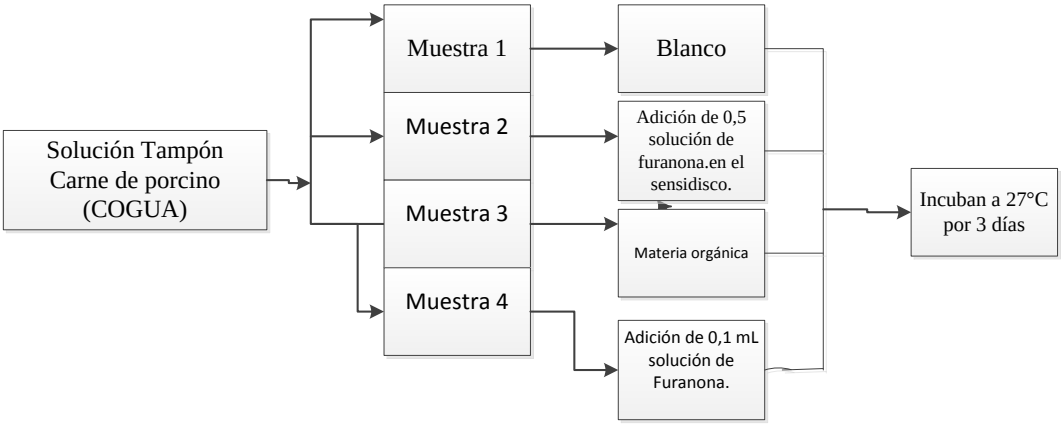


Diagrama de flujo evaluación número 2 *figura 29*

Fuente: autor

15.2.4 Ensayo número 3:

Se realizan nuevos ensayos para identificar el agar de mejor rendimiento, para ello se utilizó carne de cerdo de carnicería local del municipio de Zipaquirá, para estos ensayos, únicamente se realizó la solución acuosa con los medios de cultivo, para el plate count 2.25 g de agar para preparar en 100 mL de agua, y el potato dextrose agar, 39 g para preparar en 50 mL de agua, también se realizaron dos tipos de muestra con cada agar una tenia materia orgánica es decir un trozo macerado de carne de cerdo y la otra se obtiene por una siembra de dilución y es depositado en el medio de cultivo por una asa el diluido se realiza con una mescla de agua y carne de cerdo en concentración de 20 g de carne de cerdo macerado y 20mL de agua, esta se tamiza y se obtiene 10mL de la sustancia con el asa esterilizada se

deposita esta dilución en la caja de Petri con el agar ya solidificado. Como se muestra en la figura 31

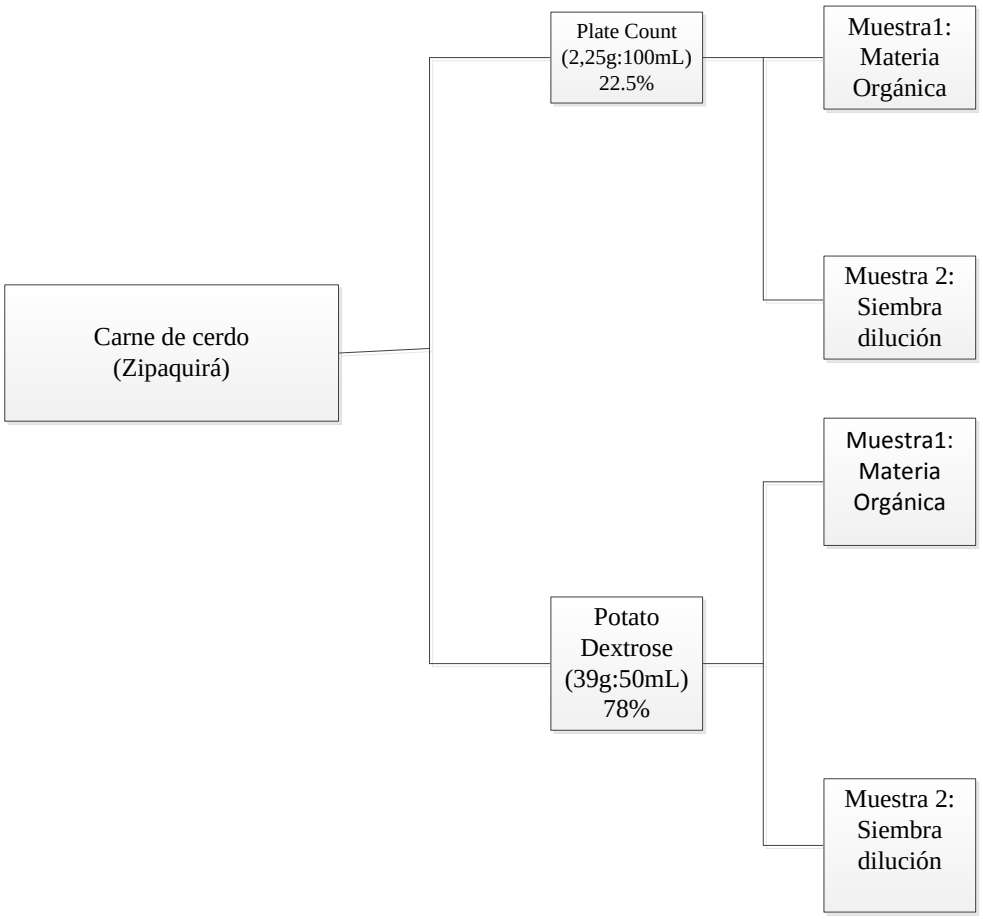


Diagrama de flujo evaluación 3 *figura 30*

Fuente: autor

15.2.5 Ensayo 4:

Se realiza un último laboratorio para determinar la concentración más adecuada en la inhibición de bacterias con la Furanona 2 (5h), se prepara el agar plate count, con agua normal, el líquido del tampón, se prepara con 10 mg de carne de cerdo macerada en 100mL de agua, el líquido se introduce en los agares con las asas realizando estrías, en la caja número uno se encuentra solo el agar(para determinar si la incubadora se encuentra en buenas condiciones o se encuentra con bacterias) la segunda caja se encuentra el agar con el líquido por estrías, en la tercera caja se encuentra el agar la sustancia tampón y algunas gotas de concentración de Furanona de 0,2 ml en 10 ml de agua, en la cuarta caja de Petri se encuentra el agar, las estrías de la sustancia liquida y una gota en el centro de Furanona con agua en iguales proporciones. Ver figura 32

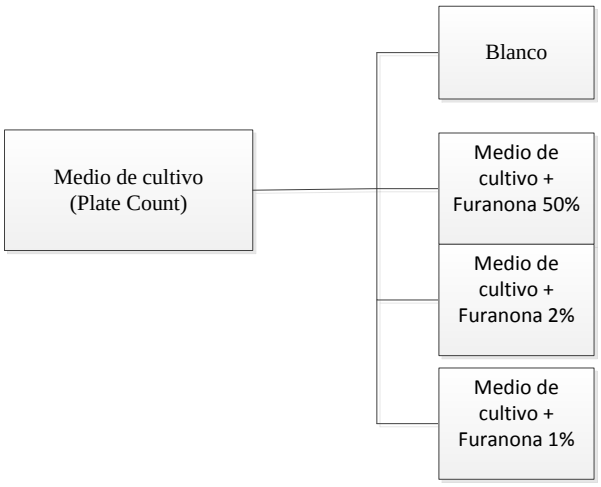


Diagrama de flujo evaluación 4 *figura 31*

Fuente: autor

16. RESULTADOS

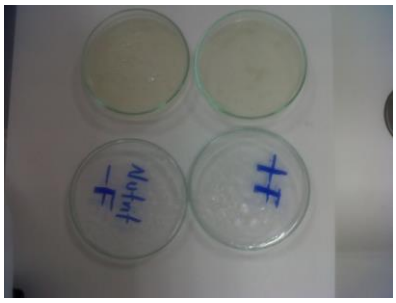
16.1 Resultados de la ensayo número 1:

Este agar no produjo cultivos exitosos, lo que se observa en las imágenes son pequeños trozos de la carne de cerdo pero no son colonias bacterianas. En la imagen cuatro se observa que donde se aplicaron las gotas de la concentración de Furanona, se genera un ablandamiento del agar.

Caja de Petri con cultivo nutritivo *figura 32*

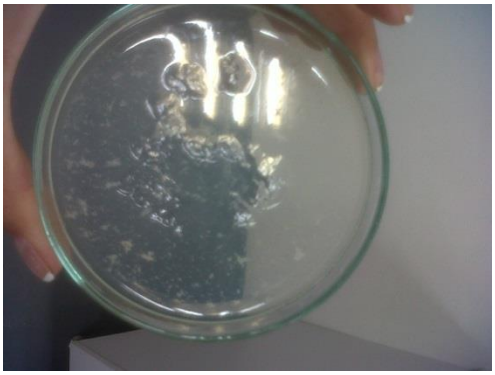
Fuente: autor

Caja de Petri con cultivo más Furanona *figura 33* Fuente: autor



Comparación de los cultivos *figura 34*

Fuente: autor

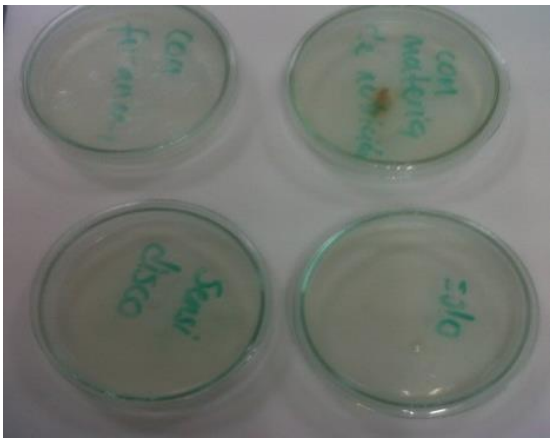


Vista de cultivo con Furanona *figura 35*

Fuente: autor

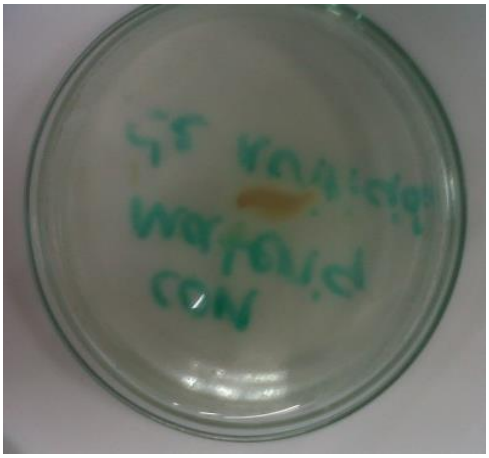
16.2 resultados de ensayo número 2

Nuevamente el cultivo no fue exitoso y se llega a la conclusión de que al subir la temperatura de la muestra de agua con carne y el agar se mató a cualquier agente patógeno o bacteria que estuviese en la carne.



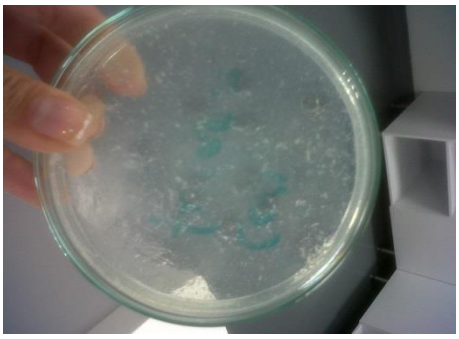
Comparación de los cuatro cultivos *figura 36*

Fuente: autor



Caja de Petri con materia orgánica *figura 37*

Fuente: autor



Cultivo con gotas de Furanona *figura 38*

Fuente: autor

Cultivo con sensidisco *figura 39*

Fuente: autor

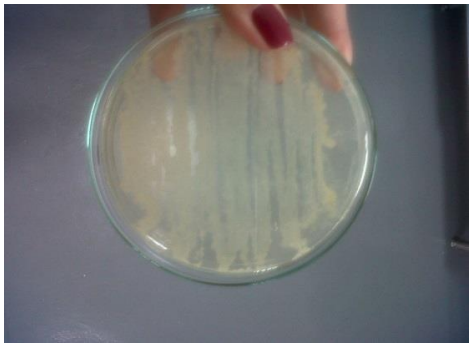
Cultivo solo con el agar *figura 40* Fuente: autor

16.3 Resultados de ensayo número 3:

Se muestran los resultados obtenidos al comparar medios de cultivos y seleccionar el de mejor rendimiento para este estudio.

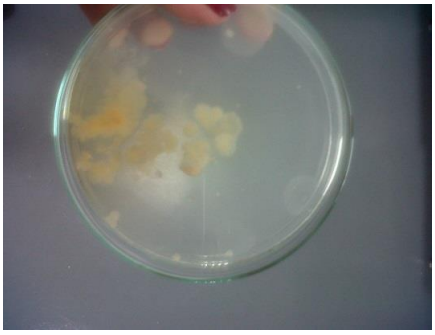
Cultivos en incubadora a 27°C plate count (izquierda) potato dextrosa agar (derecha) *figura 41*

Fuente: autor



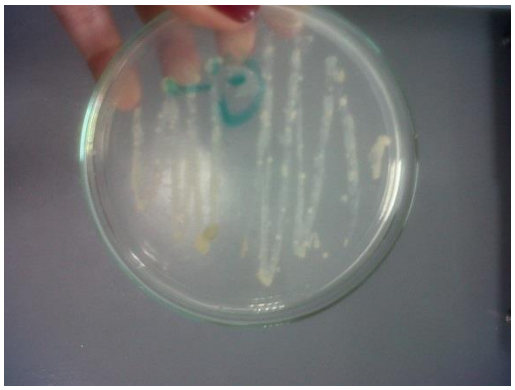
Cultivo plate count, estrias *figura 42*

Fuente: autor



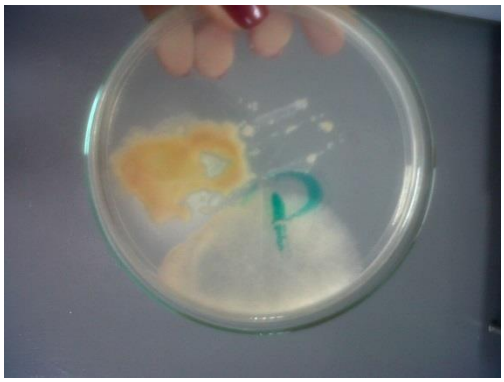
cultivo plate count M.O. *figura 43*

Fuente: autor



Cultivo potato dextrosa agar, estrias *figura 44*

Fuente: autor

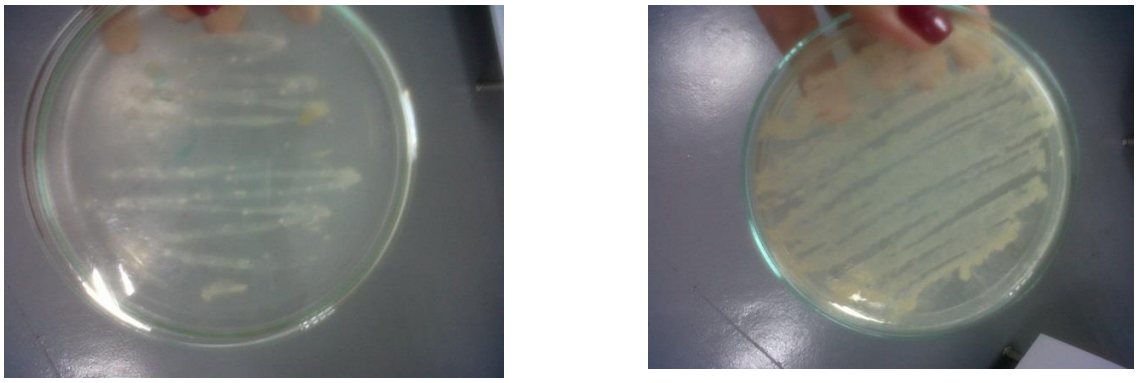


Cultivo potato dextrosa agar M.O. *figura 45*

Fuente: autor

Comparación cultivos con materia orgánica plate count(derecha) potato dextrose agar(izquierda) *figura 46*

Fuente:autor



Comparación de cultivos con líquido de agua y carne de cerdo plate count y potato dextrose *figura 47*

Fuente: autor

Los resultados con potato dextrosa agar:

Con materia orgánica se generó hongo y alrededor de 12 colonias junto a la carne de cerdo, la carne se ve gelatinosa y de un color más blanco.

Con agua- carne de cerdo se forman más o menos 50 colonias en el líquido puesto en el agar.

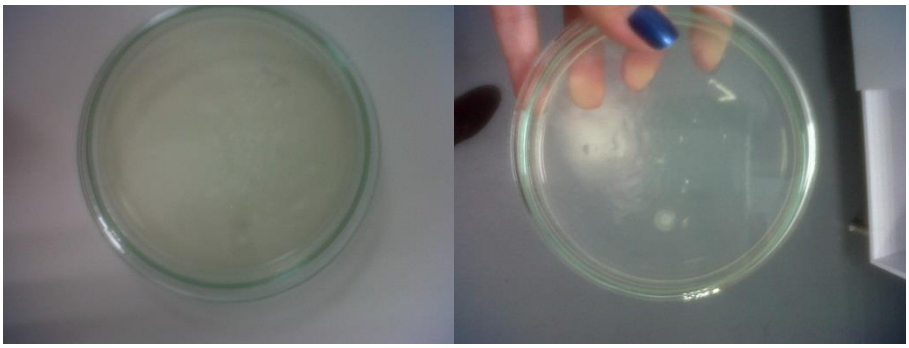
Los resultados con plate count:

Con materia orgánica, se genera colonias grandes y en un radio de hasta de 3 cm a la redonda de la carne de cerdo, 3 colonias lejos de este rango, la carne se ve solida con color blancuzco.

Con agua- carne de cerdo se observa cultivo masificado el agar adquiere un color amarillezco

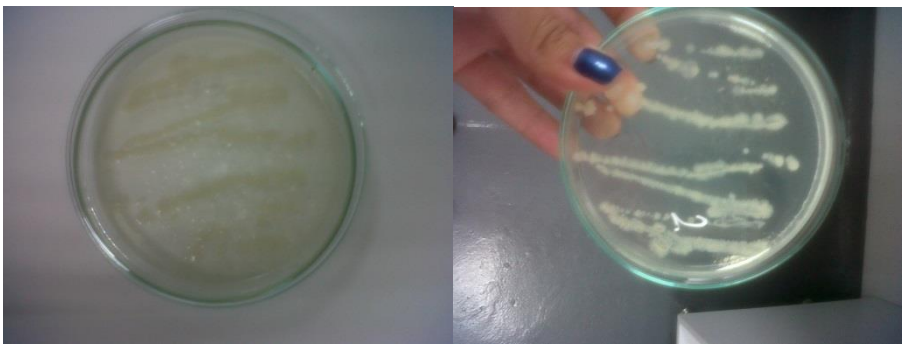
Después de analizo los resultados de estos cultivos y se llega a la conclusión de que el agar plate caunt y el método de dilución son los más óptimos para obtener un cultivo exitoso.

16.4 Resultados ensayo 4:



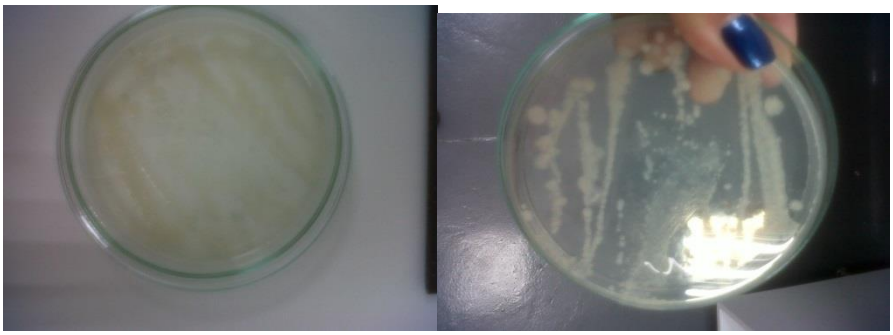
Resultados primera caja de Petri *figura 48*

Fuente: autor



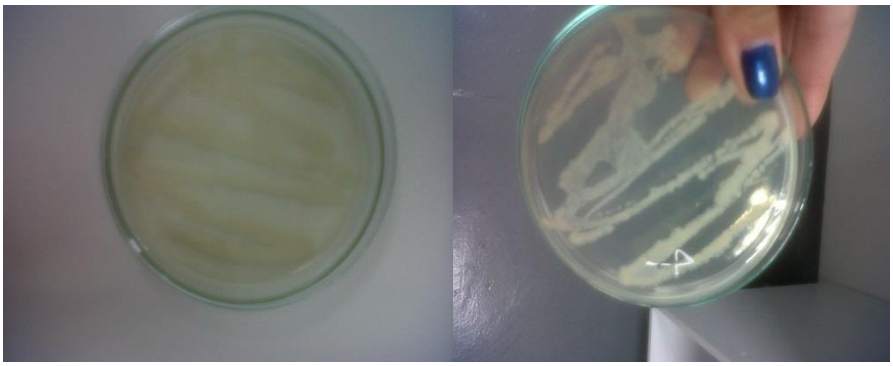
Resultados segunda caja de Petri *figura 49*

Fuente: autor



Resultados tercera caja de Petri *figura 50*

Fuente: autor



Resultados cuarta caja de Petri *figura 51*

Fuente: autor

Caja 3 comparación parte con Furanona y sin Furanona *figura 52*

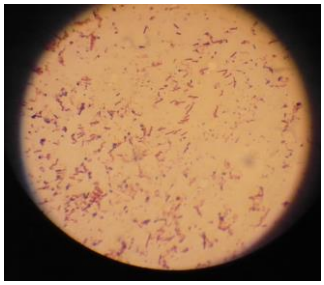
Fuente: autor

Los resultados que arrojaron las evaluaciones, nos muestran una disminución de las bacterias que pueden crecer en el medio de cultivo plate count como son *Escherichia coli, y Staphylococcus epidermis* el estudio estuvo limitado por otros cultivos que proliferaban en el mismo laboratorio y en la misma incubadora.

TINCION DE GRAM

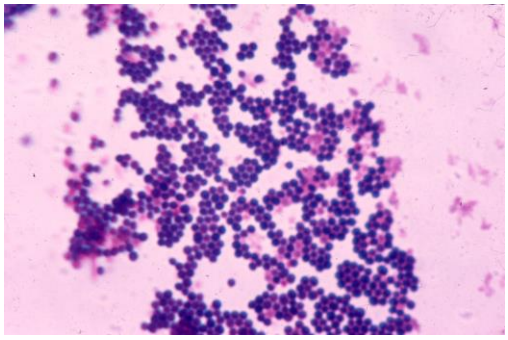
PLATE COUNT

El cultivo seleccionado fue el plate count agar, según las especificaciones de la marca MERCK, las bacteriaS que crecen en este medio de cultivo son *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Lactococcus lactis, Listeria monocytogenes, Lactobacillus acidophilus, Bacillus cereus, y Escherichia coli,* para poder tener una idea de que tipos de bacterias crecieron en las muestras realizadas se realiza una tinción de Gram y se compara con las bacterias mencionadas



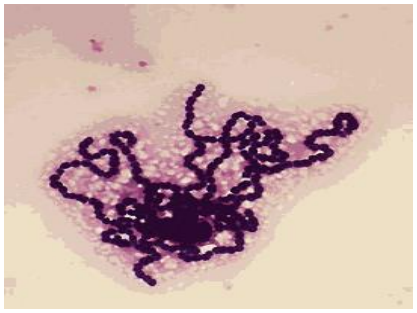
Vista de microscopio a resultado de tinción de Gram de cultivo en agar plate coun y solución tampón de carne de cerdo figura 53

Fuente:autor



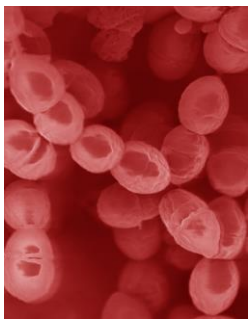
Staphylococcus aureus *figura 54*

Fuente: microbeworld.org



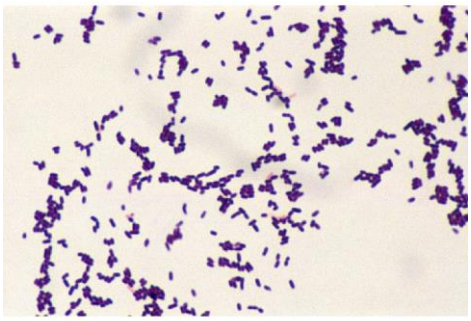
Streptococcus agalactiae *figura 55*

Fuente: microbiologiaudca.webnode.es



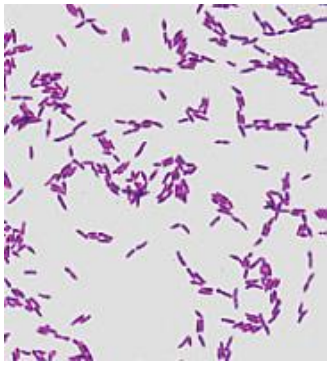
Lactococcus lactis*figura 56*

Fuente: bioinfo.bact.wisc.edu



Listeria monocytogenes figura 57

Fuente: msevans.com

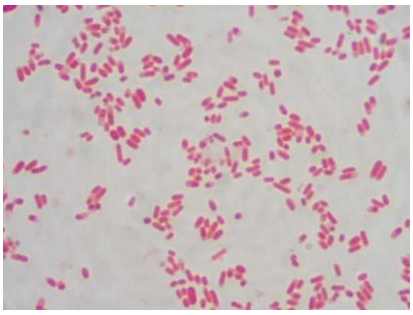


Lactobacillus acidophilus *figura 58*

Fuente: drugline.org

Bacillus cereus *figura 59*

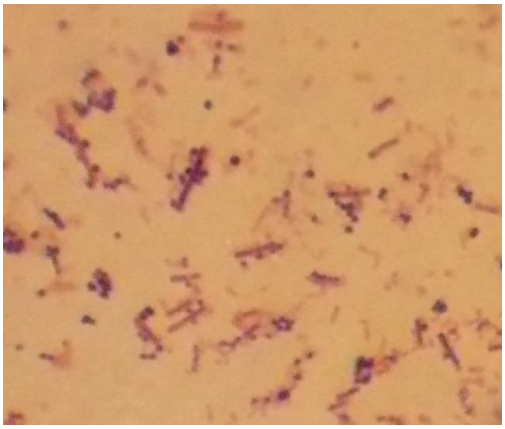
Fuente: textbookofbacteriology.net



Escherichia coli *figura 60*

Fuente: drugline.org

En la tinción de Gram se revela que crecieron bacterias Gram negativas y Gram positivas en forma de cocos las gram positivas las cuales nos indican que pueden ser *Streptococcus agalactiae, Streptococcus agalactiae* y bacilos Gram negativos indicándonos el posible crecimiento de *Escherichia coli y/o Streptococcus agalactiae*



Vista ampliada de las bacterias Gram positivas y Gram negativos de los cultivos realizados *figura 61*

Fuente:autor

17. CONCLUCIONES

Los resultados que arrojaron las evaluaciones, nos muestran cuantitativamente una disminución de las bacterias que pueden crecer en el medio de cultivo plate count como son *Escherichia coli, Staphylococcus epidermis,* con la Furanona 2 (5H), el estudio estuvo limitado por otros cultivos que proliferaban en el mismo laboratorio y en la misma incubadora.

Analizando los estudios realizados con la Furanona 2 (5H) se puede generar la discusión de si tiene o no afectación negativa sobre la salud humana, ya que ha sido utilizada en el control bacterial de instrumentos de odontología y recubriendo prótesis plásticas, dando resultados satisfactorios, pero no se han observado los posibles efectos secundarios a través del paso del tiempo.

Teniendo en cuanta la información de la Furanona 2 (5H) de SIGMA-ALDRICH, nos determina unas advertencias de seguridad como no ingerir no aplicar directamente en la piel, pero nos revela en las especificaciones de la sustancia que no se posee información sobre su toxicidad, irritaciones, sensibilidad respiratoria, resistencia a la degradación, descomposición, o algún otro efecto adverso, pero específica según ADR/RID, IMDG, IATA, que no es peligrosa, y que ningún componente de este producto presenta niveles mayores o igual, a 0,1% que se identifiquen como probable, posible o confirmado cancerígeno por la IARC, al no poseer la información necesaria de muchos aspectos se recomienda investigar más acerca de este producto y sus posibles afectaciones a la salud humana.

Se puede evidenciar de manera cuantiativa una leve disminución de la densidad poblacional bacteriana cuando se utiliza la Furanona 2 (5H) desde una concentración de 0,2 mL en 10 mL de agua

Se evidencia que con el agar plate count proporcionan mejores resultados para realizar cultivos que muestren bacterias relacionadas con carne de cerdo que el potato dextrosa agar ya que este último es utilizado más para población de hongos.

Las carnes utilizadas demostraron que las adquiridas en lugares de sacrificio ilegal, contenías más bacterias y su tiempo de descomposición es más rápida

El costo inicial de implementar Furanona para control bacteriano en las carnes de porcino serian altos ya que no se cuenta con una línea de productos químicos de este tipo en Colombia y la adquisición de estos lleva tiempo y se necesita solicitar permisos de importaciones

17.1 RECOMENDACIONES

Los costos de la 2 (5H) furanona para sintetizar son muy altos en empresas Alemanas, las estadounidenses la venden a precios más accesibles, según cotizaciones realizadas en este estudio.

Para adquirir este tipo de materiales se debe contar con un periodo de tiempo alrededor de 4 meses y permisos de importación para traerlos a Colombia

Todos los experimentos fueron realizados en los laboratorios de la Universidad EAN, la incubadora utilizada para las muestras fue utilizada simultáneamente por otros estudiantes con otros cultivos, esto indica que puede haber un margen de error en el crecimiento poblacional de las bacterias por contaminación cruzada

Para próximos estudios de la disminución bacteriana en carnes de porcino tomar la salmonella como bacteria de estudio con agares como el Salmonella Shigella Agar para poder determinar la efectividad de la Furanona en patógenos

Se recomienda seguir con la investigación ya que este fue un ensayo preliminar en el uso de la Furanona 2(5H) como agente de control bacteriano en las carnes de porcino, ya que no se comprueba su eficacia total, ni las afectaciones a la salud y al medio ambiente que pueda generar la sustancia.

Para no ir en contra de la ley en Colombia se recomendaría la aplicación de la Furanona en instrumentos de sacrificio y de transporte de las carnes de porcino, ya que al aplicarla directamente en la carne tendría complicaciones legales

18. BIBLIOGRAFIA

baveja. (s.f.). Obtenido de http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857912001434#gr1

Baveja. (sptiembre de 2002). *Cooperative Research Center for Eye Research and Thecnology, en Sidney.* Recuperado el 23 de mayo de 2013, de http://www.sciencedirect.com/science/article/

Benyus, J. (s.f.). (E. Punset, Entrevistador)

Benyus, J. (1997). *Biomimesis "el diseño inspirado en la naturaleza.*

bioseguridad. (19 de julio de 2008). Recuperado el 10 de julio de 2013, de bioseguridad: http://seguridadbiologica.blogspot.com/2008/07/hipoclorito-de-sodio-como-agente.html

el espectador. (6 de noviembre de 2008). Recuperado el 14 de junio de 2013, de elespectador.com: http://www.elespectador.com/noticias/bogota/articulo88605-sellados-40-expendios-de-carne-no-cumplir-normas-sanitarias

Enric Marco, j. E. (10 de mayo de 2012). *3tres3*. Recuperado el 15 de junio de 2013, de http://www.3tres3.com/salmonela/salmonella-control-en-la-fase-de-transporte_30930/

Escobet. (10 de Mayo de 2012). *3TRES3*. Recuperado el 15 de junio de 2013, de http://www.3tres3.com/salmonela/salmonella-control-en-la-fase-de-transporte_30930/

FAGRO. (s.f.). Recuperado el 7 de abril de 2013, de FAGRO: http://www.fagro.edu.uy/~alimentos/cursos/carne/Unidad%206/MICROBIOLOGIA.pdf

Garcia, B. M. (s.f.). *Higiene e inspeccion de carne* .

Hwayang-Dong, G. G. (s.f.). Konkuk: departamento de ingenieria ambiental de la Universidad de Konkut.

Kannan Ponnusamy, ,. P. (s.f.). *universidad de Konkuk.* Recuperado el 20 de abril de 3013

Michael B. Batz, S. h. (2011). *University of Florida.* Recuperado el 5 de diciembre de 2012, de .epi.ufl.edu: http://www.epi.ufl.edu/sites/www.epi.ufl.edu/files/RankingTheRisksREPORT.pdf

Ovstrovsky, G. (30 de JUNIO de 2006). Biosignal's Furanone Technology. Recuperado el 31 de julio de 2013, de http://www.medgadget.com/2006/06/biosignal_furan.html

Oxfordjournals. (s.f.). Recuperado el 24 de mayo de 2013, de Oxfordjournals: . http://jac.oxfordjournals.org/content/53/6/1054.full

Pauli, G. (2 de junio de 2010). *Expanción*. Recuperado el 9 de julio de 2013, de http://www.expansion.com/2010/06/01/opinion/1275423225.html

quiminet. (s.f.). Recuperado el 20 de mayo de 2013, de quiminet: http:/www.quiminet.com

Talavera, G. A. (1999). *medigraphic*. Recuperado el 10 de junio de 2013, de medigraphic: http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-1999/bio991g.pdf