





---

*Editores:*

Juan Antonio Ordóñez Pereda

Francisco Jiménez Colmenero

Jacint Arnau Arboix

*Coordinador de la edición*

Lluís Salvà Vila

# Avances en la producción de elaborados cárnicos seguros y saludables



Barcelona  
2013

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley. Diríjase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos, [www.cedro.org](http://www.cedro.org)) si necesita fotocopiar o escanear algún fragmento de esta obra.

Editores:

Juan Antonio Ordóñez Pereda  
Francisco Jiménez Colmenero  
Jacint Arnau Arboix

Coordinador de la edición

Lluís Salvà Vila

Edición cofinanciada por:



© De los autores, 2013

Edita:

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries  
Passeig de Gràcia, 44 - 3er. 08007 Barcelona (Espanya)  
Tel: 934 674 040  
<http://www.irta.cat>

ISBN:

D.L.: B-19207-2013

Maquetación e impresión: El Tinter, SAL (empresa certificada EMAS)

*“A la industria cárnica española”*

## **Comité de Gestión de CARNISENUSA**

### **Coordinador General:**

Juan A. Ordóñez Pereda

### **Vice-coordinador:**

Josep M<sup>a</sup> Monfort Bolívar (2007-2010)

Pedro Roncalés Rabinal (2010-2013)

### **Coordinadores de subproyectos:**

DETRAPAT: Juan J. Córdoba Ramos

FUNCIOCA: Francisco Jiménez Colmenero

NITRARED: Jacint Arnau Arboix

PROCARTE: Lorenzo de la Hoz Perales (2007-2011) (†)

M<sup>a</sup> Isabel Cambero Rodríguez (2011-2013)

### **Coordinador del Programa de Formación:**

Jesús Ventanas Barroso (2007-2011)

Mar Rodríguez Jovita (2011-2013)

### **Gestor del proyecto:**

Lluís Salvà Vila

# Índice

|                |    |
|----------------|----|
| Prefacio ..... | 9  |
| Prologo.....   | 11 |

---

---

## *Capítulo I*

|  |    |
|--|----|
| La industria cárnica española y su fortalecimiento por las investigaciones de CARNISENUSA..... | 13 |
|--|----|

---

---

## *Capítulo II*

|  |    |
|--|----|
| Génesis y actividades del proyecto “Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables” (CARNISENUSA)..... | 19 |
|--|----|

---

---

## *Capítulo III*

|  |    |
|--|----|
| Detección e incidencia de microorganismos patógenos en carne y productos cárnicos..... | 29 |
|--|----|

---

---

## *Capítulo IV*

|  |    |
|--|----|
| Estrategias tecnológicas y beneficios saludables de elaborados cárnicos funcionales..... | 49 |
|--|----|

---

---

## *Capítulo V*

|   |    |
|---|----|
| Implicaciones de la reducción de los niveles de uso de nitratos y nitritos en la seguridad, conservación, características sensoriales y modificaciones tecnológicas de los productos cárnicos crudos-curados..... | 67 |
|---|----|

---

---

## *Capítulo VI*

|   |    |
|---|----|
| Uso de tecnologías emergentes para garantizar la seguridad alimentaria de la carne y sus derivados..... | 81 |
|---|----|

---

---

## *Capítulo VII*

|  |     |
|--|-----|
| Programa de formación. Resultados del máster y del curso internacional ..... | 103 |
|--|-----|

---

---

## *Capítulo VIII*

|  |     |
|--|-----|
| Desarrollo de metodología y estrategias para garantizar la seguridad alimentaria en la industria cárnica ..... | 109 |
|--|-----|

---

*Capítulo IX*

Pósters presentados en las sesiones de 2012 y 2013..... 123

---

*Capítulo X*

Indicadores de calidad y producción en I+D+i de CARNISENUSA..... 185

Apéndice I: Relación de investigadores de CARNISENUSA..... 193

Apéndice II: Relación de publicaciones..... 203

## Prefacio

Transcurría el año 2005, época de bonanza no sólo económica sino también de buenas ideas entre aquellos que tenían la responsabilidad de la gestión de la ciencia de calidad. Por aquel entonces acontecieron dos hechos fundamentales. El primero empezó a fraguarse a partir del verano de 2003, pues se había resuelto la incorporación de grupos de excelencia al primer Centro de Competencia Científico Tecnológico (CECOC) que preveía el Plan Nacional de I+D+i, articulado en red, y que lo fue en el ámbito de los productos transformados de la carne (CECOC-PTC). Y digo que empezó a fraguarse porque fue a partir de ese hecho que los 11 grupos científicos adscritos pertenecientes a 6 centros de investigación y diversos departamentos universitarios, un centro tecnológico y cuatro empresas, por primera vez en la historia reciente iniciaron un interesantísimo proceso de interacción compartiendo enfoques y conocimientos; se había conseguido una masa crítica cercana a 200 investigadores de alto nivel alrededor de un ámbito enfocado al sector más competitivo de la industria alimentaria española y durante un año y medio se configuró una propuesta interna de necesidades de investigación. El segundo acontecimiento decisivo fue la definición y aprobación de los proyectos Consolider Ingenio 2010, cuya primera convocatoria se lanzó en 2005, y que ofrecía financiación para proyectos de larga duración, entre 5 y 6 años, y conformados alrededor de redes o consorcios de investigación.

Ambos hechos permitieron que la práctica totalidad de los grupos públicos y privados adscritos al CECOC-PTC, más algunos otros que se añadieron para cubrir lagunas de la técnica o del conocimiento, definieran, protocolizaran y finalmente presentaran el proyecto CARNISENUSA, acrónimo de CARNe SEgura, NUtritiva y SALudable, en primera instancia a la convocatoria que se cerró en enero de 2006. Al no obtener financiación pese a haber sido evaluado muy positivamente, se volvió a presentar a la siguiente convocatoria con fecha de cierre el 23 de diciembre de 2006 y que finalmente dio lugar al convenio de ejecución con el entonces Ministerio de Educación y Ciencia, el 10 de diciembre de 2007.

El Investigador Coordinador del proyecto fue desde su inicio el Prof. Juan Antonio Ordoñez, a quien debemos la ingente tarea de seguimiento, estímulo y liderazgo imprescindibles para que tan ardua empresa colectiva llegue a buen fin, asistido por los coordinadores de los cuatro subproyectos, los Drs. Isabel Cambero, Francisco Jiménez Colmenero, Jacinto Arnau Arboix y Juan José Córdoba. Pero en nuestro recuerdo siempre estarán presentes dos investigadores que formaron parte del núcleo impulsor desde su concepción y que desgraciadamente ya no están entre nosotros, los Drs. Lorenzo de la Hoz y Nieves López.

CARNISENUSA está llegando a su fin. El 9 de diciembre de 2013 concluirá oficialmente, tras un año de ampliación administrativa. Esto ha permitido la participación de 165 investigadores pertenecientes a 11 grupos de investigación, que hasta el momento ha dado lugar a la publicación de medio centenar de capítulos de libro y cerca de 300 artículos científicos de los cuales el 89% figuran en revistas del primer cuartil de las distintas áreas de publicación establecida por el *Journal Citation Report (JCR)*. Durante su ejecución se han formado en torno a 40 nuevos investigadores, de los cuales casi el 50% ya ha obtenido su título de doctor y el resto lo harán previsiblemente a lo largo de 2013 y el siguiente. Asimismo, el índice h (Hirsch) de los 25 investigadores principales ha aumentado un 50% llegando a una media de 20,9. En definitiva, se ha conseguido un impulso sin precedentes en la generación de conocimiento en un ámbito tan estratégico para nuestra industria alimentaria, que no olvidemos es el primer sector industrial representando más del 18% del PIB.

Complementariamente y de nuevo por primera vez, se ha diseñado, impartido y consolidado el Máster en Ciencia y Tecnología de la Carne, gestionado desde la Universidad de Extremadura y con la participación de un elenco de profesores investigadores españoles en la materia. Al mismo

tiempo se han ampliado los contenidos y la asistencia al Curso Internacional de Tecnología de los Productos Cárnicos, impartido en las instalaciones del IRTA, habiendo aumentado la inscripción al mismo alrededor del 50% en el cuatrienio.

La presencia de los grupos de investigación de las empresas participantes ha aportado un gran valor añadido, el del enfoque hacia la innovación, en definitiva a la valorización en el mercado de los nuevos conocimientos adquiridos. Entre los logros alcanzados cabe citar el de la mejora de la seguridad microbiológica de productos cárnicos listos para el consumo, la reducción de los niveles de nitrificantes en el proceso de curado, la optimización del empleo de tecnologías no térmicas y su combinación con bioconservantes para la higienización de productos listos para el consumo, la introducción en el mercado internacional de nuevos productos cárnicos funcionales, y un largo etcétera.

Pero si hay algo de lo que todos los participantes en el proyecto CARNISENUSA estarán de acuerdo es en las sinergias que se han detectado y se han puesto en valor entre los diferentes grupos participantes, la cooperación interinstitucional que se ha producido, y en muchísimos casos la profunda amistad que se ha generado.

Corresponde a los actuales gestores de la Secretaría de Estado del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) evaluar el conjunto de proyectos Consolider que finalizan, pero si la mayor parte han conseguido obtener los mismos réditos que CARNISENUSA, sin duda habrá que reconocer el enorme acierto de aquellos gestores que en 2004-2005 idearon y diseñaron este instrumento.

Barcelona a 7 de junio de 2013

Josep M<sup>a</sup> Monfort i Bolívar  
*Director General del IRTA*

## Prólogo

El presente libro, titulado “AVANCES EN LA PRODUCCION DE ELABORADOS CARNICOS SEGUROS Y SALUDABLES”, es un resumen de las actividades acometidas en el ámbito del proyecto “PRODUCTOS CARNICOS PARA EL SIGLO XXI: SEGUROS, NUTRITIVOS Y SALUDABLES”, de acrónimo CARNISENUSA, financiado en la convocatoria de 2007 por el entonces Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) dentro del programa CONSOLIDER-INGENIO 2010. El proyecto estaba programado en principio para 5 años pero se solicitó una prórroga de un año, que fue concedida, con el fin de concluir las investigaciones que estaban en curso, discutir resultados pendientes y publicar los artículos en vías de evaluación o en fase de redacción.

Inicialmente, se proyectó la celebración de una reunión plenaria anual con el fin de hacer un seguimiento del proyecto y programar las actividades de la siguiente anualidad, con la participación de los investigadores de CARNISENUSA y los representantes de las industrias y asociaciones cárnicas que apoyan el proyecto. En la fase preparativa (Junio de 2011) de la reunión a celebrar en Septiembre de ese año en Cáceres, merced a la iniciativa y cofinanciación de la Universidad de Extremadura, se presentó una magnífica oportunidad para editar un libro que recogiera las actividades de CARNISENUSA hasta aquel momento. No se desaprovechó la ocasión y el libro se presentó en la reunión de Cáceres distribuyéndose entre los asistentes a la misma y a un buen número de instituciones, departamentos, asociaciones e industrias relacionadas con el sector cárnico. En él, se presentaron los logros obtenidos hasta esa fecha, incluyendo diversas monografías relacionadas estrechamente con las temáticas de los subproyectos, cuyos autores eran investigadores de CARNISENUSA. Entonces, ya se sabía que la obra quedaría inconclusa y, por tanto, sería necesario completarla con la elaboración de un nuevo libro cuando finalizara el proyecto, o estuviera próximo su fin. La presente obra es el resultado de ese reto.

La estructura de este libro se ha realizado en armonía con el editado en Cáceres, el cual lleva el mismo título que el del proyecto de investigación. Sin embargo, éste no es una adenda a esa publicación sino que encierra un contenido que pretende, por una parte, reflejar las actividades globales realizadas en el marco de CARNISENUSA y, por otra, dar explicaciones de la gestión que se ha hecho con los recursos que en su día el MEC puso a disposición de centenar y medio de investigadores. Sin embargo, es lógico que, a veces, se vuelvan a esgrimir los mismos conceptos y se reiteren algunos de los resultados recogidos en el volumen anterior porque el desarrollo de un proyecto de investigación no es una tarea que se vaya completando por módulos sucesivos, sino que es una labor en la que los hallazgos de una fase son las bases que impulsan las investigaciones en las etapas sucesivas. Incluso una vez finalizado el periodo de tiempo programado para el proyecto siempre quedan abiertos nuevos frentes en los que se plantean otras hipótesis que reclaman comprobación. El contenido del libro pues, ilustra, desde el punto de vista de la I+D+i, avances en Ciencia y Tecnología de la Carne y Productos Cárnicos y, desde el administrativo y económico, se ofrece un balance respecto a los compromisos que se adquirieron seis años atrás con el MEC con el fin de comunicar el rendimiento que han proporcionado los fondos suministrados en el contexto de la política científica del estado español.

La obra puede ser de utilidad en primer lugar, y de forma destacada, para los gestores de las industrias cárnicas y las personas adscritas a los departamentos de I+D+i de las mismas. Pueden encontrar en el libro diversos tipos de información. Unos, relativos a los medios tecnológicos que pueden utilizarse para la higienización de productos cárnicos, fundamentalmente los listos para su consumo, con el fin de garantizar la seguridad alimentaria (microbiológica y abiótica); algunos de naturaleza analítica, al ofrecer detalles de nuevos métodos (físicos, químicos o microbiológicos), o modificaciones de los existentes, para el control de la composición y calidad microbiológica o como herramientas de la trazabilidad de los productos; y otros, para acceder a

estrategias que permitan el desarrollo de formulaciones encaminadas a la obtención de productos saludables y funcionales.

Asimismo, el libro proporciona información sobre las aportaciones de las investigaciones realizadas en CARNISENUSA al conocimiento universal en el campo de carne y productos cárnicos, como se deriva de la relación de artículos científicos que figura en el anexo I, de los cuales, una gran mayoría han sido publicados en revistas de prestigio internacional, lo que asegura su difusión a nivel mundial.

Finalmente, se espera que el libro sea de utilidad a los organismos públicos y privados de investigación implicados en el tema, al poder disponer de actualizaciones en varias facetas (tecnológicas, analíticas, nutritivas, sanitarias, etc.) relativas a la carne y productos cárnicos. Y dentro del binomio investigación-docencia, puede decirse también que, a buen seguro, los centros universitarios podrán incluir mucha de la información científica descrita en el libro en los programas de las asignaturas incluidas en las titulaciones que imparten relacionadas con la Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Finalmente, los editores desean expresar su agradecimiento a las entidades que han colaborado de una u otra forma a la subvención del libro. En primer lugar, al MEC por la concesión del proyecto CARNISENUSA (CSD2007-00016), al ANICE-CONFECARNE que ha cofinanciado la edición del libro y al IRTA por su cesión desinteresada de su infraestructura para la confección del libro.

Los editores desean también agradecer a todos los autores de los capítulos incluidos en la publicación que, después de ser revisados por los editores, se trasladaron a los autores correspondientes para su aprobación, de modo que los abajo firmantes asumen los posibles errores editoriales que puedan detectarse.

Monells a 4 de Junio de 2013

*Los editores*

Juan A. Ordóñez Pereda  
Francisco Jiménez Colmenero  
Jacint Arnau Arboix

# CAPITULO I

## La industria cárnica española y su fortalecimiento por las investigaciones de CARNISENUSA

*Generoso García*

*Presidente de la Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España (ANICE) y de la Confederación de Organizaciones Empresariales del Sector Cárnico de España (CONFECARNE)*

### 1. Introducción general

La industria cárnica es el cuarto sector industrial de nuestro país, sólo por detrás de sectores del tamaño de la industria automovilística, la industria del petróleo y combustibles y la producción y distribución de energía eléctrica. Nuestro sector, formado por mataderos, salas de despiece e industrias de elaborados, tiene un tejido industrial constituido básicamente por algo más de 3.000 pequeñas y medianas empresas, repartidas por toda la geografía nacional; de hecho, el 75% de las industrias cárnicas españolas tiene menos de 20 personas ocupadas, según el Instituto Nacional de Empleo (INE). Con esta dimensión, la industria cárnica ocupa con diferencia el primer lugar de toda la industria española de alimentos y bebidas, representando una cifra de negocio de 21.164 millones de euros, más de un 20% de todo el sector alimentario español. Esta cifra supone el 2% del PIB total español (a precios de mercado) y el 14% del PIB de la rama industrial, y el empleo sectorial directo de nuestras empresas, 83.310 trabajadores, representa igualmente más del 23% de la ocupación total de la industria alimentaria española.

Un dato muy relevante, como se verá más adelante, es que la industria cárnica exportó 1,56 millones de toneladas de productos de todo tipo por valor de 4.157 millones de euros a mercados de todo el mundo, con una balanza comercial muy positiva (si en 2010 la tasa de cobertura fue del 229% y en 2011 se elevó hasta un 283%, en 2012 fue del 345%), un dato que muy pocos sectores económicos importantes pueden presentar, y que contribuye a paliar el tradicional déficit comercial de nuestro país.

Esta sucinta radiografía de nuestro sector da idea de la relevancia económica, social, industrial y comercial de la industria cárnica como locomotora de la cadena de valor de la carne, singularmente de la de porcino, y de la importancia estratégica de que nuestras industrias cuenten con el apoyo científico-técnico que representan proyectos tan importantes como CARNISESUSA, que son la base necesaria para, tras la correspondiente transferencia de conocimiento desde los centros tecnológicos y universitarios, poner en el mercado productos cada vez más seguros, saludables y apetecibles.

Por ello, me voy a permitir repasar a continuación los principales datos sectoriales, ceñidos a la carne de cerdo y sus productos, así como introducir al lector en los resultados de las investigaciones de CARNISENUSA y su impacto en la industria cárnica española.

### 2. Producción de carne y elaborados cárnicos

En 2012, la producción española de carne de porcino creció un 1,4% en peso/canal, superando la cifra histórica de 3,5 millones de toneladas por primera vez. Esto supone un crecimiento que, aunque ligeramente inferior a los registrados en 2010 y 2011, confirma la senda en alza de este tipo de carne tras el fuerte traspies experimentado en 2009 (Tabla 1).

El número de animales sacrificados fue de 42,39 millones (un 1,55% superior al año anterior) y el peso medio resultante fue de 82,9 Kg, prácticamente el mismo que en 2011. Hay que reseñar que aproximadamente el 58% de la producción de carne de porcino es para consumo directo y el 42% para consumo industrial.

Tabla 1. Producción española de carne (Tm)

| Años | Especies ganaderas |         |         |         |        | Otras carnes |         |
|------|--------------------|---------|---------|---------|--------|--------------|---------|
|      | Porcino            | Vacuno  | Ovino   | Caprino | Equino | Aves         | Conejos |
| 1990 | 1.788.848          | 513.989 | 217.396 | 16.417  | 7.127  | 836.700      | s.d.    |
| 2000 | 2.912.390          | 631.784 | 232.331 | 18.801  | 6.732  | 986.712      | s.d.    |
| 2001 | 3.020.239          | 642.033 | 236.409 | 15.369  | 8.639  | 1.307.265    | s.d.    |
| 2002 | 3.122.577          | 654.161 | 239.500 | 15.101  | 5.742  | 1.331.700    | s.d.    |
| 2003 | 3.322.385          | 700.065 | 236.548 | 13.861  | 4.963  | 1.339.106    | s.d.    |
| 2004 | 3.076.120          | 713.886 | 231.463 | 13.373  | 5.001  | 1.268.319    | 72.158  |
| 2005 | 3.168.039          | 715.331 | 224.126 | 13.621  | 5.070  | 1.287.422    | 70.524  |
| 2006 | 3.235.241          | 670.408 | 214.179 | 11.690  | 5.275  | 1.260.853    | 72.308  |
| 2007 | 3.439.442          | 643.167 | 196.189 | 10.446  | 5.168  | 1.328.091    | 74.666  |
| 2008 | 3.484.364          | 658.332 | 156.985 | 9.253   | 6.210  | 1.375.295    | 68.686  |
| 2009 | 3.290.566          | 598.425 | 124.424 | 8.831   | 6.366  | 1.316.670    | 61.195  |
| 2010 | 3.389.772          | 589.525 | 125.299 | 9.189   | 6.684  | 1.341.235    | 63.243  |
| 2011 | 3.469.348          | 601.163 | 130.587 | 11.142  | 11.265 | 1.373.604    | 64.139  |
| 2012 | 3.515.445          | 596.898 | 122.801 | 10.289  | 15.661 | 1.382.651    | 63.429  |

Fuente: Elaboración ANICE-CONFECARNE con datos del MAGRAMA.

Tabla 2. Producción española de elaborados cárnicos (Tm)

| Producto                    | 2001             | 2002             | 2003             | 2004             | 2005             | 2006             | 2007             | 2008             | 2009             | 2010             | 2011             |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Jamón y paleta curados      | 204.339          | 234.000          | 245.700          | 249.400          | 251.345          | 265.168          | 270.470          | 271.900          | 245.000          | 251.000          | 255.000          |
| Embutidos curados           | 179.094          | 184.466          | 191.844          | 194.300          | 193.386          | 192.999          | 196.280          | 197.020          | 185.200          | 188.000          | 185.000          |
| Jamón y paleta cocidos      | 150.607          | 158.137          | 169.997          | 172.500          | 174.398          | 178.583          | 183.050          | 183.510          | 175.000          | 174.000          | 175.600          |
| Prod. tratados por el calor | 299.222          | 329.323          | 345.789          | 351.000          | 355.212          | 360.540          | 367.750          | 382.450          | 385.000          | 393.000          | 408.700          |
| Prod. adobados y frescos    | 167.637          | 170.000          | 170.680          | 174.500          | 178.165          | 181.772          | 183.600          | 185.400          | 180.400          | 182.500          | 185.000          |
| Platos preparados           | 59.918           | 63.513           | 66.688           | 78.700           | 71.105           | 73.593           | 77.273           | 84.220           | 80.600           | 82.000           | 83.000           |
| <b>Total elaborados</b>     | <b>1.060.817</b> | <b>1.139.439</b> | <b>1.190.698</b> | <b>1.220.400</b> | <b>1.223.611</b> | <b>1.252.655</b> | <b>1.278.423</b> | <b>1.304.500</b> | <b>1.251.200</b> | <b>1.270.500</b> | <b>1.292.300</b> |

Fuente: ANICE-CONFECARNE.

Como es notorio, en la producción cárnica española destacan los volúmenes de carne de porcino, que representa el 82,5% de las de ungulados producidas en nuestro país, en 2012 (el 61,6% de todas las carnes, si incluimos avicultura y cunicultura). Con ese volumen de producción, España se consolida ya en estos últimos años como cuarto mayor productor mundial de carne de porcino, por detrás de China (que por sí sola produce el 49% de la carne de cerdo

de todo el mundo), EEUU (10% de la producción mundial) y Alemania, y como segundo país europeo, por delante de Francia, Polonia, Dinamarca, Países Bajos y Bélgica.

En cuanto a la producción de elaborados cárnicos (Tabla 2), hay que indicar que España, con 1,3 millones de toneladas anuales, se sitúa en cuarto lugar en la Unión Europea, por detrás de Alemania, Italia y Francia. Por productos, destacan en volumen los fiambres cocidos y en valor los jamones y paletas curados (blancos e ibéricos). Aún con estos altos volúmenes, hay que señalar que la capacidad de producción instalada en las industrias es todavía excedentaria.

### 3. La exportación, un eje estratégico del sector cárnico español

La industria cárnica es el primer sector exportador de la agroalimentaria española, habiendo superado, ya en 2009, al sector del vino en su actividad exterior. Y con los sectores ganaderos tan desarrollados, y como en el caso del sector porcino, líderes a nivel mundial, nuestra producción es claramente excedentaria, y por ello, la exportación es tanto una necesidad como una oportunidad de desarrollo y generación de riqueza.

El sector cárnico español exportó en 2012 un total de 1,46 millones de toneladas de productos frescos (Tabla 3), y 123.000 toneladas de elaborados (Tabla 4), lo que representó unas ventas exteriores de 4.157 millones de euros, un 14% superiores a los 3.644 millones de euros de 2011, que a su vez habían crecido un 17,1% respecto a los 3.112 millones facturados en 2010.

Las exportaciones de carnes de porcino supusieron unas ventas de 2.333 millones y las de despojos 336 millones de euros, mientras que los elaborados vendidos en el exterior facturaron 880 millones de euros, encabezados por jamones curados (238 millones) y embutidos curados (300 millones de euros).

Hay que reseñar como hito, que las exportaciones de carnes de cerdo (congelada y fresca) superaron por primera vez el millón de toneladas, y suponen por sí solas casi el 60% del valor de las exportaciones cárnicas.

Todas las exportaciones de carnes han experimentado avances en sus volúmenes, del mismo modo que los elaborados, con la única excepción de los productos cocidos, que se estancaron un año más.

Las exportaciones de carnes y despojos realizadas por nuestra industria en 2012 representaron el 34,4% de la producción cárnica, pero las de elaborados sólo representan el 9,5% de la producción total, aunque en estos últimos ejercicios este porcentaje ha ido progresando suave pero continuamente.

En todo caso, hay que distinguir el desigual comportamiento de las exportaciones por tipos de producto y por destino. Así, en el periodo 2008-2011 nuestras ventas de carne de porcino a la Unión Europea crecieron un 8%, y a terceros países progresaron un 56%, mientras que en productos elaborados crecieron un 17% a la UE aunque descendieron casi en el mismo porcentaje a países terceros. Este talón de Aquiles tiene que hacer reflexionar sobre la necesidad de impulsar el comercio con estos mercados fundamentales para la industria española pero todavía llenos de trabas para nuestras empresas.

Tabla 3. Exportaciones españolas de carne (Tm)

|                  | Exportaciones  |                |                |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                  | 2004           | 2005           | 2006           | 2007             | 2008             | 2009             | 2010             | 2011             | 2012             |
| Carne de Vacuno  | 140.813        | 147.199        | 121.502        | 107.831          | 139.223          | 102.569          | 115.246          | 121.437          | 128.094          |
| Carne de Porcino | 528.669        | 603.825        | 603.596        | 667.360          | 828.000          | 864.938          | 879.828          | 995.319          | 1.029.067        |
| Carne de ovino   | 20.333         | 19.503         | 25.217         | 25.365           | 20.631           | 18.244           | 27.224           | 28.629           | 31.560           |
| Despojos         | 164.566        | 179.005        | 188.214        | 208.904          | 256.138          | 231.649          | 217.914          | 260.560          | 276.118          |
| <b>TOTAL</b>     | <b>854.381</b> | <b>949.532</b> | <b>938.529</b> | <b>1.009.460</b> | <b>1.243.992</b> | <b>1.217.400</b> | <b>1.240.212</b> | <b>1.405.945</b> | <b>1.464.839</b> |

Fuente: Elaboración ANICE-CONFECARNE con datos de ICEX.

Tabla 4. Exportaciones españolas de elaborados cárnicos (Tm)

|                      | <i>Exportaciones</i> |               |                |                |                |                |                |                |                |
|----------------------|----------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                      | 2004                 | 2005          | 2006           | 2007           | 2008           | 2009           | 2010           | 2011           | 2012           |
| Jamón curado         | 15.158               | 17.707        | 19.903         | 22.813         | 28.131         | 22.282         | 23.147         | 25.151         | 26.807         |
| Embutidos curados    | 18.750               | 20.913        | 22.110         | 26.421         | 28.535         | 27.611         | 29.731         | 33.765         | 38.216         |
| Jamón/paleta cocidos | 4.963                | 6.406         | 6.913          | 6.174          | 5.315          | 5.503          | 5.777          | 6.746          | 6.458          |
| Embutidos cocidos    | 9.588                | 8.800         | 8.816          | 9.353          | 9.074          | 8.670          | 9.173          | 10.673         | 10.215         |
| Otros productos      | 32.548               | 37.265        | 43.822         | 45.928         | 53.130         | 38.668         | 42.884         | 39.736         | 41.285         |
| <b>TOTAL</b>         | <b>81.007</b>        | <b>91.091</b> | <b>101.564</b> | <b>110.689</b> | <b>124.185</b> | <b>102.734</b> | <b>110.712</b> | <b>116.071</b> | <b>122.981</b> |

Fuente: Elaboración ANICE-CONFECARNE con datos de ICEX

Como se puede observar en la tabla 5, las exportaciones de jamones curados (de capa blanca e ibéricos) han seguido una senda ascendente en los últimos años, tanto en volumen como en valor, pero registran un cierto estancamiento en cuanto a su peso relativo respecto al total de productos elaborados que son exportados.

Tabla 5. Exportaciones españolas de jamones curados (incluye blanco e ibérico)

|                          | <i>Miles de euros</i> |                |                |                | <i>Toneladas</i> |                |                |                |
|--------------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|
|                          | 2009                  | 2010           | 2011           | 2012           | 2009             | 2010           | 2011           | 2012           |
| Jamón Curado             | 184.731               | 201.093        | 215.624        | 237.600        | 22.282           | 23.147         | 25.151         | 26.807         |
| % sobre total elaborados | 30,9%                 | 28,3%          | 28,9%          | 27,0%          | 21,7%            | 20,9%          | 21,7%          | 21,8%          |
| <b>TOTAL</b>             | <b>597.108</b>        | <b>710.289</b> | <b>747.177</b> | <b>879.689</b> | <b>102.734</b>   | <b>110.712</b> | <b>116.071</b> | <b>122.981</b> |

Fuente: Elaboración ANICE-CONFECARNE con datos de ICEX

El 82% de lo exportado corresponde a jamones deshuesados en formatos diferentes a la pieza, esencialmente loncheados, tacos, centros, etc., mientras que solo un 17% corresponde a piezas y sólo un 1% corresponde a paletas.

Pese a que se han ido abriendo y desarrollando en los últimos años mercados importantes para nuestros jamones, a día de hoy Alemania sigue siendo nuestro principal cliente (7.240 toneladas), con un 27% de las ventas al exterior, seguido de nuestros dos vecinos, Francia (6.000 toneladas y un 22,3% del total) y Portugal (2.500 toneladas y un 9,2%).

Además, hay que destacar a países como Noruega, Italia y Japón, en compras de piezas, y Bélgica, Italia, México, EEUU o Países Bajos, en lonchas, como los otros mercados de referencia para nuestros jamones.

#### 4. Impacto de las investigaciones de CARNISENUSA en la industria cárnica española

A pesar de la crisis económica, laboral y financiera tan acusada que está atravesando España, el sector cárnico está soportándola mejor que otros y es de esperar que salga de ella fortalecido. Al menos es lo que parecen indicar las estadísticas relativas a la producción de productos cárnicos y, de forma particular, los aumentos tan destacados de la exportación a la Unión Europea y a terceros países. Las cifras que se han ofrecido más arriba sobre la exportación de carne y produc-

tos cárnicos son elocuentes. A modo de ejemplo y resumidamente se puede citar que la exportación total de carne de porcino en el periodo 2008-2012 aumentó un 24,3% y de forma particular la de lomo fresco a los países del Oriente Lejano que sufrió un enorme incremento, ya que en el periodo enero-noviembre de 2010 se exportaron a Japón, Corea del Sur y China 397,75 Tm. En el mismo periodo de 2011 y 2012 pasó a 713,91 Tm y 1.186,75 Tm, respectivamente, es decir, se produjo un aumento de en torno al 66% en 2012 respecto al año anterior y prácticamente se duplicó en estos dos años.

Espectaculares también son los datos de las variaciones en las exportaciones de jamón curado, el producto más emblemático que fabrica la industria cárnica española, ya que en 2004 la exportación total fue de 15.158 Tm y en 2012 el comercio exterior se incrementó en más de un 76% (se exportaron 26.807 Tm) pero resulta aún más impresionante el incremento sufrido por la exportación de jamón deshuesado que en el periodo a que se ha hecho referencia pasó de 11.946 Tm a 21.993 Tm, o sea, que casi se duplicó mientras que el comercio de jamón en piezas se estancó (de 3.144 Tm a 4.512 Tm en ese periodo de 2004 a 2012). Estos datos demuestran la importancia que tiene la fabricación de productos cárnicos en la economía del sector agroalimentario de España y que en relación con el jamón curado, la mejor forma de comercializarlo es deshuesado.

Es, pues, una industria que merece la pena cuidar y auxiliar en el mundo globalizado actual, ya que, por otra parte, no está exento de dificultades y de competencia. La carne fresca es un producto muy perecedero y de gran sensibilidad frente a contaminaciones, por ello es necesario que su elaboración, distribución y almacenamiento se realice guardando las más rigurosas prácticas higiénicas. Aún así, accidentalmente pueden llegar al producto agentes contaminantes de diversa índole, entre los que figuran fundamentalmente microorganismos patógenos procedentes de los manipuladores, entorno industrial o de otras fuentes.

El jamón curado es, en cambio, un producto estable y seguro que tiene un historial sanitario excelente. Sin embargo, la forma comercial más idónea para su exportación es deshuesado, bien en piezas fácilmente manejables o en lonchas como alimento listo para su consumo. Se podían hacer las mismas consideraciones que las que se han mencionado para la carne fresca. Las operaciones que pueden aplicarse para poner estos productos cárnicos en el mercado son diversas, desde las manuales, como el deshuesado y loncheado a mano, hasta las aplicadas con equipos sofisticados en que la intervención del operario es prácticamente nula. No obstante, como antes se mencionaba, aunque se apliquen buenas prácticas de fabricación, hay que asegurar que el producto final esté exento de contaminantes. Conviene tomar medidas pues, para garantizar su seguridad. Lógicamente es un deseo ansiado por todo industrial y al que se aplica toda la tecnología y conocimiento científico-técnico disponible.

El proyecto CARNISENUSA ha acometido investigaciones para alcanzar esta meta. Las regulaciones sanitarias de los países de destino son muy rigurosas y exigentes, sobre todo en relación con ciertos microorganismos. En el citado proyecto se han optimizado métodos para la higienización de productos cárnicos. Se remite al lector a otros capítulos del presente libro donde se informa detalladamente del efecto de las aplicaciones de altas presiones, electrones acelerados, pulsos de luz y el uso de bioconservantes para la higienización de productos cárnicos (fundamentalmente lonchas de jamón listas para su consumo) y también para ampliar la vida útil de lomos frescos.

Unos de estos procedimientos se aplican ya en la industria (altas presiones), algunos están aún en estudio (pulsos de luz) y se ha demostrado en el proyecto la eficacia de otros (electrones acelerados), habiéndose solicitado su autorización para este último al Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. También se ha abordado la posibilidad de utilizar bioconservadores (por ejemplo, bacteriocinas) para el control de patógenos, bien solos o en combinación con otros métodos. Todos estos resultados constan en el presente libro que está a disposición de industriales a través de ANICE-CONFECARNE o dirigiéndose directamente a los coordinadores del proyecto.

Pero en el aspecto que se comenta, es decir, la contaminación con agentes patógenos (microorganismos y toxinas) se han llevado a cabo otras investigaciones que pueden ser de utilidad a la industria cárnica. Están relacionadas con la detección de patógenos por métodos de vanguardia que pueden aplicarse a productos cárnicos, superficies y utillajes de las industrias o el análisis de ciertas micotoxinas que puedan estar presentes en las capas externas de los productos, sobre todo en el jamón curado. Además, se ofrece información de la prevalencia de microorganismos patógenos en los alimentos y en las instalaciones de industrias cárnicas, lo que puede ser muy útil para gestionar el riesgo en las mismas. Los resultados se recogen también en el presente libro.

En otro orden de cosas, puede decirse que la carne y muchos productos cárnicos (por ejemplo, jamón y lomos) son alimentos saludables de gran valor nutritivo; son productos magros, con un relativamente bajo contenido de grasa que vehiculan nutrientes destacables, por ejemplo, hierro y ciertas vitaminas. No obstante, hay otros productos cárnicos que aunque poseen propiedades sensoriales excepcionales (por ejemplo, embutidos, tanto frescos como fermentados/madurados), tienen una calidad nutricional diferente.

Para optimizar estos aspectos nutricionales –en cuanto a grasas y ciertos nutrientes– y en un afán por diversificar los productos cárnicos tradicionales, fundamentalmente emulsiones cárnicas y embutidos, se han hecho estudios en el presente proyecto con el objetivo de elaborar productos más saludables. Para ello, se ha trabajado en diversas vertientes, como adición de antioxidantes o minerales, reducción del valor calórico mediante sustitución de la grasa por otros compuestos alimentarios más adecuados desde el punto de vista nutritivo.

Finalmente, hay una presión por parte de algunos países de la Unión Europea para reducir la cantidad de nitrito que puede añadirse para la elaboración de productos cárnicos. No cabe duda de que es una iniciativa elogiada, dirigida a la salvaguarda de la salud del consumidor. Sin embargo, los nitratos y nitritos desempeñan funciones de muchísima importancia en los productos cárnicos a los que se añaden, siendo la de mayor relevancia la inhibición de *C. botulinum*. Era necesario conocer la respuesta de los productos genuinamente españoles (jamones y embutidos madurados) en el caso de que la UE decida rebajar la tasa máxima permitida de estos aditivos. En el libro se recogen los resultados de los estudios realizados al respecto.

Aparte de las actividades investigadoras incluidas en el proyecto, también se ha contemplado la labor formativa. En los más de cinco años que ha durado el proyecto se han celebrado un máster en productos cárnicos en la Universidad de Extremadura y un curso internacional en el IRTA-Monells, ambos de carácter anual. El resultado ha sido la formación de una serie de licenciados que han podido incorporarse a empresas, organismos oficiales o han ingresado en centros de investigación para lograr el grado de doctor. Iniciativas como éstas merecen elogios. El rendimiento de tales actividades figura también en las páginas del presente libro.

En conclusión, puede decirse que un amplio grupo de investigadores españoles, apoyado por algunas industrias y organizaciones cárnicas, se asociaron hace media docena de años y crearon un consorcio con el fin de estudiar aspectos y problemas relativos a la industria cárnica española. El grupo está compuesto por alrededor de 150 investigadores procedentes de una docena de instituciones (universidades, organismos públicos de investigación y centros tecnológicos) dirigidos por científicos con currículos destacados en el mundo de la carne y productos cárnicos.

Los resultados de sus investigaciones figuran resumidamente en el presente libro, junto a las publicaciones a que han dado lugar y a las que el lector puede dirigirse. Como persona implicada plenamente en las labores de la industria cárnica, deseo agradecer el interés que han mostrado los participantes en el proyecto al preocuparse por la potenciación del subsector cárnico. Seguro que muchas de las técnicas, tecnologías y otras actividades recogidas en la obra serán captadas por las industrias y con la posibilidad de aplicarlas con éxito.

## CAPITULO II

# Génesis y actividades del proyecto “Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables” (CARNISENUSA)

*Juan A. Ordóñez*

*Coordinador General de CARNISENUSA.  
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria (UCM).  
Avenida Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid*

### 1. Génesis de CARNISENUSA

En los últimos lustros, diversos investigadores españoles han hecho un buen número de aportaciones a la Ciencia y Tecnología de la Carne y Productos Cárnicos cuya calidad ha estado avalada por revisores de las revistas de mayor prestigio internacional en el campo. Una ojeada a la base de datos de la *ISI Web of Science* permite deducir que desde 1980, los investigadores españoles han publicado varios centenares de artículos relacionados con la carne y productos cárnicos en revistas incluidas en el *Journal Citation Reports* (JCR) principalmente en el primer tercio del bloque correspondiente, no sólo en el área de *Food Science and Technology* sino también en otras como, por ejemplo, *Applied Chemistry*, *Analytical Chemistry*, *Applied Microbiology*, *Nutrition and Dietetics*, etc. Los temas que se han cultivado han sido diversos. Unos, en aspectos relacionados con actividades enzimáticas del músculo (catepsinas, por ejemplo) o proteasas de diferentes orígenes (vegetal, como la bromelaína o microbiano, como proteinasas fúngicas o bacterianas) para acelerar la maduración de embutidos; algunos, en aspectos de seguridad microbiológica con el objetivo de higienizar los productos cárnicos mediante métodos tanto físicos (altas presiones hidrostáticas, electrones acelerados o pulsos de luz) como biológicos (bioconservadores, como bacteriocinas o lactoferrina); otros, desarrollando métodos analíticos microbiológicos (pruebas rápidas para detectar bacterias alterantes o toxinas fúngicas) o físico-químicos (detección de hidrocarburos como sustancias indicadoras de la aplicación de métodos físicos de conservación o aplicación de espectrofotometrías avanzadas para monitorizar la trazabilidad de productos cárnicos) y también se ha trabajado en aspectos nutricionales (reducción del contenido calórico o aumento de ácidos grasos de la familia n-3 de diversos productos cárnicos o enriquecimiento de los mismos en sustancias en que son deficitarios, como antioxidantes, fibra alimentaria o ciertos minerales) y la formulación de alimentos funcionales para diversificación de la oferta alimentaria. En fin, son numerosas y variadas las facetas en que han trabajado investigadores españoles en el mundo de la carne y productos cárnicos, lo que les ha permitido adquirir un historial científico digno de mencionar.

Los equipos que han desarrollado estos estudios proceden de universidades, instituciones públicas de investigación y centros tecnológicos con el apoyo o cooperación de departamentos de I+D+i de algunas industrias cárnicas. Los investigadores, aunque estaban en contacto y había ciertas sinergias entre sus equipos, realizaban independientemente sus tareas, financiadas mediante subvenciones conseguidas en convocatorias de proyectos competitivos tanto de nivel nacional como internacional y contratos con empresas y administraciones. Puede decirse, en definitiva, que ya adentrados en el presente siglo los equipos poseían una sólida formación y estaban dispuestos, por tanto, a lanzarse a proyectos más ambiciosos. Se presentó una oportunidad cuando a finales de 2005 el entonces denominado Ministerio de Educación y Ciencia

(MEC) concibió el programa Consolider-Ingenio 2010 (BOE 293 de 08/12/2005). Los líderes de unos pocos equipos, con la pretensión de contribuir a resolver problemas que tenían planteados la tecnología de la carne y productos cárnicos y el deseo de cooperar en el impulso de la industria, identificaron las lagunas que se podrían abordar para satisfacer las necesidades de mayor calado con el objetivo último de aportar primicias tecnológicas a la industria cárnica española para situarla en los primeros lugares en una Europa integrada por países muy competitivos.

Ante tal oportunidad, se constituyó un grupo gestor en 2006 compuesto por una decena de investigadores que después de analizar minuciosamente el estado actual de la industria cárnica, la evolución de la misma en la década, los nuevos hábitos alimentarios y las presiones de los consumidores demandando alimentos seguros, saludables y nutritivos, concluyeron que había dos temas que reclamaban una solución si se pretendía que los productos cárnicos fabricados en España fuesen en el futuro competitivos a nivel internacional.

- 1) Necesidad de desarrollar un método para higienizar los productos cárnicos listos para su consumo (productos RTE), debido, por una parte, al creciente incremento del consumo de los mismos y, por otra, a la imposibilidad de aplicar las tecnologías convencionales en estos alimentos con ese fin.
- 2) Estudiar el impacto de la posible reducción a nivel de la Unión Europea de las dosis máximas permitidas en los productos que se someten a nitrificación tanto cocidos como madurados y, de forma particular, cómo afectaría a la seguridad y vida útil de los productos cárnicos genuinamente españoles, como el jamón curado y los embutidos fermentados/madurados.

Adicionalmente, también se contemplaron otras líneas de investigación, de las cuales se eligieron dos, no menos importantes que las anteriores, con la esperanza de que los resultados, una vez transferidos, repercutieran en una potenciación de la producción de productos cárnicos.

- a) Estudiar los niveles de contaminación de productos cárnicos emblemáticos y de las instalaciones de una selección de industrias cárnicas así como el desarrollo de métodos rápidos y modernos que permitieran detectar microorganismos no deseables (alterantes y patógenos) con premura y a bajos niveles o toxinas elaboradas por los mismos, como micotoxinas.
- b) El cuarto frente derivaba de la tendencia actual y necesidad de disponer de productos más ajustados a los requerimientos específicos de amplios sectores de la sociedad, constituyendo, en consecuencia, una excelente oportunidad de diferenciación, diversificación y posicionamiento del sector cárnico en un mercado emergente. En tal sentido, se estimó de interés abordar el “desarrollo productos cárnicos saludables y funcionales”.

Tomando como base estas premisas, el grupo gestor decidió asistir a la primera convocatoria, en 2006, del programa Consolider-Ingenio 2010 para lo que, en primer lugar, fue necesario definir las acciones que había que considerar y decidir los equipos de investigación más idóneos para acometer las investigaciones. Se contactó con diferentes equipos españoles, cuyo resultado fue un colectivo de alrededor de 150 investigadores (desde becarios hasta científicos versados en el tema avalados por sólidos *curricula*) procedente de siete universidades (Barcelona, Complutense de Madrid, Extremadura, León, Navarra, Politécnica de Valencia y Zaragoza), tres instituciones públicas de investigación (Departamento de Tecnología de los Alimentos del INIA, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición ICTAN-CSIC (antes Instituto del Frío) e IRTA) y un centro tecnológico (AINIA). Se solicitó apoyo logístico a diversas empresas cárnicas (El Pozo Alimentación, S.A., Frigoríficos Andaluces de Conservas de Carne –FACSA– Campofrío S.A, Cooperativa Andaluza Ganadera del Valle de los Pedroches –COVAP–) y a dos asociaciones alimentarias (ANICE-CONFECARNE y FIAB) que calurosamente apoyaron la iniciativa. Se elaboró una memoria que se presentó a la convocatoria de 2006 que fue evaluada positivamente por científicos extranjeros especialistas recomendando su financiación pero no se hizo debido a que, según indicó al autor del presente artículo la entonces Directora General con la frase textual “*las prioridades de política científica*” y “*las disponibilidades presupuestarias no permiten atender su*

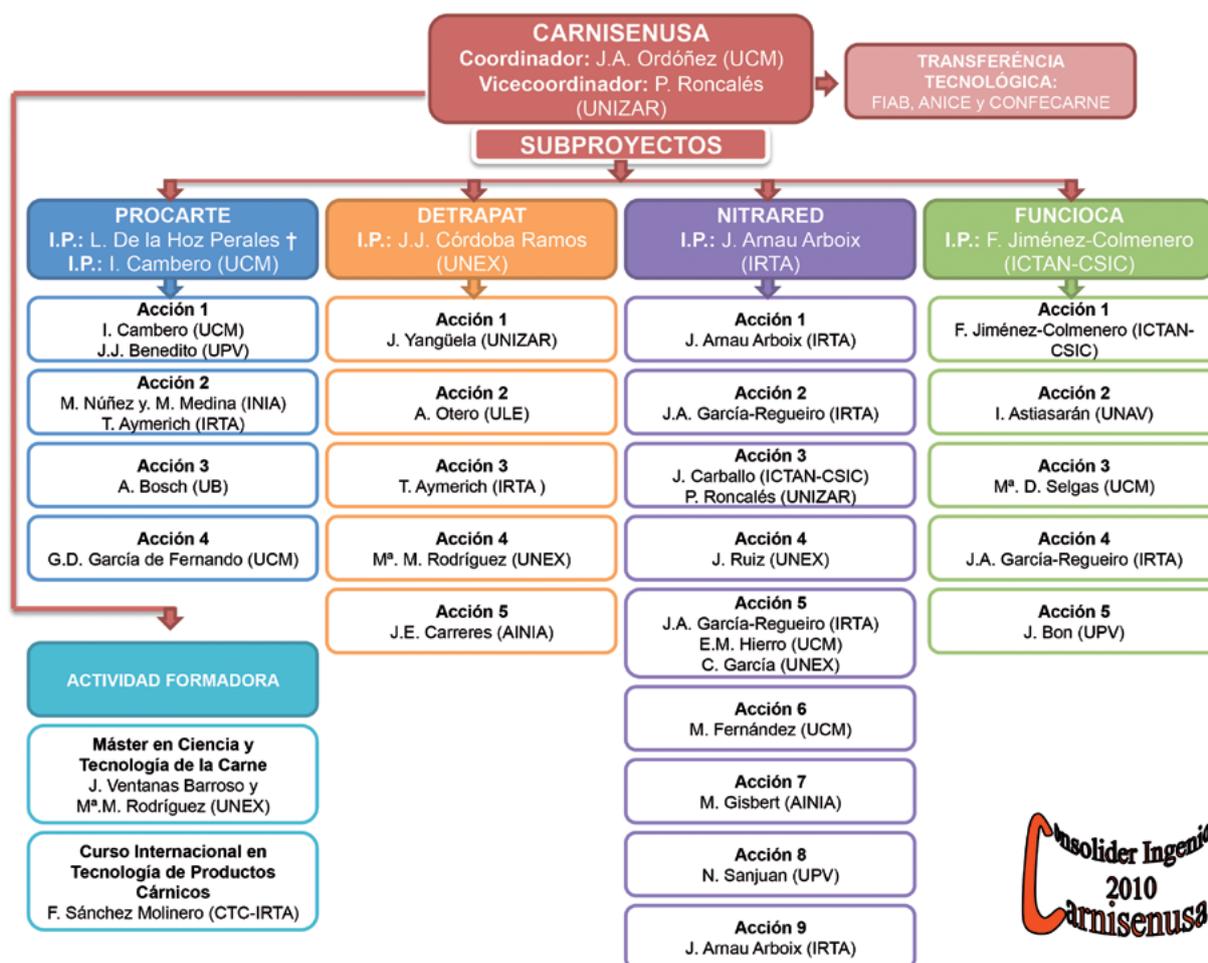


Figura 1. Actividades de CARNISENUSA desglosadas por subproyectos y acciones de los mismos.

solicitud en esta ocasión” aunque el MEC le adjudicó la categoría de A(-), correspondiente a una evaluación “muy positiva” y a “equipos y programas excelentes”. Hasta tal punto se consideró el proyecto como financiable que la Directora General animaba encarecidamente al grupo que volviera a presentar la solicitud de una forma verdaderamente estimulante que queda resumida en la siguiente frase textual: “...tanto su equipo como su Programa de Actividad han sido valorados muy positivamente, por lo que entiendo que, con una probabilidad muy alta, esta misma solicitud –tal vez con pequeñas modificaciones– será financiada en la próxima convocatoria”. Se realizaron las modificaciones que apuntaron los evaluadores, se presentó de nuevo el proyecto en la convocatoria de 2007 y se aprobó para su ejecución en el período 2007-2012. Arrancó con la fecha de concesión (07/06/07), se trabajó durante un lustro y unos meses antes de su fecha de finalización, el 09/12/2012, se solicitó una prórroga para discutir resultados almacenados y redactar los consiguientes artículos, así como finalizar las tesis doctorales comprometidas y rematar otros compromisos aún pendientes. Se concedió la prórroga solicitada hasta el 09/12/2013. Se remite al lector a un artículo publicado previamente (Ordoñez y col., 2011) donde encontrará información adicional sobre otros pormenores de la solicitud del proyecto.

El proyecto financiado quedó estructurado en cuatro subproyectos que corresponden a los temas que se han mencionado anteriormente, el cual se esquematiza en la figura 1. Asimismo, se instituyó un programa de formación en la materia para lo que se incluyó en CARNISENUSA el Máster en Ciencia y Tecnología de la Carne y Productos Cárnicos y el Curso Internacional en Tecnología de Productos Cárnicos que venían impartándose en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura y en el IRTA-Monells, respectivamente. Una información detallada

sobre el contenido de los subproyectos y programa de formación ha sido descrita por Ordoñez y col. (2011) y en los capítulos siguientes (III, DETRAPAT; IV, FUNCIOCA; V, NITRARED; VI, PROCARTE y VII, Master y Curso Internacional), donde se describen los logros conseguidos en cada caso así como en el programa de formación. No se va a detallar aquí las actividades desarrolladas por cada uno de estos subgrupos pero sí puede resultar provechoso un resumen de los resultados obtenidos de mayor relevancia.

## 2. Resumen de las actuaciones más significativas desarrolladas en CARNISENUSA

### 2.1. Consideraciones generales

En relación con el tipo de investigación, las actuaciones realizadas se han encuadrado, de forma general, como sigue: 15% investigación básica (IB), 25% investigación aplicada (IA) y 60% desarrollo (D). Algunos resultados se han patentado (una decena) y muchos pueden ser inmediatamente transferidos a las industrias o, simplemente, una vez conocidos por los departamentos de I+D+i de las mismas, aplicarlos según sus intereses. No obstante, otros, quizás, precisen previamente de un escalado.

### 2.2. Actuaciones más destacadas de los subproyectos

#### 2.2.1. Subproyecto DETRAPAT

Tanto la incidencia como la prevalencia de microorganismos patógenos en alimentos en general y en carne y productos cárnicos en particular, son temas prioritarios en la Unión Europea y en terceros países. Ligado estrechamente a estas peculiaridades de salud pública están los métodos analíticos, alternativos a los tradicionales, de detección de dichos microorganismos en los alimentos. El proyecto DETRAPAT se ha preocupado de ambas facetas y ha llevado a cabo las diferentes acciones que se resumen a continuación:

- Se ha desarrollado un nuevo método de muestreo de superficie (*mini-roller*) cuya eficacia se ha comprobado analizando la incidencia de *Listeria* spp. en una treintena de industrias alimentarias y en más de un centenar de productos cárnicos, de los cuales la mitad eran listos para su consumo (productos RTE). (IA/D).
- Se ha estudiado la incidencia de varias cepas de *Salmonella* spp., *Aeromonas* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* productoras de toxinas shiga y *Campylobacter jejuni* en productos cárnicos (mayoritariamente RTE). Asimismo, se ha investigado la presencia de las bacterias mencionadas en casos clínicos con síndrome diarreico (IA).
- Se han desarrollado métodos PCR-convencional y PCR-en tiempo real para la detección/cuantificación de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus* y *E. coli* O157:H7 y mohos productores de micotoxinas (aflatoxinas, patulina y ocratoxina A) en productos cárnicos (IA/D).
- Tipificación molecular de diferentes cepas de *L. monocytogenes* (IA).
- Se ha estudiado la utilidad de métodos qPCR para la detección de virus mediante ensayos de inoculación de mengovirus en diferentes matrices cárnicas (chopped, salchichón y chorizo) (IA/D).

#### 2.2.2. Subproyecto NITRARED

Desde tiempo inmemorial, se vienen añadiendo nitratos y nitritos a los productos cárnicos. Como se especifica en el capítulo dedicado a NITRARED los efectos beneficiosos son diversos: determinan el color, influyen el sabor y protegen frente a microorganismos no deseables. Sin embargo, debido a la posible formación de nitrosaminas a consecuencia de reacción del nitrito y sus derivados con aminas secundarias, algunos países integrados en la Unión Europea están haciendo una fuerte presión para reducir el nivel de adición de nitratos y nitritos. Preocupa

saber, pues, si se llegara a rebajar la cantidad máxima actualmente permitida, cómo repercutirá en los productos cárnicos y especialmente en los productos españoles genuinos y, en definitiva, en la actividad de las industrias cárnicas españolas. Este subproyecto se ha ocupado de ofrecer datos al respecto. A continuación se expone un resumen de los mismos:

- Se ha mejorado la metodología para determinar y evaluar el color de productos cárnicos (IA).
- La reducción en un 25 o 50% de nitratos/nitritos añadidos a jamón curado es viable dado que no afecta a la formación y estabilidad del color ni a las propiedades sensoriales (IA/D).
- La reducción de nitritos en embutidos es más compleja ya que estos actúan como barrera importante frente al crecimiento de determinados microorganismos no deseables, unos patógenos y otros alterantes. Sin embargo, el flavor y textura no se ven afectados por la reducción de la cantidad de nitratos y nitritos añadidos del 25 y 50% respecto al máximo permitido (IA/D).
- En productos cocidos, la disminución del contenido de nitrito puede afectar al color superficial y a la estabilidad del color (IA/D).
- La formación de Zn-protoporfirina es responsable del color de jamones curados sin nitratos/nitritos añadidos y parcialmente en los jamones de pH<5,6 a los que se les ha añadido nitrito (IB).

### 2.2.3. Subproyecto FUNCIOCA

Las actividades que se han acometido en este subproyecto abordan la producción de elaborados cárnicos saludables y funcionales. Tal planteamiento se ha realizado a dos niveles. Por un lado, a través de la aplicación de estrategias tecnológicas encaminadas a reducir, incrementar, reemplazar o modificar la presencia de diversos compuestos bioactivos, demostrando la viabilidad tecnológica y sensorial de un notable número de productos cárnicos (frescos, cocidos y madurados) reformulados. Por otro, centrado en la obtención de evidencias científicas acerca de los efectos beneficiosos de estos nuevos desarrollos. De forma resumida se exponen los principales aspectos:

- Se han ensayado distintas estrategias de preparación, estabilización, caracterización y medida de actividades específicas de ingredientes/compuestos bioactivos empleados en la reformulación de elaborados cárnicos. Así por ejemplo, se han realizado diversos estudios sobre la estabilización de aceites en emulsiones de aceite-en-agua y de agua-en-aceite-en-agua, así como la evaluación de la actividad antioxidantes de diversos ingredientes funcionales (B).
- Dado que los lípidos se encuentran entre los ingredientes funcionales que mayor atención han recibido por sus implicaciones en la salud, se han reformulado diversos productos reemplazando la grasa animal por otra de origen vegetal o marino, obteniendo productos cárnicos frescos, cocidos y madurados en los que se ha reducido la grasa (ácidos grasos saturados y calorías) y/o se ha incrementado el nivel de ácidos grasos MUFA (oleico) y PUFA (n-3 de cadena incluyendo EPA y DHA) (D).
- Por sus potenciales implicaciones en la salud y limitada ingesta, la incorporación de fibra en alimentos y en particular en productos cárnicos resulta de especial interés. En tal sentido se han añadido a algunos productos cárnicos distintos ingredientes ricos en fibra (algas, fructooligosacáridos, etc.) (D).
- Se han formulado diversos productos modificando la presencia de minerales. Por un lado reduciendo los niveles de sodio y por otro favoreciendo la presencia de otros, como p.e., calcio y selenio (D).
- Se han diseñado productos cárnicos (p.e., hamburguesas y mortadela) enriquecidos en ácido fólico, habiéndose analizado la retención de actividad durante la vida útil (D).
- Diversos compuestos fitoquímicos han sido incorporados en varios productos cárnicos, entre ellos luteína, extractos de *Borago officinalis* L., *Verbena officinalis* L. y *Melissa officinalis* L., etc. (D).

- Como es bien sabido, en el desarrollo de alimentos funcionales resulta esencial la necesidad de demostrar de forma satisfactoria el efecto beneficioso. Para tal fin se han realizado estudios de biodisponibilidad/bioaccesibilidad de compuestos bioactivos (luteína, ácido fólico, calcio y licopeno) incorporados en diversos productos cárnicos mediante estudios *in vitro* estáticos y dinámicos, así como en animales de experimentación (IA).
- Se ha realizado un estudio de intervención en humanos demostrando que la inclusión en la dieta de algunos productos cárnicos reformulados en el marco de este proyecto da lugar a una disminución de la concentración de LDL-colesterol en sujetos con riesgo cardiovascular elevado (AI).

En el capítulo correspondiente a este subproyecto se ofrecen ejemplos de productos cárnicos desarrollados susceptibles de incluir declaraciones nutricionales de acuerdo con el Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de la UE y ejemplos de prestaciones de propiedades saludables avaladas por las declaraciones nutricionales (Reglamento 432/2012).

#### 2.2.4. Subproyecto PROCARTE

Este proyecto se perfiló debido a que los alimentos RTE, de gran aceptación por parte de la población, pueden potencialmente contaminarse con microorganismos patógenos durante su preparación. Como, por otra parte, la salvaguarda de la salud del consumidor es una preocupación prioritaria de la industria alimentaria, es necesario disponer de métodos apropiados para higienizar los alimentos RTE. En este subproyecto se han realizado investigaciones con este fin en distintas matrices cárnicas. Los resultados obtenidos se describen brevemente a continuación:

- La aplicación de electrones acelerados a productos cárnicos RTE es un método muy efectivo para higienizar e incrementar la vida útil sin que se modifiquen significativamente sus propiedades sensoriales. Cabe mencionar que en alimentos de humedad intermedia y, en general los que tienen una  $a_w < 0,92$ , (p.e., jamón curado o embutidos madurados) es suficiente una dosis de 1,5 kGy, (un 85% más baja que la permitida por organismos nacionales e internacionales en los alimentos) para satisfacer las regulaciones de los productos bajo el criterio de “tolerancia cero” (IA/D).
- La fase de latencia y el tiempo de generación de las bacterias (al menos *S. aureus* y *L. monocytogenes*) supervivientes al tratamiento con electrones acelerados aumenta significativamente, lo que se traduce en una mayor seguridad (IB), de tal forma que a las dosis mencionadas anteriormente, la seguridad está garantizada incluso en condiciones de abuso de temperatura (incremento de 2-4 °C sobre los 4-5 °C habituales de los productos refrigerados) durante el almacenamiento (IA).
- La aplicación de electrones acelerados a lomos de cerdo frescos y adobados (estudio llevado a cabo a petición de la industria) permite duplicar su vida útil en refrigeración, lo que es de gran interés comercial para la exportación de estos a puntos de destino lejanos (IA/D).
- Los virus son resistentes al tratamiento con electrones acelerados. Se requieren dosis muy elevadas (alrededor de 15 kGy) para lograr 3-5 reducciones decimales (IB), lo que ha llevado a la conclusión de que esta tecnología no es útil para reducir la presencia de virus hasta niveles convenientes (IA-IB). Está en estudio la respuesta de virus (HAV y MNV) frente a los pulsos de luz, avanzándose que dosis de 20 J/cm<sup>2</sup> inducen 3,44 y 2,94 reducciones logarítmicas en HAV y MNV, respectivamente (IB/IA).
- Las altas presiones es otra tecnología útil para higienizar productos cárnicos RTE, pudiéndose lograr reducciones de patógenos suficientes para cumplir los objetivos de seguridad alimentaria establecidos en las regulaciones. Por ejemplo, en carpaccio RTE, presurizaciones a 450 MPa (5 y 10 minutos) ocasiona reducciones de 3,7 y 5,9 unidades logarítmicas de *S. Enteritidis*.
- Los pulsos de luz permiten la eliminación parcial de patógenos en productos cárnicos RTE. Se pueden tratar productos envasados en plásticos de espesor 40-60 µm. Particularmente, en jamón cocido RTE se logran reducciones del número de *L. monocytogenes* entre 1,1-1,8 D y, al tiempo, se consigue aumentar la vida útil del producto unos 30 días (IA).

- Los bioconservantes (nisina por ejemplo) incrementan la acción letal de las altas presiones. Se ha determinado la viabilidad y eficacia de varios tratamientos combinados (IA/D). Por ejemplo, el efecto listericida en jamón cocido RTE aumentó cuando se combinaron presurizaciones de 600 MPa con enterocinas A y B (IB-IP).
- La lactoferrina y derivados (en particular los amidados) son antimicrobianos con actividad sinérgica con otros agentes como las bacteriocinas. Por ejemplo, la combinación de lactoferrina activada con presurizaciones de 450 MPa redujo el número de patógenos entre 1 y 3 unidades logarítmicas (IB/IA).
- Se ha estudiado el efecto de algunas tecnologías (electrones acelerados y tratamientos térmicos) en la variabilidad y fase de latencia de varios microorganismos.

### *2.3. Líneas adicionales que han surgido durante el desarrollo del proyecto*

- Subproyecto PROCARTE: Estudio estructural de productos cárnicos mediante técnicas espectroscópicas avanzadas y no destructivas (Raman, resonancia magnética nuclear –RMN–, imagen de resonancia magnética –IRM– y resonancia de espín electrón –REE–). Por ejemplo, la RMN de alta resolución ha demostrado ser útil para diferenciar jamón curado obtenido a partir de cerdos con distintos regímenes de alimentación y cría de los mismos. Está en estudio una nueva tecnología basada en la aplicación de fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos para eliminar microorganismos contaminantes.
- Subproyecto DETRAPAT: Estudio de la antibiorresistencia en cepas de *L. monocytogenes* aisladas del ambiente de industrias cárnicas y productos cárnicos. Aplicación del conocimiento adquirido a la detección de virus de interés en la industria cárnica.
- Subproyecto NITRARED: Formación de Zn-protoporfirina en ausencia de nitratos/nitritos.
- Subproyecto FUNCIOCA: Incremento de los componentes bioactivos ensayados, así como de los elaborados cárnicos que ha sido objeto de procesos de reformulación para obtener productos saludables y funcionales.

### *2.4. Programa de formación (Master y Curso Internacional)*

El máster ha sido acreditado por la ANECA, lo que avala su excelencia. El máster proporciona acceso a un doctorado con mención de calidad en "Ciencia de los Alimentos" y coexiste con doble titulación con un master en "Ingeniería Alimentaria" que imparte la Universidad de Beja de Portugal.

La importancia del máster y del curso internacional está estrechamente relacionada con la transferencia de personal formado; en términos generales, el destino de un 40-50% de los alumnos del máster ha sido su incorporación a centros de investigación para realizar el doctorado, un 30-35% están desarrollando su actividad profesional en administraciones públicas y un 20-25% se ha incorporado a industrias cárnicas. La procedencia de la mayoría (más del 80%) de los alumnos del Curso Internacional ha sido de las empresas del sector cárnico y de las de servicio y equipamiento industrial. Por otra parte, de las encuestas realizadas al final del máster y curso internacional trasciende un alto grado de satisfacción por parte de los alumnos tanto en los aspectos docentes como en los de gestión. Asimismo, han supuesto un punto de encuentro idóneo para establecer relaciones profesionales perdurables entre las entidades y empresas de procedencia de alumnos y profesores.

### *2.5. Interacciones entre los diferentes grupos de CARNISENUSA*

Uno de los aspectos más destacados que figuraba en las bases de la convocatoria del Programa Consolider-Ingenio 2010 era la interacción y colaboración entre distintos grupos científicos con el objetivo de potenciar la investigación de vanguardia y obtener el máximo rendimiento posible de los recursos destinados a la investigación científica y técnica. Así, en el preámbulo

de la Resolución 20220/2005 por la que se establece el Programa Consolider-Ingenio 2010, entre otras cosas, se especifica que “El Programa Consolider pretende trascender del ámbito propio de una organización concreta, fomentando que investigadores de distintos centros de I+D trabajen en colaboración. Por todo ello se estructura como un programa abierto, siempre que se trate de equipos de alto nivel y que se comprometan a la evaluación externa de su Programa de actividad investigadora”. Y más adelante, lo dispuesto en el apartado quinto, punto 2 indica que: “Los Programas de actividad investigadora incluirán actividades de I+D que tenderán a potenciar las interfaces activas; facilitarán la colaboración entre investigadores que actúen tanto en el sector público como en el privado, abriendo puentes entre unos y otros; favorecerán tanto la agrupación de investigadores y tecnólogos como de recursos y proyectos, a los efectos de potenciar un marco de excelencia”. Atendiendo a estas disposiciones, se preparó un plan de trabajo para acudir a la convocatoria acorde con lo especificado en esta Resolución, el cual ha ido completándose y acentuándose a media que transcurría el desarrollo del proyecto CARNISENUSA, pudiéndose decir que las sinergias (interacciones, colaboraciones e intercambio de conocimientos) han sido intensas y continuas. En la figura 2 se muestran esquemáticamente.

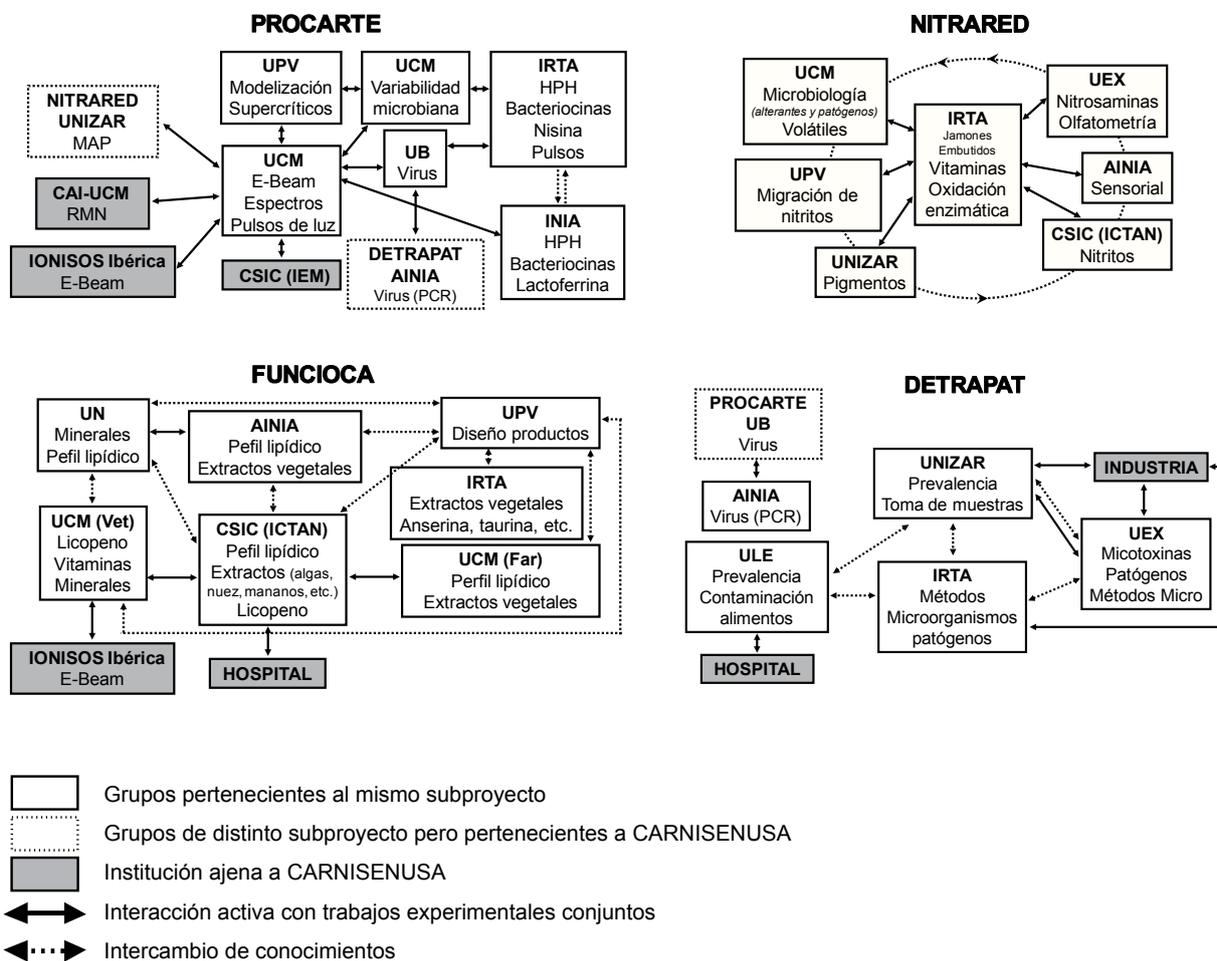


Figura 2. Representación esquemática de las interacciones y colaboraciones entre grupos de investigación de las instituciones que han participado en el proyecto CARNISENUSA.

La actividad científica desarrollada en CARNISENUSA no se ha limitado a investigaciones programadas por los equipos de los subproyectos y en las interacciones entre los mismos sino que también se han mantenido relaciones con equipos extranjeros en varios frentes, las que se han clasificado en cuatro tipos. Entre ellos, el que adquiere más importancia quizás sea el de

estancias superiores a 3 meses de investigadores de CARNISENUSA en centros de investigación extranjeros con el objetivo de profundizar en la formación científica de investigadores jóvenes. No menos importante ha sido la admisión de investigadores extranjeros en centros CARNISENUSA, desde estancias cortas hasta otras de periodos largos (más de 2 años) con la finalidad, estas últimas, de realizar la tesis doctoral. Un tercer grupo son las estancias cortas (menos de tres meses) de investigadores de CARNISENUSA en centros extranjeros con el fin de poner a punto una técnica o aplicar algún método que estaba plenamente desarrollado en el laboratorio de destino. Finalmente, una actividad muy normal en las universidades es la acogida de estudiantes "Erasmus" y de otros países no acogidos a este programa de intercambio, muchos de ellos, aparte de la formación docente, han participado en la parte experimental de algunas líneas e incluso figuran como coautores en los artículos que se publicaron; es una vertiente de menor importancia pero hay que manifestarla porque ha sido una forma más de ensanchar el rendimiento de los fondos del proyecto. En la figura 3 se muestra esquemáticamente las relaciones de CARNISENUSA con centros extranjeros.

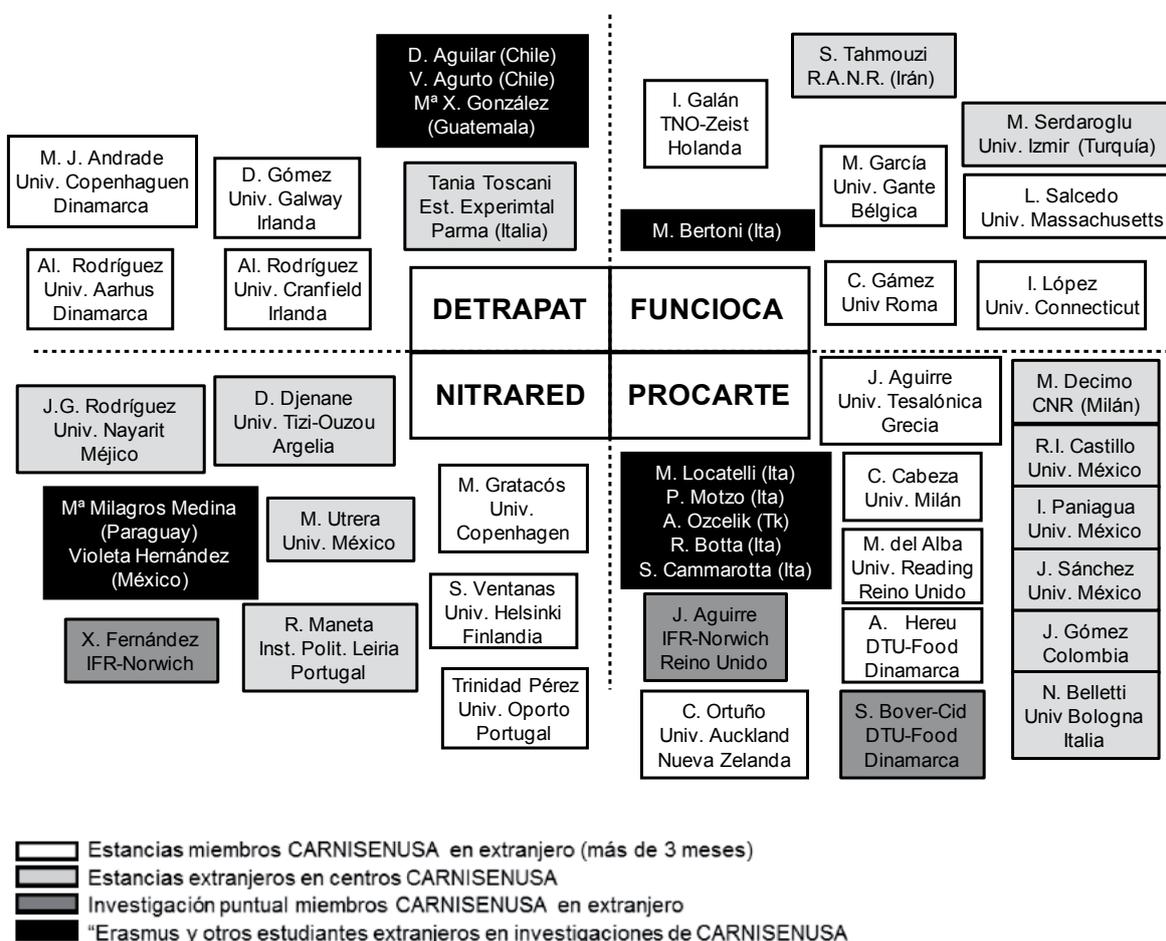


Figura 3. Relaciones de CARNISENUSA con centros de investigación extranjeros.

## 2.6. Otras actividades de CARNISENUSA

En este documento se han recogido resumidamente las actividades de CARNISENUSA en el ámbito científico pero hay otras de otro tipo relacionadas con los compromisos que en su día se firmaron con el MEC. Una vez financiado el proyecto hubo que redactar un Convenio de Ejecución con el objetivo de precisar los compromisos de los beneficiarios, las condiciones

de desarrollo y los parámetros de evaluación y otras premisas de obligado cumplimiento, todas ellas recogidas en las condiciones especificadas en la Resolución publicada en el BOE. A tal fin, el Convenio de Ejecución se firmó el 9 de Diciembre de 2007, por parte del MEC, por el Secretario General de Política Científica y Tecnológica y, por la de CARNISENUSA, por el representante legal de la Entidad Gestora, el IRTA, y el coordinador general del proyecto, el autor del presente escrito. En el convenio se especifican una serie de cláusulas relativas, entre otras, a compromisos del equipo beneficiario, obligaciones y responsabilidades, evaluación, control y seguimiento, programa de financiación y duración del convenio. Son facetas de tipos administrativo, estadístico y económico que no caen dentro del objetivo del presente capítulo. No obstante, la elaboración del presente libro pretende también “rendir cuentas” a la sociedad con el fin de dar a conocer el uso que se ha hecho de los recursos que el Estado Español puso en nuestras manos que, en definitiva, son aportaciones de los ciudadanos españoles. En consecuencia, se recogen en el libro una serie de capítulos donde puede observarse el grado de cumplimiento de los compromisos que los investigadores de CARNISENUSA adquirieron en su día.

### Agradecimientos

Las actividades resumidas en este capítulo se han realizado en el marco de CARNISENUSA agradeciendo al MEC su financiación y también a otros proyectos que han colaborado en las investigaciones, los cuales han quedado reflejados en los capítulos correspondientes a cada uno de los subproyectos.

### Referencia

Ordóñez, J.A., Córdoba, J.J, y Ventanas, J. 2011. Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables. Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones. Cáceres.

## CAPÍTULO III

# Detección e incidencia de microorganismos patógenos en carne y productos cárnicos

---

---

*Juan J. Córdoba*

*Higiene y Seguridad Alimentaria. Facultad de Veterinaria (UEX). Cáceres*

---

---

*Javier Yangüela*

*Higiene, Inspección, Control y Microbiología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria (UNIZAR). Zaragoza*

---

---

*Andrés Otero*

*Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria (ULE). León*

---

---

*Teresa Aymerich*

*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Monells*

---

---

*Alejandro Rodrigo*

*AINIA. Valencia*

---

---

*Mar Rodríguez*

*Higiene y Seguridad Alimentaria. Facultad de Veterinaria (UEX). Cáceres*

### 1. Introducción

El análisis de la incidencia de patógenos en alimentos es uno de los objetivos prioritarios de la Unión Europea en materia de seguridad alimentaria y concretamente en carne y productos cárnicos. Se pretende con ello valorar el riesgo derivado del consumo de este tipo de productos, así como la adopción de criterios microbiológicos, medidas preventivas y correctoras eficaces que eviten la presencia de patógenos en los productos elaborados.

Para poder adoptar medidas preventivas y correctoras en los procesados de carne y productos cárnicos es necesario que previamente la industria disponga de técnicas sensibles capaces de detectar de forma precisa y específica a los microorganismos patógenos. Además deben ser técnicas rápidas que permitan a la industria cárnica agilizar la gestión y la toma de decisiones para evitar la presencia de microorganismos patógenos en los productos elaborados. Entre los métodos de detección de patógenos están los tradicionales de recuento e identificación en medios de cultivo, que requieren tiempo prolongado de análisis y suelen ser muy laboriosos. Como alternativa a los métodos tradicionales están los métodos moleculares basados en ADN. Entre ellos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la detección rápida, sensible y específica de un gran número de muestras (Selma y col., 2008; Nicolaisen y col., 2009). No obstante, su aplicación en carne y productos cárnicos puede ser problemática debido a la complejidad de la matriz cárnica, a la baja concentración en la que suelen encontrarse los microorganismos patógenos, así como a la posible detección de células muertas (Paterson, 2007; Paterson y Lima, 2009; Sant'Ana y col., 2010).

En este trabajo se han desarrollado diferentes métodos de PCR para la detección, enumeración y tipificación de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico y mohos toxigénicos valorando su eficacia/tiempo en relación a los métodos de referencia. Se han evaluado los diferentes protocolos de PCR en tiempo real (qPCR) desarrollados en combinación con diferentes pre-tratamientos para eliminar los inhibidores de la PCR y/o concentrar la muestra, con el objetivo de mejorar el límite de detección de la técnica aplicada, disminuir el tiempo de pre-enriquecimiento, detectar diferencialmente células viables y agilizar la obtención de resultados.

Así mismo mediante la utilización de métodos tradicionales de cultivo y aislamiento en placa y técnicas de PCR se ha evaluado la incidencia de las bacterias patógenas más preocupantes en carne y productos cárnicos. Además se ha considerado la tipificación molecular de diferentes cepas de *L. monocytogenes* aisladas de productos cárnicos mediante técnicas moleculares como factores clave en planes APPCC.

## 2. Incidencia y prevalencia de bacterias patógenas en las industrias cárnicas

Se ha evaluado la incidencia en productos listos para el consumo (ready to eat, RTE) e industrias elaboradoras de bacterias patógenas preocupantes tales como *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* productoras de toxinas shiga y *Campylobacter*.

### 2.1. Incidencia de *Listeria monocytogenes*

Previamente al análisis de la incidencia de *L. monocytogenes* se ha evaluado la eficacia de diferentes métodos en la recuperación de este patógeno de superficies de equipos y utensilios, con el objetivo de seleccionar el más adecuado. Se han evaluado 9 procedimientos de toma de muestras ambientales esponja de celulosa, toalla pre-humedecida, hisopos (de algodón, de alginato y metálico), disco de algodón, gasa de algodón, 5 modelos de mini-rodillos homogeneizados en Stomacher y Vibromatic, bolitas de estropajo de acero inoxidable, placas RODAC (con agar PALCAM y agar ALOA) y sistema Petrifilm (Gómez y col., 2012a; Gómez y col., 2012b).

El mini-rodillo 100% fibra de lana muestra el mayor porcentaje de recuperación de *L. monocytogenes* en las superficies de acero inoxidable, mientras que la esponja de celulosa es el método más eficaz sobre superficies de polietileno de alto peso molecular. Sin embargo, el hisopo muestra una baja y muy variable capacidad de recuperación bacteriana, que puede oscilar entre 25% a 91% de los microorganismos inoculados artificialmente en superficies duras metálicas y de otros materiales, de acuerdo a lo observado por Angelotti y col. (1964).

Las técnicas de muestreo más eficaces (mini-rodillo 100% fibra de lana y esponja de celulosa) se han utilizado para evaluar la incidencia de *L. monocytogenes* en las superficies de industrias cárnicas de las provincias de Zaragoza (5), Teruel (7), Salamanca (6), Cáceres (4), Badajoz (5) y Huelva (5). En cada muestra se realizó, como análisis de rutina, recuento de *L. monocytogenes* e investigación de *Listeria* spp. (Gómez y col., 2012b). Al mismo tiempo que se realizó el muestreo ambiental, se recogieron 87 productos cárnicos RTE en las mismas industrias (15 productos cocidos, 48 crudos curados, 23 madurados con estructura muscular íntegra (MEMI) y 1 producto adobado). Además se adquirieron 42 productos cárnicos en establecimientos de las ciudades de Huesca y Zaragoza (20 productos cocidos, 8 crudos curados y 14 madurados con estructura muscular íntegra). En estos productos se realizó el recuento de *L. monocytogenes*/g (UNE-EN-ISO 11290-2: 2000/A1, 2005) y la investigación de *Listeria* spp./25 g (UNE-EN-ISO 112910-1: 1997/A1, 2005) en cada alimento al día 0 (toma en la industria o compra en establecimientos comerciales) y a mitad y al final del período de duración mínima almacenadas a 4 °C y 10 °C.

En general, en el 24,3% de las muestras de superficies de las industrias cárnicas españolas muestreadas se detectó la presencia de *L. monocytogenes*. Hay que destacar el alto número de resultados positivos en las máquinas embutidoras (29,4%), amasadoras (29,4%) y picadoras (28,6%); así como, en las mesas de acero inoxidable (26,0%) y cintas transportadoras de PVC (17,9%). En las superficies muestreadas con plantilla de 100 cm<sup>2</sup>, se comprueba un rendimiento similar en la recuperación de *L. monocytogenes* con la esponja de celulosa y el mini-rodillo.

En el análisis de los productos cárnicos RTE, se detectó *L. monocytogenes* en el 17,1% de los productos cocidos analizados el día 0, y este resultado se mantuvo constante durante todo el período de duración mínima en las muestras almacenadas a 4 °C, mientras que a 10 °C descendió el número de muestras positivas (Tabla 1). En los productos MEMI, un alto porcentaje de las muestras (37,5% y 24,3%, respectivamente) fueron positivas el día 0, descendiendo el número de positivos a lo largo de su período de duración mínima.

Cuando se analiza el recuento de *L. monocytogenes* en las muestras positivas se observa que el 7,8% de las muestras de productos cárnicos analizados el día inicial (día 0) presentaron recuentos de *L. monocytogenes* inferiores a 100 ufc/g, mientras que el 4,7% de las muestras excedió este límite. Por grupos de productos, en el 8,6% de los producto cocidos analizados el día 0 se detectó *L. monocytogenes*. En los productos crudos curados, el 19,6% de las muestras presentaron recuentos entre 1,0 x 10 ufc/g y 9,1 x 10<sup>2</sup> ufc/g el día 0, disminuyendo drásticamente a lo largo de su período de duración mínima.

Tabla 1. Número de muestras positivas en la investigación de *L. monocytogenes* (Lm)/25 g y en las muestras de productos cárnicos RTE analizadas (Gómez y col., 2012a, 2012b, 2012c)

| Grupo alimento    | Día 0 |         | MPDM <sup>a</sup> |         |      |         | FPDM <sup>b</sup> |         |      |         |
|-------------------|-------|---------|-------------------|---------|------|---------|-------------------|---------|------|---------|
|                   | Nº    | Lm/25 g | 4°C               |         | 10°C |         | 4°C               |         | 10°C |         |
|                   |       |         | Nº                | Lm/25 g | Nº   | Lm/25 g | Nº                | Lm/25 g | Nº   | Lm/25 g |
| Cocidos           | 35    | 6       | 35                | 6       | 35   | 2       | 34                | 5       | 34   | 4       |
| Crudos curados    | 56    | 21      | 54                | 18      | 54   | 9       | 54                | 13      | 54   | 3       |
| MEMI <sup>c</sup> | 37    | 9       | 37                | 1       | 37   | 1       | 37                | 1       | 37   | 1       |
| Adobados          | 1     | 0       | 1                 | 0       | 1    | 0       | 1                 | 1       | 1    | 0       |
|                   |       | 27,9%   |                   | 19,7%   |      | 9,5%    |                   | 15,9%   |      | 6,4%    |

<sup>a</sup> MPDM: mitad del período de duración mínima.

<sup>b</sup> FPDM: final del período de duración mínima.

<sup>c</sup> MEMI: madurados con estructura muscular íntegra.

## 2.2. Tipificación de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de productos cárnicos y ambiente

Se realizó un estudio en 13 empresas españolas de productos cárnicos RTE en las que se aisló *L. monocytogenes*. Se caracterizaron 81 cepas aisladas del día 0, 28 cepas aisladas de equipamiento y 53 cepas aisladas de productos finales a diferentes temperaturas de conservación y tiempos de vida útil. Las cepas fueron caracterizadas a nivel de serotipado clásico y molecular por PCR múltiple, (Doumith y col., 2004), y genotipado mediante protocolos normalizados de MLST (*multilocus locus sequence typing*, www.Pasteur.fr/mlst, Institute Pasteur, Francia) para genes constitutivos y MLVST (Chen y col., 2007) y MLVA (*multi locus variable tandem repeats*) (Sperry y col., 2008).

Los serotipos 1/2a y 1/2c fueron los predominantes. El serotipo 4b (el más asociado a brotes de listeriosis) tuvo una baja incidencia y sólo se aisló en tres empresas (Figura 1). El

genotipado de las cepas mediante MLST fue mucho más discriminante que el serotipado y permitió establecer con fiabilidad diferentes contaminaciones cruzadas entre equipamiento y producto final en varias de las empresas analizadas. El genotipado por MLVA fue también muy discriminante.

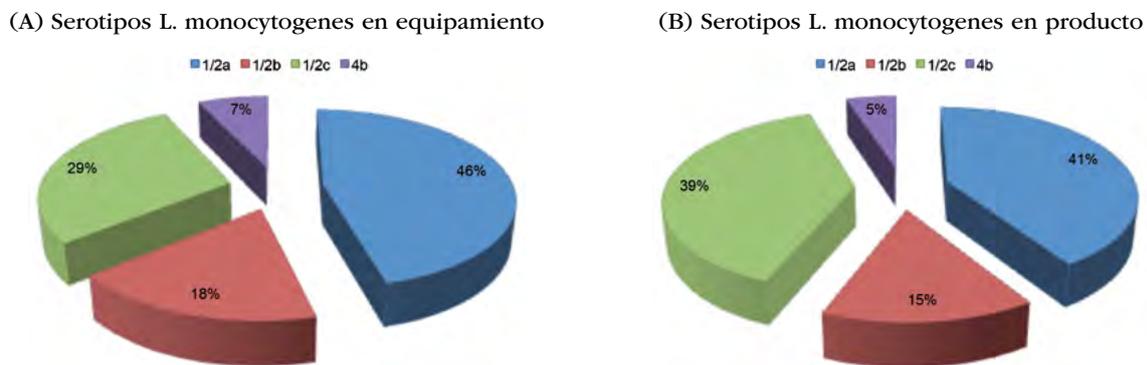


Figura 1. Serotipos de *L. monocytogenes* aislados de diferentes empresas cárnicas españolas productoras de productos cárnicos fermentados y/o curados listos para consumo. A: en equipamiento, B: en producto.

### 2.3. Incidencia y tipificación de *Salmonella*, *Aeromonas*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* productoras de toxinas shiga y *Campylobacter*

Se evaluó la incidencia de cepas patógenas de *Aeromonas* móviles, *Salmonella*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* productoras de toxinas shiga y *Campylobacter*; así como de genes de patogenicidad de estos grupos bacterianos en productos cárnicos (mayoritariamente listos para el consumo), comercializados en una ciudad española (León). Se seleccionaron tres supermercados correspondientes a dos zonas distintas de esta ciudad. En cada uno de ellos se procedió a adquirir, en períodos diferentes (correspondientes a estaciones climatológicas diferentes), siete tipos de productos cárnicos (5 listos para el consumo: jamón cocido, pechuga de pavo cocida, mortadela, chorizo, salchichón; 2 frescos: pechuga de pollo, lomo de cerdo). En los productos indicados se procedió a investigar la presencia de las bacterias antes mencionadas (empleando procedimientos convencionales de enriquecimiento, aislamiento en medio sólido, identificación en base a características morfológicas y bioquímicas, así como a la búsqueda, mediante métodos basados en la PCR, de la presencia, en las cepas sospechosas, de genes asociados a patogenicidad (*aerA*, *blyA*, *alt*, *ast* y *laf* (en *Aeromonas*), *invA* (en *Salmonella*), *fla* (en *Campylobacter*), *yst* (en *Y. enterocolitica*), *stx1* y *stx2* (en *Aeromonas* y *E. coli*)). Adicionalmente, se han recogido y caracterizado cepas de las bacterias arriba indicadas procedentes de casos de gastroenteritis y diarreas prolongadas diagnosticados en el Complejo Hospitalario de León (Servicio de Microbiología). La similitud entre las cepas de diversos orígenes se estableció mediante un procedimiento de electroforesis en campos pulsantes.

Los porcentajes de detección fueron del 1,7, 14, y 14% respectivamente para *Salmonella*, *Aeromonas* y *Campylobacter* (Tabla 2). En *Salmonella* destaca el 4% de muestras positivas encontrado en lomo fresco de cerdo y también en productos madurados como el chorizo. Por lo que respecta a *Aeromonas* hubo hasta un 45% de muestras positivas en carne fresca (pechuga de pollo y lomo fresco de cerdo). Igualmente en un porcentaje muy elevado de muestras de pechuga de pollo (64%) y de lomo fresco de cerdo (32%) se detectó *Campylobacter*.

En ninguna de las muestras de las carnes frescas y de los productos cárnicos analizados se detectó la presencia de *Y. enterocolitica yst+* ni de *E. coli stx1+* ó *stx2+*. La incidencia de estas bacterias sería pues inferior al 0,6% en cada uno de los productos analizados (inferior al 0,08% si se consideran la totalidad de ellos).

Tabla 2. Incidencia de presuntas cepas patógenas de *Salmonella*, *Aeromonas* móviles y *Campylobacter* en carnes frescas y en productos cárnicos listos para el consumo

| Producto                         | <i>Salmonella</i><br>( <i>invA</i> +) | <i>Aeromonas</i><br><i>blyA</i> +/ <i>alt</i> +/ <i>aerA</i> +/ <i>ast</i> +/ <i>laf</i> + <sup>1</sup> | <i>Campylobacter</i><br><i>fla</i> + |
|----------------------------------|---------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Pechuga de pollo                 | 1%                                    | 45%   | 64%                                  |
| Lomo (fresco) de cerdo           | 4%                                    | 45%   | 32%                                  |
| Jamón cocido                     | 1%                                    | <0,6% <sup>2</sup>  | <0,6% <sup>2</sup>                   |
| Pechuga de pavo cocida           | <0,6% <sup>2</sup>                    | 4%  | <0,6% <sup>2</sup>                   |
| Mortadela                        | 2%                                    | 2%  | <0,6% <sup>2</sup>                   |
| Chorizo                          | 4%                                    | 1%  | <0,6% <sup>2</sup>                   |
| Salchichón                       | <0,6% <sup>2</sup>                    | <0,6% <sup>2</sup>  | <0,6% <sup>2</sup>                   |
| Todos los productos cárnicos RTE | 1,4%                                  | 1,7%  | <0,1%                                |
| Todos los productos              | 1,7%                                  | 14%   | 14%                                  |

<sup>1</sup> Poseedoras de alguno de los genes señalados.

<sup>2</sup> No se detectaron bacterias de este tipo en ninguna de las muestras analizadas. La incidencia se considera, por tanto, inferior al 0,6%.

Por otra parte, de un total de 864 casos clínicos (de gastroenteritis y diarreas prolongadas) diagnosticados en el Complejo Hospitalario de León se han aislado 18 cepas de *Salmonella invA*+, 56 de *Aeromonas blyA*+ ó *alt*+ ó *aerA*+ ó *ast*+ ó *laf*+, 46 cepas de *Campylobacter fla*+, 10 cepas de *Y. enterocolitica yst*+ y 16 cepas de *E. coli stx1*+ ó *stx2*+.

La comparación genética mediante electroforesis de gel en campo pulsante (PFGE), entre las cepas patógenas aisladas de carnes y productos cárnicos analizados en este trabajo, las cepas de origen clínico y las de otros orígenes que forman parte de la colección nuestro centro pusieron de manifiesto que:

- 1) Para *Aeromonas*, las cepas de carnes y productos cárnicos eran poco similares (menos de un 50%) a las cepas de origen clínico. Las cepas aisladas de agua en su mayoría eran poco similares a las clínicas y a las procedentes de carnes y productos cárnicos (entre un 50 y un 70% de similitud).
- 2) Para *Salmonella* las cepas aisladas de carnes y productos cárnicos eran poco similares a las clínicas (menos de un 30%). Todas las cepas de origen clínico eran más similares entre sí que lo eran con las aisladas de carnes y productos cárnicos.

### 3. Desarrollo de métodos para la detección de microorganismos patógenos en carne y productos cárnicos

Se han desarrollado métodos de PCR convencional y qPCR para la detección y cuantificación de microorganismos patógenos en carne y productos cárnicos. En estos métodos se incluyen procedimientos eficaces para la obtención del ADN a partir de las matrices cárnicas y evaluación de su aplicabilidad en productos cárnicos.

#### 3.1. Detección de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp.

##### 3.1.1. Tratamientos pre-PCR y límite de detección de la qPCR

En la detección de patógenos como *L. monocytogenes* y *Salmonella* el tratamiento pre-PCR es una de las posibles causas de falsos negativos o disminución de la sensibilidad. Con el objetivo de buscar un tratamiento pre-PCR que eliminen inhibidores procedentes de las matrices

cárnicas se han evaluados distintos protocolos de tratamiento en diferentes homogeneizados cárnicos (jamón cocido, mortadela, jamón curado y fuet). Entre los métodos evaluados están los protocolos PrepMan® Ultra (Applied Biosystems) y los normalizados del sistema BAX® (Dupont, Qualicon) para *Salmonella* y *L. monocytogenes* 24E (Oxoid). También se han evaluado los sistemas de aislamiento y purificación de ADN a partir del homogeneizado mediante el robot QIAcube y el DNeasy® Blood & Tissue Mini Kit de Qiagen, así como la concentración y purificación de la muestra mediante separación inmunomagnética recirculante (PATHATRIX® AUTO, Matrix Bioscience).

En los diferentes productos cárnicos evaluados, el límite de detección (LD) de la qPCR fue, en general, mejor para *Salmonella* que para *L. monocytogenes*. El LD más bajo se obtuvo mediante la combinación de la qPCR con el aislamiento de ADN más purificado (Dneasy® kit y robot extracción automática QIAcube). La lisis rápida con PrepMan®, aun siendo un método sencillo, rápido y económico, no consiguió eliminar todos los inhibidores presentes en la muestra, hecho más evidente en la detección de *L. monocytogenes*, para la cual se utilizó un medio complejo (LEB24). El sistema BAX® presentó un LD alrededor de 4 log ufc/ml para *Salmonella* spp. y superior a 5 log ufc/ml para *L. monocytogenes*. (Tabla 3). La separación inmunomagnética (Pathatrix®) si bien permitió eliminar la mayoría de inhibidores de la PCR, no consiguió concentrar adecuadamente *L. monocytogenes* y *Salmonella*.

Tabla 3. Límites de detección (LD, en log ufc/ml) estimados (según modelos de regresión logística A y B) para *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* dependiendo del tipo de muestra y tratamiento pre-PCR (Martín y col., 2012)

|                     |         | L. monocytogenes LD (log ufc/ml) |              |      | Salmonella LD (log ufc/ml) |              |      |
|---------------------|---------|----------------------------------|--------------|------|----------------------------|--------------|------|
| Pre-PCR Tratamiento | Volumen | Jamón curado                     | Jamón cocido | Fuet | Jamón curado               | Jamón cocido | Fuet |
| <b>Modelo A</b>     |         |                                  |              |      |                            |              |      |
| PrepMan             | 2 ml    | 4,68                             | 4,45         | 4,08 | 4,71                       | 2,84         | 2,31 |
| QIAcube             | 2 ml    | 1,48                             | 1,35         | 1,15 | 1,77                       | 1,28         | 1,17 |
| BAX                 |         | 5,28                             | 5,20         | 5,07 | 4,38                       | 3,75         | 4,38 |
| <b>Modelo B</b>     |         |                                  |              |      |                            |              |      |
| PrepMan             | 2 ml    | 4,89                             | 4,30         | 3,85 | 5,16                       | 2,77         | 2,27 |
|                     | 4 ml    | 4,63                             | 4,07         | 3,39 | 4,69                       | 2,48         | 1,92 |
|                     | 10 ml   | 4,98                             | 4,98         | 3,67 | 4,38                       | 2,29         | 1,69 |
| QIAcube             | 2 ml    | 1,19                             | 1,32         | 1,09 | 1,82                       | 1,14         | 1,13 |
|                     | 4 ml    | 0,89                             | 1,08         | 0,91 | 1,60                       | 0,97         | 0,94 |
|                     | 10 ml   | 1,22                             | 1,14         | 1,00 | 1,45                       | 0,85         | 0,81 |

### 3.1.2. Efecto de los tratamientos pre-PCR específicos para la diferenciación de células viables mediante qPCR

La PCR debe ofrecer la posibilidad de distinguir entre células viables y no viables, especialmente cuando se detectan patógenos en elaborados cárnicos en los que hay un tratamiento térmico (productos cocidos), se ha producido una reducción de la actividad del agua (cru-dos-curados) o ha habido un descenso del pH. Estas modificaciones han podido provocar la inactivación de los microorganismos patógenos que sin embargo siguen siendo detectados en una PCR, y generando de esta forma un resultado poco real. En este trabajo se ha pretendido establecer una metodología que aplicada a la PCR permita diferenciar entre células muertas y vivas de patógenos. Para ello se han evaluado diversas estrategias que puedan aplicarse a la detección por qPCR.

1. Centrifugación mediante gradientes de densidad a diferente osmolaridad y viscosidad (Percoll 10-100%).
2. Aislamiento de ARN (robot QIAcube y el kit Rneasy Bacteria Protect de Qiagen), transcripción reversa (QuantiTect Reverse Transcription Kit de Qiagen), y amplificación del cDNA de genes constitutivos mediante qPCR.
3. Finalmente se evaluó pre-tratamiento de las células mediante los agentes intercalantes, EMA (monoazida de etidio) y PMA (monoazida de propidio) presumiblemente selectivos para células muertas.

Los resultados de la analítica realizada en un ensayo con fuets inoculados artificialmente a altas concentraciones de *L. monocytogenes* ( $10^6$  ufc/g) presurizados o no, constataron que mediante el aislamiento de ADN seguido de la qPCR se detectaban tanto células viables como muertas puesto que, mientras el valor de ciclo umbral (Ct) era prácticamente el mismo en las muestras tratadas o no tratadas por AP, el recuento de viables en placa mostró una reducción de 5 ciclos logarítmicos.

En los ensayos realizados con gradientes de densidad, las condiciones óptimas obtenidas para la diferenciación de células viables y muertas fueron Percoll al 70% y centrifugación 20.000 g (Figura 2). No obstante, se observó interferencia entre las células vivas y muertas, especialmente en los tratamientos en alimentos, lo que compromete su aplicación en matrices cárnicas.

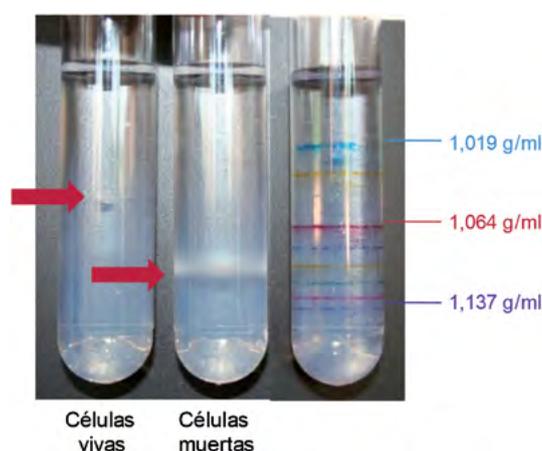


Figura 2. Diferenciación de células vivas y muertas de *L. monocytogenes* mediante centrifugación por gradiente de densidad (Percoll) (Martin y col., 2012).

Los ensayos de expresión génica específica realizadas bajo diferentes tipos de estrés potencialmente presentes en los alimentos permitieron seleccionar cuatro genes domésticos como dianas para su posible aplicación en la detección y cuantificación de *L. monocytogenes*. La eficiencia de la qPCR de estas dianas fue muy buena, tanto cuando se ensayó con diferentes concentraciones de ARN purificado, como cuando se ensayó a partir de la extracción de ARN de diferentes muestras de jamón cocido inoculadas con distintos niveles de *L. monocytogenes* y con un buen límite de detección. No obstante, en aplicación posterior en tratamientos de descontaminación se observaron falsos positivos en las primeras horas tras la muerte celular por persistencia de las moléculas de ARN.

La tercera estrategia, mediante combinación de la qPCR con la tinción y entrada selectiva del fluoróforo PMA en las células muertas, permitió la detección diferencial de células viables tanto en cultivo puro como en mezcla y homogeneizado cárnico en un rango dinámico de entre  $10^2$ - $10^7$  ufc/ml (Figura 3). No obstante, se observó que el EMA no era selectivo y que penetraba tanto en células muertas como vivas, con membrana intacta y afectando a su viabilidad. En los tratamientos térmicos llevados a cabo en homogeneizado de jamón cocido, la concentración de PMA, el

tiempo de fotoactivación y el tamaño del fragmento amplificado se han observado como factores clave para una correcta diferenciación y cuantificación de células viables (Martín y col., 2103).

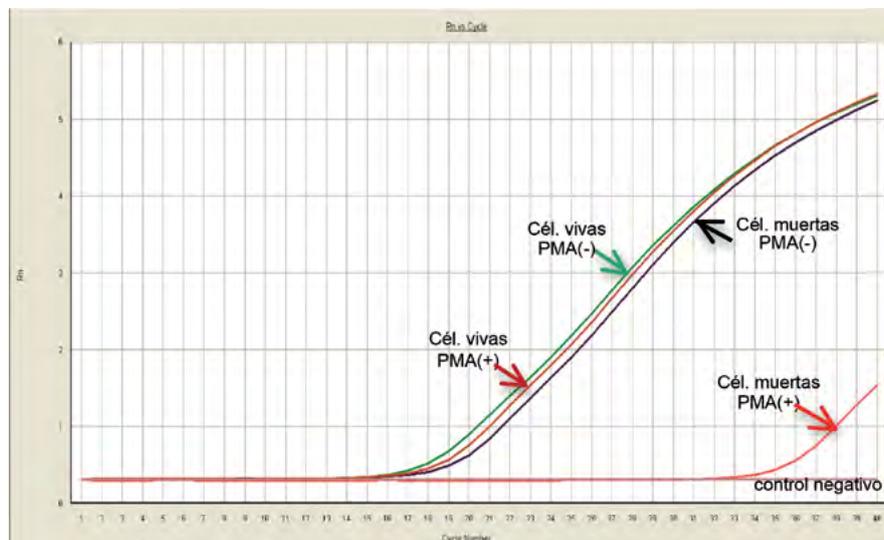


Figura 3. Efecto del PMA sobre la PCR a tiempo real de células de salmonelas vivas e inactivadas mediante tratamiento térmico. Cultivo CECT545 (107 UFC/ml) (Martín y col., 2013).

### 3.1.3. Aplicabilidad de la PCR en los estudios de incidencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en productos cárnicos

Se pretendió evaluar la aplicabilidad del método de PCR con el pre-tratamiento desarrollado en la detección de contaminación por *L. monocytogenes* y *Salmonella* en diferentes fases de elaboración de productos cárnicos. Se evaluaron 10 industrias artesanales de embutidos crudos-curados a lo largo de un período de tres años. Se analizaron 500 cm<sup>2</sup> de las superficies de diferentes tipos de equipamiento, cuchillos y mesas y de 25 g de mezcla cárnica inicial, tripa natural y producto final (fuet). La presencia/ausencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* se determinó después del enriquecimiento de la muestra en el medio de cultivo adecuado durante 24 h/48h a 37°C y mediante técnicas de PCR (Malorny y col., 2003 y d'Agostino y col., 2004) y cultivo en placa.

*L. monocytogenes* fue, como ya ha sido indicado por otros autores (Thévenot y col., 2006), la bacteria más ubicua, dado que se detectó en todas las muestras evaluadas tanto de producto como de equipamiento a excepción de las mezcladoras. La masa inicial del producto presentó el porcentaje más alto de muestras positivas (47,4%), seguida del equipamiento (11,8%), aunque en porcentajes muy variables dependiendo del mismo y los productos finales (15,8%), aunque con recuentos inferiores a 100 ufc/g. El equipamiento con un mayor porcentaje de positivos fue la embutidora, aunque el recuento más elevado se localizó en una picadora con 575 ufc/100 cm<sup>2</sup>. *Salmonella* sólo se detectó en la materia prima, con un 26,3% en la masa y un 21,1% en las tripas (Martín y col., 2011) (Figura 4). En cinco de las 10 fábricas se realizaron diferentes muestreos en un período de 2-3 años. Se observó una variación importante de la presencia de patógenos pero no se pudo establecer ninguna relación entre la estación del año y la localización geográfica.

### 3.1.4. Aplicabilidad de la qPCR en la detección de *L. monocytogenes* artificialmente inoculada en productos cárnicos fermentados y/o curados

Con este estudio se pretendió evaluar la aplicabilidad del método de qPCR con el tratamiento previo de la muestra para la detección de *L. monocytogenes* en productos cárnicos, valorando la capacidad de detección en productos madurados y sometidos a otros tratamientos como altas presiones (AP). Para el desarrollo del trabajo se inocularon artificialmente con *L. monocytogenes* y en un rango entre 10-10<sup>3</sup> ufc/g, diferentes productos cárnicos, masa inicial del fuet y los pro-

ductos finales, chorizo, lomo y jamón curado. Se envasaron al vacío y posteriormente la mitad de las muestras se trataron por AP (600 MPa). Los productos loncheados, objeto de estudios de vida útil segura se conservaron en refrigeración. En las muestras se determinó el recuento de *L. monocytogenes* viable en agar ALOA y la determinación de presencia/ausencia del patógeno se realizó previo enriquecimiento (medio OB y LEB 24h), siembra en placa y detección por qPCR mediante protocolo normalizado, BAX®system (Dupont, Qualicon, [http://www2.dupont.com/Qualicon/en\\_US/products/BAX\\_System/index.htm](http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/products/BAX_System/index.htm)) que incluye lisis celular rápida, extracción de ADN (robot Qiacube) y método de qPCR (Rodríguez-Lázaro y col., 2004).

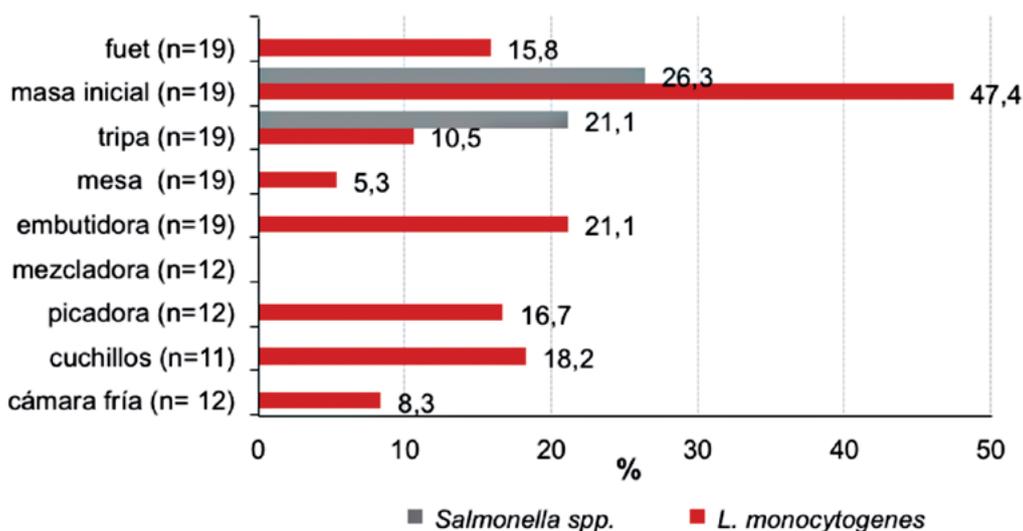


Figura 4. Incidencia de *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes* en industrias artesanales de embutidos (fuet) mediante métodos rápidos de PCR (Martín y col., 2011).

Se observó una capacidad de detección diferencial según el tratamiento pre-PCR aplicado, el protocolo utilizado y el alimento analizado. En lomo curado y fuet, el sistema BAX® System fue capaz de detectar un 82% y un 92%, respectivamente, de las muestras positivas al cabo de 24 h de enriquecimiento y un 100% de las mismas al cabo de 48 h de enriquecimiento en ambos productos. No obstante, en jamón curado sólo fue capaz de detectar el 66,6% a 24h y el 85,2% a 48 h y en chorizo, el porcentaje disminuyó al 26,6% a las 24 h y al 44,4% a las 48 h. Utilizando el método de qPCR desarrollado (aislamiento ADN robot Qiacube + qPCR), el 100% de las muestras fueron concordantes con el método tradicional de detección en medio de cultivo. No obstante e incluso utilizando el medio de enriquecimiento selectivo optimizado, un pequeño porcentaje de las muestras necesitaron 48 h de incubación para obtener un resultado positivo, lo que demuestra la necesidad de utilizar enriquecimiento para una detección sensible mediante qPCR de *L. monocytogenes*.

### 3.2. Detección de *Escherichia coli* O157:H7

*E. coli* O157:H7 es otro de los microorganismos patógenos preocupantes en carne y productos cárnicos. En este trabajo se ha pretendido desarrollar métodos de PCR y de qPCR capaces de detectar de forma rápida y sensible a este patógeno en las matrices cárnicas.

Para evaluar el efecto de la matriz cárnica y la sensibilidad de los métodos de PCR y qPCR, se inocularon por triplicado 10 tipos de productos cárnicos RTE (crudos curados y cocidos) con *E. coli* O157:H7 CECT 4267 a concentraciones desde  $10^6$  a 1 ufc/g y posteriormente, se realizó un enriquecimiento a 37 °C en Caldo Verde Brillante Bilis, tomando muestras a las 0, 2, 4 y 6 h para la extracción del ADN y del ARN, previa concentración de los microorganismos con Dynabeads anti-*E. coli* O157 (Gordillo y col., 2011).

Para el desarrollo y la optimización de los protocolos de PCR y qPCR, se realizó en primer lugar el diseño cebadores utilizando el programa *Primer Express* (Applied Biosystem) para una PCR doble que garantice la especificidad en la detección del microorganismo (Tabla 4). Esta estrategia combinaba dos marcadores específicos del serotipo de *E. coli* O157:H7 que incluye la amplificación de los genes *rfbE* y *fliC<sub>b7</sub>*, que codifican, respectivamente el antígeno somático O157 y el antígeno flagelar H7.

Tabla 4. Secuencias de nucleótidos de los cebadores y sondas utilizadas para los ensayos de PCR y qPCR basados en metodología SYBR Green y TaqMan para la detección de *E. coli* O157:H7 (Gordillo y col., 2011)

| Cebadores / sondas  | Metodología                        | Secuencia de nucleótidos (5'-3')  | Tamaño del producto amplificado | Referencia             |
|---|------------------------------------|---|---------------------------------|------------------------|
| FLICH7-F<br>FLICH7-R  | PCR                                | GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC<br>CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC                                      | 625 pb                          | Gannon y col. (1997)   |
| RFBEO157-F<br>RFBEO157-R<br>RFBEO157-P  | PCR<br>qPCR (TaqMan)               | GGATGACAAATATCTGCGCTGC<br>GGTGATTCCCTTAATTCCTCTCTTTCC<br>[HEX]TACAAGTCCACAAGGAAAG[BHQ1] | 213 pb                          | Gordillo y col. (2011) |
| RGflic <sub>17</sub> -F<br>RGflic <sub>17</sub> -R<br>RGflic <sub>17</sub> -P | qPCR (TaqMan)<br>qPCR (SYBR Green) | GCGCGAAGTTAAACACCACG<br>CGGTGACTTTATCGCCATTCC<br>[FAM]CCGAAAATACCTTGTTAACTACCGA[TAMRA]  | 109 pb                          |                        |
| RGrfbE-F<br>RGrfbE-R  | qPCR (SYBR Green)                  | GAGCCACCCCATTTTCG<br>GTTCTATGTACTAACAGACATTTGCC   | 65 pb                           |                        |

Se optimizaron las concentraciones de los cebadores y las sondas y las condiciones de las reacciones de PCR y de qPCR tal y como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de temperatura y tiempo de las reacciones de PCR y qPCR, basados en metodología SYBR Green y TaqMan, concentraciones de los cebadores y sondas utilizados y valores de las distintas curvas de disociación (T<sub>m</sub>)

| Metodología       | Concentraciones de cebadores y sondas (μM)  | T <sub>m</sub> (°C)        | Condiciones de la reacción  |
|-------------------|---|----------------------------|---|
| PCR               | RFBEO157-F/-R: 0,2<br>FLICH7-F/-R: 0,2  |                            | 95 °C/2,5 min<br>35 ciclos: 94 °C/30 s, 58 °C/1 min, 72 °C/1 min<br>72 °C/1 min                                 |
| qPCR (SYBR Green) | RGrfbE-F/-R: 0,6<br>RGflic <sub>17</sub> -F/-R : 0,1  | 76,5 ± 0,34<br>79,5 ± 0,35 | 95 °C/10 min<br>40 ciclos: 95 °C/15 s, 60 °C/1 min<br>Curva de disociación: 95 °C/15 s, 60 °C/1 min, 95 °C/15 s |
| qPCR (TaqMan)     | RFBEO157-F/-R: 0,6<br>RFBEO157-P: 0,3<br>RGflic <sub>17</sub> -F/-R: 0,1<br>RGflic <sub>17</sub> -P: 0,05 |                            | 95 °C/10 min<br>40 ciclos: 95 °C/15 s, 58 °C/30 s, 60 °C/30 s   |

En la PCR convencional se confirmó la especificidad del método por la visualización en los geles de agarosa de los dos productos amplificados de 625 pb y 213 pb sólo en las cepas de *E. coli* O157:H7. Con el análisis de las curvas de disociación en las reacciones de qPCR con tecnología SYBR Green se confirmó la amplificación de los 2 productos esperados sólo en las mismas cepas. Se obtuvieron resultados idénticos mediante la metodología TaqMan. Los límites de detección de los protocolos de PCR y qPCR diseñados, estuvieron en torno a 1 ufc/g con ADN y ARN (microorganismos viables) extraídos a partir de matrices cárnicas inoculadas (Tabla 6). Los métodos de qPCR diseñados fueron más sensibles que la PCR convencional, ya que se conseguía

esta sensibilidad con solo 4 h de enriquecimiento en lugar de las 6 h necesarias en el protocolo de PCR convencional.

Tabla 6. Límites de detección del ensayo de qPCR con la tecnología TaqMan con *E. coli* O157:H7 CECT 4267 inoculado en diferentes productos cárnicos antes y después de 2 y 4 h de enriquecimiento a 37 °C. Los datos están expresados en ufc/g (Gordillo y col., 2013)

| Producto cárnico | 0 h                          |                              | 2 h                          |                              | 4 h        |      |
|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------|------|
|                  | ADN                          | ADNc                         | ADN                          | ADNc                         | ADN        | ADNc |
| Jamón curado     | $(3,5 \pm 0,67) \times 10^2$ | $(3,1 \pm 0,81) \times 10^1$ | $(3,5 \pm 0,67) \times 10^0$ | $(3,1 \pm 0,81) \times 10^0$ | < 1        | < 1  |
| Lomo curado      | $(3,1 \pm 1,06) \times 10^1$ | $(4,2 \pm 2,04) \times 10^0$ | $(3,2 \pm 1,06) \times 10^0$ | < 1                          | < 1        | < 1  |
| Salami           | $(3,1 \pm 1,83) \times 10^2$ | $(3,9 \pm 1,77) \times 10^1$ | $(3,1 \pm 1,83) \times 10^1$ | $(3,9 \pm 1,77) \times 10^0$ | 1,1 ± 1,83 | < 1  |
| Salchichón       | $(3,5 \pm 0,74) \times 10^2$ | $(3,3 \pm 0,83) \times 10^0$ | $(3,5 \pm 0,74) \times 10^1$ | < 1                          | < 1        | < 1  |
| Chorizo          | $(2,6 \pm 0,68) \times 10^2$ | $(4,8 \pm 2,1) \times 10^0$  | $(2,6 \pm 0,68) \times 10^1$ | < 1                          | < 1        | < 1  |
| Pechuga de pavo  | $(4,1 \pm 1,54) \times 10^1$ | $(5,1 \pm 2,78) \times 10^0$ | $(4,1 \pm 1,54) \times 10^0$ | < 1                          | < 1        | < 1  |
| Jamón cocido     | $(3,1 \pm 1,45) \times 10^1$ | $(4,2 \pm 2,56) \times 10^0$ | $(3,1 \pm 1,45) \times 10^0$ | < 1                          | < 1        | < 1  |
| Chopped          | $(3,9 \pm 1,17) \times 10^2$ | $(5,3 \pm 2,78) \times 10^1$ | $(3,9 \pm 1,17) \times 10^1$ | $(5,3 \pm 2,78) \times 10^0$ | < 1        | < 1  |
| Mortadela        | $(4,1 \pm 1,38) \times 10^1$ | $(8,2 \pm 2,76) \times 10^0$ | $(4,1 \pm 1,38) \times 10^0$ | < 1                          | < 1        | < 1  |

### 3.3. Detección de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico

El objetivo de este trabajo ha sido diseñar un método de qPCR para la cuantificación en productos cárnicos de *S. aureus* productores de enterotoxinas. Para ello se han diseñado cebadores que permiten la amplificación de los genes que codifican las más de 20 toxinas estafilocócicas descritas hasta el momento.

Se utilizaron cebadores descritos en la bibliografía (Sharma y col., 2000), aunque para poder detectar todas las enterotoxinas hubo que diseñar cebadores específicos, para ello se alinearon todas las secuencias de los genes que codifican cada toxina estafilocócica y mediante el programa OligoAnalyzer 3.1 se diseñaron varios cebadores reversos degenerados debido a la escasez de zonas conservadas entre estas secuencias

Se optimizó un protocolo de PCR y se evaluó la especificidad del método utilizando 10 cepas de *S. aureus*, 38 cepas de otras especies del género *Staphylococcus* y 8 cepas de otros géneros microbianos, productoras y no productoras de todas las enterotoxinas. La sensibilidad del método se determinó realizando diluciones decimales de cepas enterotoxigénicas y la posterior extracción del ADN de cada una de ellas. Con el protocolo de qPCR optimizado se obtuvo un único producto de amplificación con un tamaño aproximado de  $161 \pm 4$  pb y que por tanto presentaba dos valores de temperatura de fusión (Tm) debido a las diferencias encontradas entre los fragmentos amplificados de cada enterotoxina (Figura 5).

Para evaluar el efecto de la matriz cárnica y la sensibilidad del método de qPCR, se inocularon por triplicado 6 tipos de productos cárnicos RTE (crudos curados y cocidos) con *S. aureus* a concentraciones desde  $10^6$  a 1 ufc/g y posteriormente, se realizó un enriquecimiento a 30 °C en Caldo Manitol Sal tomando muestras a las 4, 6 y 8 h para la extracción del ADN, que se realizó utilizando el kit “Epicentre MasterPure DNA™” previo tratamiento con lisostafina.

Se optimizaron las concentraciones de los cebadores y las sondas y las condiciones de la qPCR tal y como se muestra en la tabla 7. Con el análisis de las curvas de disociación en las reacciones de qPCR con tecnología SYBR Green se confirmó la amplificación del producto esperado en las mismas cepas. Este producto no se detectó en ninguna de las demás cepas utilizadas, demostrándose así la especificidad de los protocolos de qPCR diseñados.

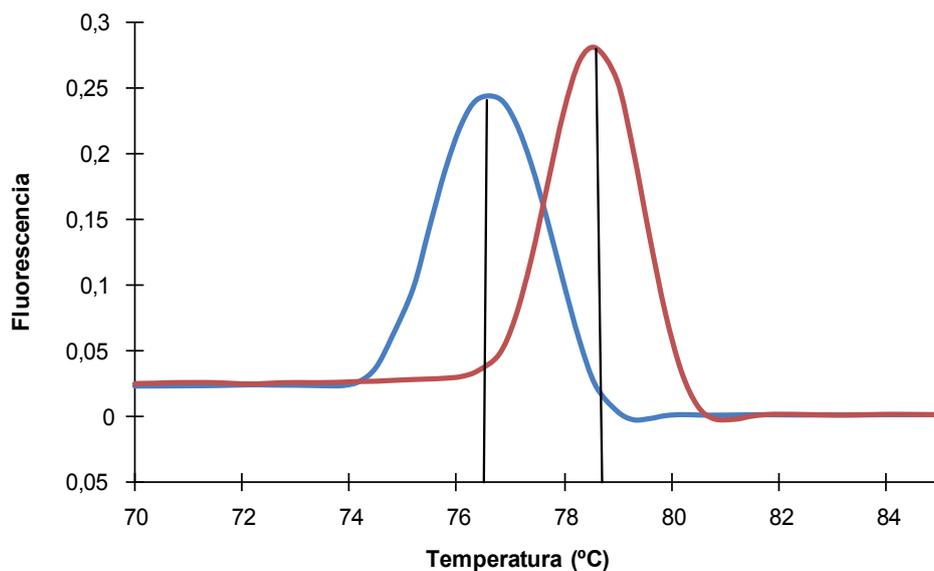


Figura 5. Curva de disociación del producto amplificado con los valores de  $T_m$  obtenidos con las cepas de estafilococos productores de diferentes enterotoxinas.

Tabla 7. Condiciones de temperatura y tiempo de las reacciones de qPCR, basados en metodología SYBR Green y concentraciones de los cebadores

| Concentraciones de cebadores ( $\mu\text{M}$ ) | $T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) | Condiciones de la reacción   |
|--|------------------------------|--|
| SaU: 0,2<br>Sa3-r: 1,5                         | 76,8 y 78,6                  | 95 $^{\circ}\text{C}$ /8 min<br>50 ciclos: 95 $^{\circ}\text{C}$ /10 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ /10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ /25 s<br>Curva de disociación: 95 $^{\circ}\text{C}$ /15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ /1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ /15 s |

Los límites de detección de los protocolos de qPCR diseñados, estuvieron entre 1-40 ufc/g en ADN extraído a partir de matrices cárnicas inoculadas artificialmente (Tabla 8).

Tabla 8. Límite de detección de la qPCR en diferentes productos cárnicos inoculados con *S. aureus* después de 4, 6 y 8 h de enriquecimiento a 30  $^{\circ}\text{C}$ . Los datos están expresados en ufc/g

| Producto cárnico | 4 h                           | 6 h                           | 8 h                           |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Jamón curado     | $(4,1 \pm 4,24) \times 10^4$  | $(4,1 \pm 4,24) \times 10^2$  | $4,1 \times 10^{11} \pm 4,24$ |
| Lomo curado      | $(3,45 \pm 1,91) \times 10^2$ | $(3,45 \pm 1,91) \times 10^1$ | $3,45 \pm 1,91$               |
| Salchichón       | $(2,6 \pm 1,27) \times 10^2$  | $(2,6 \pm 1,27) \times 10^1$  | $2,6 \pm 1,27$                |
| Chorizo          | $(2,21 \pm 2,21) \times 10^2$ | $(2,21 \pm 2,21) \times 10^1$ | $2,21 \pm 2,21$               |
| Jamón cocido     | $(2,09 \pm 0,66) \times 10^2$ | $(2,09 \pm 0,66) \times 10^1$ | $2,09 \pm 0,66$               |

### 3.4. Detección de mohos toxigénicos

Los mohos productores de ocratoxinas A (OTA), aflatoxinas, patulina, esterigmatocistina, verrucosidina y ácido ciclopiazónico son un peligro sanitario en productos cárnicos madurados como embutidos crudos-curados y jamón curado (Rodríguez y col. 2012f). En el presente trabajo se han desarrollado métodos de qPCR para la cuantificación de mohos productores de las anteriores micotoxinas.

Para el desarrollo de estos protocolos se diseñaron cebadores y sondas de hidrólisis TaqMan para la detección específica de los mohos anteriormente indicados. Los cebadores para la detección de mohos productores de aflatoxinas, OTA y patulina fueron diseñados a partir de secuencias obtenidas de productos amplificadas por PCR convencional usando cebadores previamente publicados y disponibles en la bibliografía (Bogs y col., 2006, Paterson, 2004, Richard y col., 2009), basados en los genes *o-metil-transferasa (omt-1)*, *no-ribosomal péptido sintetasa (otanpsPN)* e *isoepoxidon deshidrogenasa (idh)* implicados en la biosíntesis de aflatoxinas, OTA y patulina respectivamente (Rodríguez y col., 2011a, 2011b y 2012e). Para los mohos productores de ACP, esterigmatocistina y verrucosidina, el diseño de cebadores y sondas se hizo a partir de secuencias conocidas de los genes *dimetilalil triptófano sintasa (dmaT)* (Referencia de acceso GenBank DQ121455), *fluG* (Referencia de acceso GenBank L27817.1) y de la sonda SVr1 (Aranda y col., 2002) implicados en la producción de estas micotoxinas, respectivamente (Rodríguez y col., 2012a, 2012b y 2012g). El análisis de las anteriores secuencias, permitió el diseño a partir de las zonas conservadas de estos genes, de 1 pareja de cebadores y de 1 sonda TaqMan para cada uno de los mohos productores indicados utilizando el software Primer Express (Applied Biosystems). A continuación, se optimizaron distintos protocolos de qPCR individuales basados en las metodologías SYBR Green y TaqMan para la detección de cada uno de los mohos productores de micotoxinas anteriormente indicados (Rodríguez y col. 2011a, 2011b. 2012a, 2012b, 2012e y 2012g). Además, se diseñaron controles internos de amplificación (IAC) para su inclusión en los métodos de qPCR y evitar falsos resultados negativos. Así se diseñó un IAC no competitivo basado en el gen de la  $\beta$ -tubulina y un IAC competitivo diseñado a partir del gen *hly* de *L. monocytogenes*, para la cuantificación de mohos productores de verrucosidina y ACP, respectivamente.

Una vez diseñados los cebadores se optimizaron las concentraciones de los cebadores y las sondas y las condiciones de la reacción de qPCR individuales para la detección de los mohos productores de cada micotoxina, tal y como se muestra en la Tablas 9 y 10. Con el análisis de las curvas de disociación en las reacciones de qPCR con tecnología SYBR Green de cada una de las micotoxinas, se confirmó la amplificación de un solo producto de PCR en todas las cepas de mohos productoras de cada una de las micotoxinas (Tablas 9 y 10). Estos productos no se detectaron en ninguna de las cepas no productoras, demostrándose así la especificidad de los protocolos de qPCR diseñados. Resultados idénticos se obtuvieron mediante la metodología TaqMan. Además, en aquellos protocolos donde se incluyó un IAC, se demostró la validez de los resultados de PCR debido a que siempre hubo amplificación de dichos IAC hubiera o no presencia del ADN diana de mohos toxigénicos.

Tabla 9. Resumen de los resultados obtenidos en las reacciones de qPCR individuales basados en las metodologías SYBR Green para cuantificar mohos productores de aflatoxinas, OTA y patulina que incluye las concentraciones de los cebadores y sondas, las condiciones de de la qPCR y los valores de las distintas curvas de disociación (Rodríguez y col. 2011a, 2011b. 2012a, 2012b, 2012e y 2012g)

| Micotoxinas        | Genes    | Tm (°C)    | Concentración de los cebadores (nM) | Condiciones de las reacciones de qPCR   |
|--------------------|----------|------------|-------------------------------------|---|
| Aflatoxinas        | omt-1    | 86,4 ± 0,4 | F-omt: 200                          | 95 °C/10 min<br><b>40 ciclos:</b><br>95 °C/15 s<br>60 °C/1 min<br><b>Curva de disociación:</b><br>95 °C/15 s<br>60 °C/1 min<br>95 °C/15 s |
|                    |          |            | R-omt: 400                          |   |
| OTA                | otanpsPN | 84,6 ± 0,3 | F-npstr: 400                        |   |
|                    |          |            | R-npstr: 400                        |   |
| Patulina           | idh      | 88,0 ± 0,4 | F-idhtrb: 400                       |   |
|                    |          |            | R-idhtrb: 700                       |   |
| Esterigmatocistina | fluG     | 84,2 ± 0,3 | FluGF1: 300                         |   |
|                    |          |            | FluFR1: 300                         |   |

Tabla 10. Resumen de los resultados obtenidos en las reacciones de qPCR individuales basados en las metodologías TaqMan para cuantificar mohos productores de aflatoxinas, OTA y patulina que incluye las concentraciones de los cebadores y sondas y las condiciones de temperatura y tiempo de las reacciones de la qPCR (Rodríguez y col. 2011a, 2011b, 2012a, 2012b, 2012e y 2012g)

| <i>Micotoxina</i>                      | <i>Genes</i>                                  | <i>Concentración de los cebadores, sondas (mM)</i> | <i>Condiciones de las reacciones de qPCR</i>  |
|--|---|--|---|
| Aflatoxinas                            | omt-1   | F-omt: 200   | 1 ciclo de 2 min a 50 °C, 1 de 10 min a 95 °C, 40 de 15s a 95 °C y 40 de 1min a 60 °C                                     |
|  |   | R-omt: 400   |   |
|  |   | <i>OMTprobe</i> : 400                              |   |
| OTA                                    | <i>otanpsPN</i>                               | F-npstr: 400                                       |   |
|  |   | R-npstr: 400                                       |   |
|  |   | <i>NPSprobe</i> : 500                              |   |
| Patulina                               | idh   | F-idhtrb: 450                                      |   |
|  |   | R-idhtrb: 450                                      |   |
|  |   | <i>IDHprobe</i> : 450                              |   |
| ACP                                    | dmaT  | dmaTF: 300   |   |
|  |   | dmaTR: 300   |   |
|  |   | <i>dmaTp</i> : 200                                 |   |
|  |   | <i>IACp</i> : 200                                  |   |
|  |   | Copias IAC: 100                                    |   |
| Esterigmatocistina                     | fluG  | FluGF1: 200  |   |
|  |   | FluFR1: 200  |   |
|  |   | <i>FluGp</i> : 200                                 |   |
| Verrucosidina                          | SVr1  | VerF1: 400   | 1 ciclo de 2 min a 50 °C, 1 de 10 min a 95 °C y 45 de 15s a 95 °C y 1 final de 30 s a 57 °C y 30s a 60 °C                 |
|  |   | VerR1: 400   |   |
|  |   | <i>Verprobe</i> : 400                              |   |
|  |   | TubF1: 80  |   |
|  |   | TubR1: 80  |   |
|  |   | <i>Tubprobe</i> : 80                               |   |
| Múltiple (aflatoxinas, OTA y patulina) | <i>omt-1</i><br><i>otanpsPN</i><br><i>idb</i> | F-omt: 80  | 1 ciclo de 2 min a 50 °C, 1 de 10 min a 95 °C y 40 de 30s a 95 °C y 1 final de 1 min a 95 °C, 2 min a 58 °C y 30s a 95 °C |
|  |   | R-omt: 160   |   |
|  |   | <i>OMTprobe</i> : 160                              |   |
|  |   | F-npstr: 480                                       |   |
|  |   | R-npstr: 480                                       |   |
|  |   | <i>NPSprobe</i> : 600                              |   |
|  |   | F-idhtrb: 720                                      |   |
|  |   | R-idhtrb: 720                                      |   |
| <i>IDHprobe</i> : 720                  |   |  |   |

Una vez optimizados los protocolos de qPCR individuales, se diseñó un protocolo de qPCR múltiple basado en los genes *omt-1*, *otanpsPN* e *idb* que permitió cuantificar simultáneamente mohos productores de aflatoxinas, OTA y patulina (Rodríguez y col., 2012c).

Las eficiencias de los distintos métodos optimizados, tanto cuando se realizaron con el diluciones de ADN genómico o con el número de copias de los distintos genes variaron entre 95 y 112% (Figura 6).

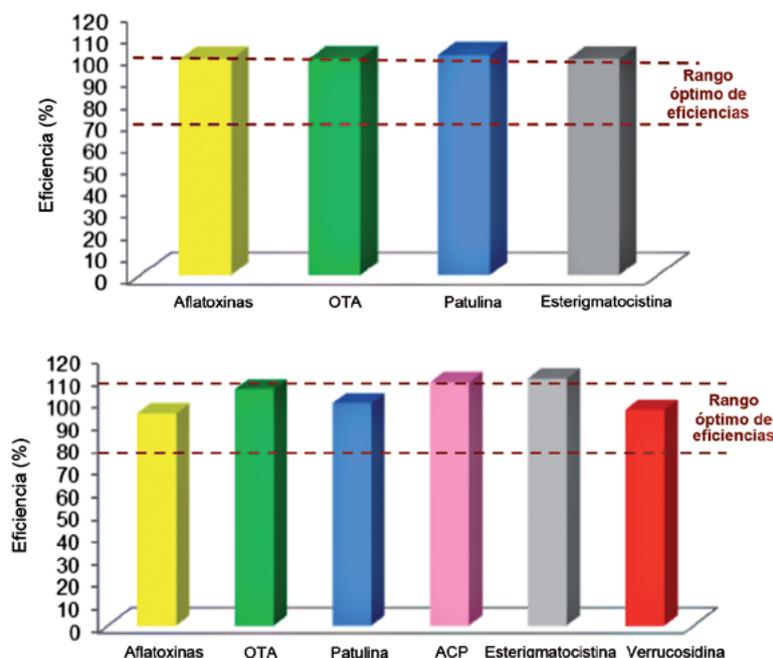


Figura 6. Eficiencias de amplificación de las curvas estándar obtenidas a partir de diluciones de ADN genómico o del número de copias de los diferentes genes de los métodos de qPCR desarrollados para cuantificar cada uno de los grupos de mohos productores de micotoxinas con tecnologías SYBR Green (superior) y TaqMan (inferior). (Rodríguez y col. 2011a, 2011b, 2012a, 2012b, 2012d, 2012e, 2012g y 2012h).

Los métodos de qPCR desarrollados se validaron en matrices cárnicas donde se evaluó su sensibilidad, límite de detección y eficacia en la cuantificación de mohos toxigénicos. Los límites de detección variaron entre 1 y 10 esporas/g y las eficiencias entre 80 y 112%, dependiendo de la cepa de moho y de la matriz cárnica utilizada. Estos valores se encuentran en el rango óptimo descrito por Fredlund y col. (2008), quienes sugirieron que dichos valores debían estar en el rango entre 80 y 110% y el coeficiente de correlación ser  $\geq 0,98$ .

Cuando se determinó la capacidad de los métodos de qPCR diseñados para cuantificar el crecimiento fúngico en muestras inoculadas artificialmente a diferentes tiempos de incubación, se obtuvo una estrecha relación (coeficiente de correlación entre 0,95 y 0,99) entre el recuento obtenido en placa (ufc) y la cuantificación mediante qPCR (Rodríguez y col. 2011a, 2011b, 2012a, 2012b, 2012e y 2012g).

El método de qPCR múltiple desarrollado para la cuantificación de forma simultánea de mohos productores de aflatoxinas, OTA y patulina mostró una alta especificidad y sensibilidad detectando entre 10 a 100 esporas/g en diferentes matrices cárnicas inoculadas artificialmente (Rodríguez y col., 2012c). Además, los valores de eficiencias en todas las matrices cárnicas variaron desde 81 a 109% y la cuantificación de la carga fúngica (esporas y micelio) de los alimentos inoculados en el tiempo, se observó al igual que en los ensayos de qPCR individuales, una estrecha correlación entre los recuentos obtenidos en placa y mediante qPCR.

Los métodos de qPCR desarrollados tanto individuales como múltiples permiten la cuantificación de mohos productores de micotoxinas en productos cárnicos madurados y constituyen una herramienta precisa para la cuantificación de estos mohos durante el proceso de elaboración. Se trata de métodos rápidos que permiten obtener resultados en 4-5 horas de análisis, lo que permite tomar medidas correctoras en partidas de productos o en secaderos concretos para evitar que los jamones o embutidos que están contaminados con este tipo de mohos toxigénicos puedan tener micotoxinas al final de la maduración.

### 3.5. Detección de virus entéricos humanos

Los virus entéricos humanos causantes de infecciones alimentarias son otros de los microorganismos preocupantes en productos cárnicos RTE. En este trabajo se han desarrollado métodos de qPCR para la detección sensible de este virus en estas matrices cárnicas. Como paso inicial para la optimización del método de extracción viral a partir de diversos productos cárnicos (choped, salchichón, chorizo) inoculados artificialmente con mengovirus, se probaron previamente diversos tampones a pH 9,5 (tampón Tris glicina y el tampón Tris Glicina adicionado con extracto de ternera a diferentes concentraciones) y el uso opcional de una purificación final con cloroformo:butanol.

Una vez optimizado este método recomendado por el Comité Europeo de Normalización (CEN) para otras matrices alimentarias se utilizó en productos cárnicos y se comparó frente a otros dos métodos automatizados (Maxwell16 de Promega y EZ1 de Qiagen) en muestras inoculadas con mengovirus.

Finalmente, se comparó el método de extracción térmica utilizado para la realización de la recta de calibración del mengovirus según el método CEN, frente al método con tiocianato de guanidino/sílica utilizado para la extracción a partir de muestras reales, al objeto de verificar si se obtenían resultados equivalentes.

La extracción del mengovirus para la realización de la curva de calibración con diferentes métodos mostró ligeras variaciones en función del método empleado como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados de la curva de calibración obtenida con diferentes métodos de extracción de mengovirus

| <i>Concentración Mengovirus</i> | <i>Manual BioMerieux</i> | <i>Automatizada EZ1</i> | <i>Automatizada Maxwell16</i> | <i>Lisis térmica</i> |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------------|----------------------|
| ARN Directo1                    | 20,25                    | 20,33                   | 19,92                         | 23,10                |
| 1/10                            | 23,34                    | 23,46                   | 23,00                         | 26,21                |
| 1/100                           | 26,85                    | 26,89                   | 26,61                         | 29,64                |
| 1/1000                          | 30,15                    | 29,99                   | 30,39                         | 33,09                |

La lisis térmica es la que da lugar a peores resultados ( $C_t$  más altos) a pesar de ser la recomendada, mientras que los 3 métodos basados en tiocianato de guanidino/sílica se comportan de forma similar ( $C_t$  similares).

Respecto a los ensayos realizados sobre diversos productos cárnicos se valoraron únicamente los métodos manuales y automatizados basados en sílica magnética y tiocianato de guanidino. De los resultados obtenidos (Tabla 12), consideramos la mejor opción, el uso del método automatizado Maxwell16 para la extracción del ARN viral, tanto por su eficacia, como por la ausencia de manipulación y fácil uso.

De los resultados obtenidos, consideramos la mejor opción, el uso del método automatizado Maxwell16 para la extracción del ARN viral, tanto por su eficacia, como por la ausencia

Tabla 12. Resultados obtenidos tras la extracción de mengovirus en productos cárnicos

| Muestras                    | Método de extracción viral del mengovirus | Resultados (mengovirus) |                         |
|-----------------------------|---|-------------------------|-------------------------|
|                             |   | Ct qPCR                 | Eficiencia Extracción % |
| Muestra 1<br>(jamón cocido) | Nuclisens manual                          | 27,96                   | 3,95                    |
|                             | Automatizado EZ1                          | 29,75                   | 1,35                    |
|                             | Automatizado Maxwell                      | 27,66                   | 8,00                    |
| Muestra 2<br>(jamón cocido) | Nuclisens manual                          | 26,89                   | 8,35                    |
|                             | Automatizado EZ1                          | 27,64                   | 6,10                    |
|                             | Automatizado Maxwell                      | 26,31                   | 19,60                   |
| Muestra 3<br>(salchichón)   | Nuclisens manual                          | 28,33                   | 5,45                    |
|                             | Automatizado EZ1                          | 31,11                   | 1,00                    |
|                             | Automatizado Maxwell                      | 28,51                   | 8,20                    |
| Muestra 4<br>(chorizo)      | Nuclisens manual                          | 27,98                   | 7,35                    |
|                             | Automatizado EZ1                          | 30,77                   | 1,30                    |
|                             | Automatizado Maxwell                      | 28,37                   | 11,20                   |

de manipulación y fácil uso. Como alternativa, el método manual de BioMerieux (recomendado por el CEN) también ha dado lugar a resultados satisfactorios, aunque su metodología es más tediosa.

#### 4. Avances y aplicación de métodos en productos cárnicos

Los métodos de qPCR desarrollados permiten la cuantificación de *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, estafilococos enterotoxigénicos, mohos toxigénicos y virus en carne y productos cárnicos. Se trata de métodos muy específicos y altamente sensibles detectando en la mayoría de los casos entre 1 y 10 ufc/g de producto. Además son métodos rápidos que permiten obtener resultados en tiempos de análisis muy bajos, en todo caso inferior a 12 horas, para los que se utilicen pre-enriquecimientos. Se trata pues, de protocolos que pueden aplicarse para el control de materias primas y productos en proceso dado que permiten la adopción de medidas correctoras rápidas en los procesados de carne y productos cárnicos con el objetivo de obtener productos finales libres de microorganismos patógenos. Algunos de estos métodos desarrollados están siendo utilizados por las industrias cárnicas en combinación con medidas preventivas como herramienta útil para el control de la seguridad de los productos cárnicos que elaboran (Bernáldez y col. 2013a y b).

#### 5. Conclusiones

Este trabajo demuestra que hay una importante incidencia de algunos microorganismos patógenos preocupantes en las industrias cárnicas españolas. Especialmente destaca el porcentaje superior al 20% encontrado en *L. monocytogenes* y *Aeromonas* sp. en las industrias cárnicas y productos RTE analizados. También hay incidencia en la industria cárnica de otros patógenos como *Salmonella* y *Campylobacter*, si bien en porcentajes muchos más bajos. Se deduce pues de estos resultados que es necesario incidir en el control de patógenos en las industrias cárnicas con el objetivo de minimizar su incidencia. Para lograr este objetivo adquiere extraordinaria importancia el uso de nuevas tecnologías para eliminación de patógenos, aspecto considerado en otros capítulos de este libro, pero también son fundamentales el desarrollo de métodos que permiten la detección rápida y sensible de estos microorganismos patógenos. En este sentido, en este trabajo se han desarrollado nuevos protocolos para recuperar de forma eficaz *L. mono-*

*cytogenes* de las superficies de equipos y utensilios en las industrias cárnicas basados en mini-rodillo 100% fibra de lana y esponja de celulosa. Además se han desarrollado métodos de PCR convencional y PCR en tiempo real específicos y sensibles para la detección e incluso cuantificación de patógenos tales como *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* enterotoxigénico, mohos productores de micotoxinas y mengovirus en las industrias cárnicas españolas. Se trata además de métodos que, por su rapidez, permiten adoptar decisiones durante los procesados sobre el destino y tratamiento de materias primas y de productos que se están elaborando, con el objetivo final de obtener productos cárnicos RTE libres de microorganismos patógenos.

### Equipos participantes

Los resultados que se recogen en este capítulo derivan de las investigaciones realizadas en las distintas acciones desarrolladas por los equipos que han participado en las diferentes acciones del subproyecto DETRAPAT y que han sido coordinadas por Javier Yangüela (UNIZAR), Andrés Otero (UNILEÓN), Teresa Aymerich (IRTA), Mar Rodríguez (UNEX) y José Enrique Carreres (AINIA).

### Agradecimientos

La investigación que recoge este capítulo ha sido llevada a cabo en el marco del Proyecto Consolider-Ingenio 2010 CARNISENUSA CSD2007-00016, en colaboración con los siguientes proyectos: AGL2007-64639, AGL 2010-21623, AGL2011-26118 (Ministerio de Economía y Competitividad), GRU08100, GRU09158, GRU10162 del Gobierno de Extremadura y FEDER, Diputación General de Aragón por el proyecto: Grupo Consolidado de Investigación (A01/2011) "Análisis y evaluación de la seguridad alimentaria" y al FSE (Fondo Social Europeo) y GR155 de la Junta de Castilla y León.

## 6. Referencias

- Angelotti, R., Wilson, J.L., Litsky, W., Walter, W.G. 1964. Comparative evaluation of the cotton swab and RODAC methods for the recovery of *Bacillus subtilis* spore contamination from stainless steel surfaces. *Health Laboratory Science* 1, 289-296.
- Aranda, E., Rodríguez, M., Benito, M.J., Asensio, M.A., Córdoba, J.J. 2002. Molecular cloning of verrucosidin-producing *Penicillium polonicum* genes by differential screening to obtain a DNA probe. *International Journal of Food Microbiology* 76, 55-61.
- Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Rodríguez, M., Cordero, M., Polo, L., Rodríguez, A. 2013a. Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage "salchichón". *Food Control*, 32, 69-76.
- Bernáldez, V., Rodríguez, A., Martín, A., Lozano, D., Córdoba, J.J. 2013b. Development of a multiplex qPCR method for simultaneous quantification in dry-cured ham of an antifungal-peptide *P. chrysogenum* strain used as protective culture and aflatoxin-producing moulds. *Food Control*. Aceptado.
- Bogs, C., Battilani, P., Geisen, R. 2006. Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. *International Journal of Food Microbiology* 107, 39-47.
- Chen, Y., Zhang, W., Knabel, S.J. 2007. Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. *Journal Clinical Microbiology* 45, 835-846
- D'Agostino, M., Wagner, M., Vazquez-Boland, J. A., Kuchta, T., Karpiskova, R., Hoorfar, J., Novella, S., Scortti, M., Ellison, J., Murray, A., Fernandes, I., Kuhn, M., Pazlarova, J., Heuvelink, A. y Cook, N. 2004. A validated PCR- based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model-towards an international standard. *Journal of Food Protection* 67, 1646-1655.
- Doumith, M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. 2004. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3819-3822.

- Fredlund, E., Gidlund, A., Olsen, M., Börjesson, T., Spliid, N.H.H., Simonsson, M. 2008. Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. *Journal of Microbiological Methods* 73, 33-40.
- Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C., Yangüela, J. 2012a. Comparison of sampling procedures for recovery of *Listeria monocytogenes* from stainless steel food contact surfaces. *Journal of Food Protection* 75, 1077-1082.
- Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C., Yangüela, J. 2012b. Sponge versus mini-roller for the surface microbiological control of *Listeria monocytogenes*, total aerobic mesophiles and *Enterobacteriaceae* in the meat industry. *Food Control* 27, 242-247.
- Gómez, D., McGuinness, S., Reddington, K., O'Grady, J., Yangüela, J., Barry T. 2012c. Evaluation of a novel *Listeria* enrichment broth combined with a real-time PCR diagnostics assay for the specific detection of *Listeria monocytogenes* in RTE pork products. *International Journal of Food Science and Technology*. Doi:10.1111/ijfs.12053.
- Gordillo, R., Córdoba, J.J., Andrade, M.J., Luque, M.I., Rodríguez, M. 2011. Development of PCR assays for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat products. *Meat Science* 88, 767-773.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P., Ellerbroek, L., Bunge, C., Dorn, C. y Helmut, R. 2003. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *International Journal of Food Microbiology* 89, 241-249.
- Martín, B., Garriga, M. y Aymerich, T. 2011. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at small-scale Spanish factories producing traditional fermented sausages. 2011. *Journal of Food Protection*. 74, 812-815.
- Martín B., Garriga M., Aymerich T. 2012. Pre-PCR treatments as a key factor on the probability of detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat meat products by real-time PCR. *Food Control* 27, 163-169.
- Martín B, Raurich S., Garriga M, Aymerich T. 2013. Effect of amplicon lengths in propidium monoazide quantitative PCR for the enumeration of viable cells of *Salmonella* in cooked ham. *Food Analytical Methods* 6, 683-690.
- Nicolaisen, M., Suproniené, S., Nielsen, L.K., Lazzaro, I., Spliid, N.H., Justesen, A.F. 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* 76, 234-240.
- Paterson, R.R.M. 2004. The isoepoxydon dehydrogenase gene of patulin biosynthesis in cultures and secondary metabolites as candidate PCR inhibitors. *Mycology Research* 108, 1431-1437.
- Paterson, R.R.M. 2007. Internal amplification controls have not been employed in fungal PCR hence potential false negative results. *Journal of Applied Microbiology* 12, 1-10.
- Paterson, R.R.M., Lima, N. 2009. Mutagens manufactured in fungal culture may affect DNA/RNA of producing fungi. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1070-1080.
- Richard, E., Heutte, N., Bouchart, V., Garon, D. 2009. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Animal Feed Science and Technology* 148, 309-320.
- Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Scotti, M., Esteve, T., Vázquez-Boland, J.A. y Pla, M. 2004. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: Assessment of *bly*, *iap* and *lin02483* targets and amplifluor technology. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1366-1377.
- Rodríguez, A., Córdoba, J.J., Gordillo, R., Córdoba, M.G., Rodríguez, M. 2012a. Development of two quantitative real-time PCR methods based on SYBR Green and TaqMan to quantify sterigmatocystin-producing molds in foods. *Food Analytical Methods* DOI: 10.1007/s12161-012-9411-9.
- Rodríguez, A., Córdoba, J.J., Werning, M.L., Andrade, M.J., Rodríguez, M. 2012b. Duplex real-time PCR method with internal amplification control for quantification of verrucosidin producing molds in dry-ripened foods. *International Journal of Food Microbiology* 153, 85-91.
- Rodríguez, A., Luque, M.I., Andrade, M.J., Rodríguez, M., Asensio, M.A., Córdoba, J.J. 2011a. Development of real-time PCR methods to quantify patulin-producing molds in food products. *Food Microbiology* 28, 1190-1199.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Córdoba, J.J. 2012c. Development of a multiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods. *International Journal of Food Microbiology* 155, 10-18.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Justesen, A.F., Córdoba, J.J. 2011b. Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. *International Journal of Food Microbiology* 149, 226-235.

- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Justesen, A.F., Córdoba, J.J. 2012d. A comparative study of DNA extraction methods to be used in real-time PCR based quantification of ochratoxin A-producing molds in food products. *Food Control* 25, 666-672.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Martín, A., Córdoba, J.J. 2012e. Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin producing molds in foods. *Food Microbiology* 31, 89-99.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Núñez, F., Córdoba, J.J. 2012f. Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. *Food Control* 27, 118-126.
- Rodríguez, A., Werning, M.L., Rodríguez, M., Bermúdez, E., Córdoba, J.J. 2012g. Quantitative real-time PCR method with internal amplification control to quantify cyclopiazonic acid producing molds in foods. *Food Microbiology* 32, 397-405.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Bernáldez, V., Lozano, D., Córdoba, J.J. 2012h. Desarrollo de métodos PCR en tiempo real para la cuantificación de mohos productores de micotoxinas en productos cárnicos madurados. *Eurocarne*. 205, 116-125.
- Sant'Ana, A.S., Simas, R.C., Almeida, C.A.A., Cabral, E.C., Rauber, R.H. Mallmann, C.A., Eberlin, M.N., Rosenthal, A., Massaguer, P.R., 2010. Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssochlamys nivea* and *Byssochlamys fulva*. *International Journal of Food Microbiology* 142, 156-163.
- Selma, M.V., Martínez-Culebras, P.V. Aznar, R. 2008. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 122, 126-134.
- Sharma, N.K., Rees, C.E., Dodd, C.E. Development of a single-reaction multiplex PCR Toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. 2000. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1347-1353.
- Sperry, K.E.V., Kathariou, S., Edwards, J.S., Wolf, L.A. 2008. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis as a tool for subtyping *Listeria monocytogenes* strains. *Journal Clinical Microbiology* 46, 1435-1450.
- Thévenot, D., Dernburg, A. y Vernozy-Rozand, C. 2006. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology* 101, 7-17.

## CAPITULO IV

# Estrategias tecnológicas y beneficios saludables de elaborados cárnicos funcionales

---

*Francisco Jiménez Colmenero*

---

*Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC). Madrid*

---

*M<sup>a</sup> Dolores Selgas*

---

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria (UCM). Madrid*

---

*Diana Ansorena*

---

*Departamento de Ciencias de la Alimentación y Fisiología. Facultad de Farmacia (UNAV). Pamplona*

### 1. Introducción

Uno de los principales motivos que impulsa el desarrollo de nuevos alimentos viene determinado por la necesidad de disponer de productos más ajustados a los requerimientos específicos de amplios sectores de la sociedad, entre ellos los relacionados con el binomio dieta-salud. Los avances en el conocimiento producidos en las últimas décadas están abriendo extraordinarias posibilidades para, a través del efecto de componentes específicos (nutrientes y no nutrientes) de los alimentos, contribuir a mejorar determinadas funciones fisiológicas en el organismo para asegurar el máximo de bienestar, salud y calidad de vida. En este contexto, la producción de elaborados cárnicos saludables y funcionales constituye una excelente oportunidad de diferenciación, diversificación y posicionamiento en un mercado en continuo crecimiento. Hecho especialmente importante para un sector que, como el cárnico, está claramente necesitado de mejorar su imagen, entre otras razones por la asociación establecida entre algunos de sus componentes y varias de las enfermedades crónicas no transmisibles más importantes en nuestra sociedad. Es de destacar que, por su elevada frecuencia y nivel de consumo, notable contribución a los niveles de ingesta de distintos nutrientes, gran versatilidad de presentación, amplio grado de aceptación, considerable aptitud para experimentar procesos de reformulación (cambios de composición) usando ingredientes de diversas procedencias, etc., los elaborados cárnicos son alimentos excepcionales para actuar como vehículo para condicionar la presencia de compuestos bioactivos sin modificar los hábitos de consumo (Jiménez-Colmenero y col., 2012b). Así, el enriquecimiento de ciertos alimentos en determinados compuestos bioactivos constituye una estrategia eficaz para lograr cubrir las recomendaciones nutricionales actuales (Berasategi y col., 2011a).

Tomando en consideración esos aspectos, y ante la necesidad de disponer de “PRODUCTOS CÁRNICOS PARA EL SIGLO XXI: SEGUROS, NUTRITIVOS Y SALUDABLES”, en el marco del subproyecto FUNCIOCA se ha realizado un notable esfuerzo para desarrollar y ensayar estrategias de reformulación de elaborados cárnicos encaminadas a optimizar la presencia cuantitativa y/o cualitativa de diversos compuestos con potenciales implicaciones en la salud, favoreciendo básicamente la presencia de componentes con efectos positivos y limitando el contenido de aquellos otros con consecuencias negativas. Este capítulo tiene como objetivo proporcionar una panorámica general de los avances en la producción de elaborados cárnicos saludables y funcionales realizados

en el marco del subproyecto FUNCIOCA. Para ello se han planteado dos planos de actuación complementarios, sin los cuales el estudio sería incompleto. Por un lado, se expone de manera resumida los principales procesos de reformulación ensayados y los hallazgos más relevantes en relación con aspectos de la viabilidad tecnológica y sensorial de diversos productos cárnicos (frescos, tratados por el calor, crudos curados) potencialmente funcionales reformulados con diferentes ingredientes bioactivos. Por otro, se analizan las distintas posibilidades que se han identificado y/o explorado a fin de evidenciar el efecto saludable de los productos desarrollados anteriormente.

## 2. Contribución al desarrollo de productos cárnicos saludables y funcionales

Varios aspectos han de tenerse en cuenta a la hora de describir el esfuerzo investigador en relación con el diseño y estrategias de desarrollo de productos cárnicos saludables y funcionales. En primer lugar hay que considerar la naturaleza de los elaborados cárnicos a reformular. Así los procesos de optimización de la presencia de componentes bioactivos se han llevado a cabo en productos que presentan distintas características de composición, granulometría, procesado, formas de presentación, etc., abarcando elaborados frescos, tratados térmicamente y crudo-curados.

En segundo lugar es esencial considerar el tipo de compuestos implicados en los procesos de reformulación, los cuales se han seleccionado generalmente en base a su contribución tecnológica (propiedades ligantes de agua y grasa, textura, actividad antioxidante, etc.), su potencial implicación en la salud (metabolismo óseo, efectos antiaterogénicos o anticancerígenos, etc.) y posibilidades de asimilación por el organismo. En este sentido, las actividades se han enfocado a reducir, incrementar, reemplazar o modificar la presencia de diversos compuestos básicamente en relación con la: a) modificación del contenido y el perfil lipídico; b) adición de fibras dietéticas o ingredientes ricos en ellas; c) modificación en la concentración de varios minerales; d) incorporación de componentes fitoquímicos y vitaminas.

Finalmente, hay que considerar que el diseño ha de tener en cuenta la magnitud del cambio de composición a realizar. Evidentemente además de asimilable por el organismo, las modificaciones inducidas en la concentración de una determinada sustancia (presencia/ausencia) han de ser tales que cuando el producto final se consume en cantidades razonables ha de aportar niveles de ingesta capaces de ejercer el efecto nutricional y/o fisiológico deseado.

Teniendo en cuenta la variabilidad de productos y compuestos/ingredientes bioactivos considerados, y que muchos de estos requieren a su vez de estudios específicos relacionados con las condiciones de preparación, estabilización o evaluación de su actividad, y en beneficio de la claridad de exposición, los avances en la producción de elaborados cárnicos saludables y funcionales se agrupan en cuatro apartados. El primero de ellos trata de describir estrategias de estudio, preparación y/o estabilización de compuestos bioactivos, y los tres restantes, uno por tipo de elaborado cárnico, dirigidos a agrupar las actividades realizadas sobre procesos de reformulación de elaborados frescos, tratados por el calor y crudo-curados.

### 2.1. Estrategias de preparación y/o estabilización de compuestos bioactivos

En ocasiones los compuestos bioactivos o los ingredientes que los contienen y que van a emplearse en nuevas formulaciones de elaborados cárnicos precisan de estudios previos que permitan el desarrollo de procesos de estabilización, establecimiento de las condiciones de obtención, valoración de una actividad específica, etc. A continuación se exponen algunos de los aspectos más relevantes en ese sentido.

#### 2.1.1. Formación y propiedades de ingredientes no-cárnicos para mejorar el contenido y/o perfil de ácidos grasos

Los lípidos se encuentran entre los ingredientes funcionales que mayor atención han recibido por sus implicaciones en la salud. La preparación de productos con un contenido y/o perfil más saludable desarrollados en FUNCIOCA se ha basado en la reducción del contenido

y/o la sustitución de grasa animal por otra de origen vegetal o marino más acorde con las recomendaciones nutricionales sobre salud. Así se han reformulado distintos tipos de derivados cárnicos reemplazando básicamente tocino por aceites vegetales (oliva y lino) y/o de origen marino (pescado y algas) estabilizados en forma de emulsiones de *aceite-en-agua* (O/W) (pre-emulsiones) empleando para ello diversos sistemas proteicos. Las características de estas emulsiones resultan de especial interés por cuanto son ingredientes en la preparación de los productos reformulados y pueden ejercer un papel determinante en los atributos de calidad de los mismos. Es por ello que se han realizado diversos estudios para evaluar sus características estructurales y propiedades tecnológicas en función de variables asociadas a la composición de la fase lipídica (aceites de oliva, lino, pescado, algas, individualmente utilizados en combinación de diseño), o al tipo de emulsionante hidrofílico empleado (caseinato, proteína de soja sola o combinada con transglutaminasa de origen microbiano-MTG) (Jiménez-Colmenero y col., 2010b; García-Iñiguez de Ciriano y col., 2010a; Campos y col., 2011; Herrero y col., 2011a y 2011b; Delgado-Pando y col., 2010b).

Además de emulsiones simples (O/W), se han estudiado la preparación y propiedades de *emulsiones múltiples tipo de agua-en-aceite-en-agua* (W/O/W) (Poyato y col., 2012 y 2013; Cofrades y col., 2013). Por sus propiedades, entre ellas la capacidad de atrapar y proteger diversas sustancias y producir su liberación controlada desde el interior de una fase a otra, este tipo de emulsiones abre nuevas posibilidades en el diseño y desarrollo de alimentos funcionales (Jiménez Colmenero, 2013).

Dentro de las estrategias tecnológicas utilizadas para reducir los niveles de grasa de los productos cárnicos se han empleado una amplia variedad de ingredientes: carbohidratos, proteínas o lípidos. Estos ingredientes han de suponer por un lado, escasa aportación energética, y por otro, han de impartir al producto las características deseadas. De entre las distintas fibras conocidas, el konjac glucomanano (KGM) resulta de especial interés debido sus notables efectos fisiológicos, y excepcionales propiedades tecnológicas, entre ellas su capacidad de retención de agua y formación de geles capaces de simular las propiedades organolépticas de grasa (sensación en la boca). Basándose en esto se han preparado *análogos de grasa a base de geles de KGM*, realizando un análisis comparativo de sus características con grasa animal (Jiménez-Colmenero y col., 2012a) y evaluando su comportamiento en procesos de refrigeración y congelación (Jiménez-Colmenero y col., 2013a). Los geles de KGM se han estudiado además como *agentes de carga de aceites*. Aceite de oliva y combinaciones de aceites de oliva, lino, pescado se han estabilizado en una matriz de gel de konjac que se emplearon para reemplazar grasa animal en procesos de reformulación de distintos tipos de transformados cárnicos (Jiménez-Colmenero y col., 2013b; Salcedo-Sandoval y col., 2013; Triki y col., 2013a, 2013b y 2013c).

### 2.1.2. Preparación, caracterización y/o actividad antioxidante de ingredientes funcionales

La sustitución de grasa saturada por insaturada, aplicada en la obtención de elaborados cárnicos con un perfil lipídico más saludable, incrementa el riesgo (velocidad y extensión) de oxidación lipídica. Este fenómeno, que constituye un grave problema tanto a nivel tecnológico como de salud, puede limitarse mediante la aplicación de varios tipos de estrategias. Una de las más empleadas consiste en la incorporación de antioxidantes. Ya que el empleo de aditivos de síntesis está siendo cuestionado por su potencial riesgo para la salud, se está incrementando la utilización de antioxidantes naturales. En tal sentido, en el ámbito del subproyecto FUNCIOCA se han realizado diversas actividades, entre ellas la evaluación de la actividad antioxidante en matrices cárnicas de extractos de algarrobo (Bastida y col., 2009), de *Borago officinalis* (García-Iñiguez de Ciriano y col., 2009), varios tipos de algas (López-López y col., 2009a; Cofrades y col., 2010), hidroxitirosol (Cofrades y col., 2011b), extractos de *Hypericum perforatum* L (Sánchez-Muniz y col., 2012) y extractos liofilizados acuosos o hidroalcohólicos de *Melissa officinalis* (García-Iñiguez de Ciriano y col., 2010b y 2012; Berasategi y col., 2011b). Además, se han caracterizado exhaustivamente extractos de *Verbena officinalis* y *Melissa officinalis* con el propósito de determinar los compuestos responsables de su actividad antioxidante (Rehecho y col., 2011;

Encalada y col., 2011). En el caso de la melisa, se ha podido describir también su actividad antiproliferativa (Encalada y col., 2011). De igual modo, se ha analizado *in vitro* la actividad antioxidante del licopeno tanto en piel de tomate seca, como en el concentrado de tomate antes y después de someterlos a radiaciones ionizantes. La utilización de estas fuentes de licopeno procedentes de subproductos o excedentes de la industria tomatera, supone un beneficio medioambiental, dada la no utilización de solventes (Calvo y col., 2008).

Diversos estudios han permitido establecer las condiciones óptimas de secado de tomillo (*Thymus vulgaris*) para maximizar la capacidad antioxidante de extractos obtenidos mediante fluidos supercríticos (Rodríguez y col., 2012 y 2013).

Adicionalmente se han realizado estudios encaminados al desarrollo de procedimientos analíticos y determinación de algunos compuestos bioactivos naturalmente presentes en carne y productos cárnicos (Clariana y col., 2010).

## 2.2. *Productos frescos*

Distintos tipos de elaborados cárnicos frescos han sido reformulados a fin de obtener productos más saludables. En tal sentido, se han desarrollado productos tipo hamburguesas con reducido contenido en grasa y sal (sodio) mediante la sustitución parcial de grasa animal por aceite de oliva (O/W) e incorporación del alga Wakame (*Undaria pinnatifida*) (López-López y col., 2010 y 2011). Filetes reestructurados de pollo con bajo contenido en sodio han sido elaborados mediante el empleo de MTG e incorporación del alga Espagueti de mar (*Himantalia elongata*) (Cofrades y col., 2011a). Se ha observado que la utilización de algas como ingredientes no cárnicos puede emplearse como medio para reducir sodio, dotando además al producto de distintos compuestos bioactivos entre ellos fibra, minerales, etc. También se ha estudiado cómo mejorar el perfil lipídico y reducir los niveles sodio en salchicha fresca tipo “merguez” (producto típico del norte de África) reemplazando grasa animal por aceite de oliva estabilizado en una matriz de konjac y sustituyendo el NaCl por otras sales (Triki y col., 2013a y 2013b). Otras estrategias de mejora del perfil lipídico en salchichas frescas tuvieron por objetivo incrementar el aporte de ácidos grasos omega-3 mediante la incorporación de aceite de lino o pescado, reemplazando a su vez parcialmente al tocino de cerdo (Valencia y col., 2008). Se obtuvieron productos estables siempre y cuando se estabilizara la formulación con antioxidantes (catequinas de té y extractos de café verde).

Se han formulado hamburguesas enriquecidas con ácido fólico (AF) a una concentración (2,4 mg/100 g) superior a la ingesta diaria recomendada (IDR) para compensar posibles pérdidas. Este producto sometido a irradiación (2-4 kGy) presentó una buena calidad tecnológica y sensorial, manteniendo la concentración de AF incluso después de 3 meses de almacenamiento a vacío y en refrigeración. La irradiación permitió prolongar la vida útil del derivado cárnico conservado en refrigeración más de 20 días, detectándose pérdidas de AF (20-30%) solo a 4 kGy. No hubo pérdidas adicionales durante el almacenamiento a 4 °C, apreciándose que en cualquier caso, el producto contenía concentraciones de AF superiores a IDR (Galán y col., 2010).

Las sales de calcio se incorporaron en diferentes concentraciones y buscando siempre un compromiso entre la calidad tecnológica y sensorial. El citrato-malato y el lactato cálcicos fueron las que rindieron los mejores resultados tecnológicos y sensoriales incluso a concentraciones suficientes para que 100 g aportasen hasta el 40% de la IDR (Soto y col., 2010).

El enriquecimiento con licopeno (carotenoide con alto poder antioxidante) se hizo con los derivados del tomate (piel y tomate en polvo) hasta en un 6%. Los resultados obtenidos mostraron como el cocinado favorece la liberación del licopeno del interior de las células vegetales (García y col., 2009; Gámez y col., 2011). La conservación no condicionó la concentración ni la isomerización del carotenoide. Los mejores resultados se obtuvieron con el 4,5% de cada derivado del tomate y el contenido final en licopeno fue de 4,9 y 6,4 mg/100 g en hamburguesas adicionada con piel de tomate o de tomate concentrado, respectivamente. La concentración de licopeno disminuyó ligeramente a 4 kGy, debido a su reacción con radicales libres formados con la irradiación (Selgas y col., 2009a; Gámez y col., 2011).

En todos los casos, la calidad sensorial de los productos (enriquecidos con AF y licopeno) irradiados a 4 kGy experimentaron un ligero deterioro debido a la aparición de olores desagradables “a irradiado” asociados a la formación de compuestos volátiles azufrados durante el proceso. Los tratados con 3 kGy presentaron buena calidad sensorial a la vez que fueron higiénicamente seguros.

### 2.3. *Productos tratados por el calor*

En productos tratados por el calor, los estudios encaminados al desarrollo de elaborados cárnicos saludables y funcionales se han llevado a cabo sobre salchichas tipo frankfurt y bologna, así como en paté.

En las salchichas tipo frankfurt, los estudios se han dirigido fundamentalmente a mejorar su contenido y perfil lipídico, reducir sodio e incorporar otros compuestos bioactivos. La mejora del contenido y perfil lipídico se ha realizado reemplazando básicamente tocino por aceites vegetales (oliva y lino) y/o de origen marino (pescado y algas) estabilizados en forma de emulsiones O/W o en agentes de carga (matriz de konjac). En tal sentido y a fin de favorecer la presencia de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) se han preparado productos mediante la sustitución parcial de grasa animal por aceite de oliva en productos tipo salchicha de frankfurt (Fernández-Martín y col., 2009; Jiménez-Colmenero et al., 2010b; Carmona y col., 2011; Herrero y col., 2012). De igual modo se han empleado distintas combinaciones de aceites de oliva, lino, pescado o alga para favorecer la presencia de ácidos grasos poliinsaturados (López-López y col., 2009b y 2009c; Delgado-Pando y col., 2010b y 2011b). La sustitución parcial de la grasa animal por emulsiones O/W preparadas con una combinación de aceites (de origen vegetal y marino) y diferentes sistemas proteicos resulta una estrategia adecuada para desarrollar salchichas tipo frankfurt potencialmente funcionales en base a un contenido lipídico mejorado. De igual modo, el empleo del alga Espagueti de mar ha permitido la obtención de productos con propiedades saludables en base al menor contenido en Na y grasa y a la presencia de ciertos compuestos biológicamente activos, principalmente fibra dietética, polifenoles y minerales (López-López y col. 2009b y 2009c; Jiménez-Colmenero y col., 2010a).

Estudios sobre la incorporación de luteína (carotenoide implicado en la prevención de la degeneración macular asociada a la edad) en salchichas tipo frankfurt han demostrado la viabilidad de este desarrollo experimental para el enriquecimiento en luteína (Granado-Lorencio y col., 2010). También se ha puesto de manifiesto la actividad antioxidante del hidroxitirosol (compuesto fenólico procedente del aceite de oliva con potenciales efectos beneficiosos para la salud) en este tipo de elaborados cárnicos (Cofrades y col., 2011b).

En el caso de los productos tipo bologna, la utilización de emulsiones tipo O/W de aceite de lino y proteína de soja, estabilizadas con extractos de melisa ha resultado eficaz en la mejora del perfil lipídico de los productos, logrando disminuir significativamente el cociente n-6/n-3 y los índices aterogénico y trombogénico, y manteniendo buenas propiedades sensoriales. Los resultados de la medida de la actividad antioxidante residual en los productos demuestran la viabilidad del extracto como potente antioxidante, resultando efectivo tanto antes como después del tratamiento térmico de pasterización (Berasategi y col., 2011b).

Para los procesos de enriquecimiento con ácido fólico y calcio se utilizaron productos tipo mortadela. El estudio con ácido fólico se hizo en las mismas concentraciones que en las hamburguesas y los resultados obtenidos fueron igualmente muy satisfactorios. Los niveles de AF se mantuvieron estables durante el procesado y el almacenamiento en refrigeración, tan solo se observó un ligero descenso cuando se irradiaron a 4 kGy. En este tipo de productos, los cambios sensoriales asociados a la irradiación quedaron enmascarados con la mezcla de especias incorporada. La vida útil se prolongó más de 3 meses en el producto irradiado y al final de este periodo aumentó la valoración sensorial probablemente debido a la interacción entre los compuestos volátiles responsables del olor “a irradiado”. Una ración de 50 g del producto final aportaría cerca del 100% de la IDR (Galán y col., 2011a y 2013). En el caso del calcio, los resultados fueron

igualmente similares a los de las hamburguesas, ya que el gluconato de calcio tampoco fue tecnológicamente viable en productos cocidos y de nuevo fue el citrato-malato y el lactato las sales con las que se obtuvieron los mejores resultados, pudiendo llegar a aportar hasta el 40% de la IDR (Soto y col., 2011).

El proceso de reformulación encaminado al desarrollo de paté potencialmente funcional en base a un contenido lipídico mejorado (reducción de grasa y enriquecimiento con ácidos grasos poliinsaturados n-3), se llevó a cabo mediante la sustitución de tocino de cerdo por una emulsión O/W de aceites de oliva, linaza y pescado e inclusión del gel de konjac. En tales condiciones se obtiene un producto con un 50% menos de grasa y con elevadas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados n-3, incluyendo 723 mg/100 g de eicosapentanoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA). El paté obtenido, además de ventajas desde el punto de vista de su composición, presenta adecuada viabilidad tecnológica, sensorial y microbiológica, incluso en periodos prolongados de conservación en refrigeración (Delgado-Pando y col., 2011a y 2012).

#### *2.4. Productos crudo-curados*

Los procesos de reformulación de productos crudo-curados se han realizado en chorizo, salchichón y sobrasada.

Entre los estudios efectuados para dotar a este tipo de productos de propiedades nutricionales y saludables ocupan un papel destacado los encaminados a producir una mejora del contenido y perfil lipídico en chorizo. En tal sentido se han llevado a cabo procesos de reducción de grasa basados en la sustitución de tocino por geles de konjac, evaluándose su impacto sobre factores de procesado, atributos de calidad y estabilidad en refrigeración (Ruiz-Capillas y col., 2012a y 2012b). De manera análoga se han elaborado productos con reducido contenido en grasa y con un perfil de ácidos grasos más saludable empleando como estrategia la sustitución de tocino por una combinación de aceites de oliva, lino y pescado estabilizados en una matriz de konjac (Jiménez-Colmenero y col. 2013b; Triki y col., 2013c).

Las emulsiones O/W también han resultado ser viables tecnológicamente y sensorialmente para incorporar lípidos altamente insaturados (lino o lino y alga) en productos crudos-curados tipo chorizo. Su empleo como sustituto parcial del tocino de cerdo, en una proporción de hasta un máximo de un 25%, en productos estabilizados con antioxidantes naturales o sintéticos, ha proporcionado productos sensorial y tecnológicamente aceptables (García-Iñiguez de Ciriano y col., 2009, 2010b y 2012).

Otro de los retos tecnológicos afrontados en productos curados ha sido la reducción del contenido en sodio y la incorporación de minerales de interés. Así, a la mejora del perfil lipídico, se ha podido sumar simultáneamente en un mismo producto, los beneficios saludables del yodo y selenio mediante el uso de sal yodada y levadura de selenio como ingredientes (García-Iñiguez de Ciriano y col., 2010b). Además, se ha logrado la sustitución de parte de su contenido en NaCl por ascorbato cálcico, logrando, no sólo disminuir el Na, sino incrementar significativamente el aporte de calcio en productos enriquecidos en ácidos grasos omega-3 (García-Iñiguez de Ciriano y col., 2013).

Dentro de las estrategias de reformulación de productos crudos-curados se ha utilizado fibra dietética soluble (fructooligosacáridos, FOS). Los FOS se incorporaron en salchichones elaborados con diferentes cantidades de grasa (30, 15 y 6%), lo que supuso la reducción de hasta un 58% de grasa. Se incorporaron en cantidades de hasta el 6% y a estos niveles, los FOS actuaban como buenos sustitutos de grasa resultando embutidos con una buena aceptabilidad tecnológica y sensorial, y con niveles medios de grasa (15%). El resultado final es un producto madurado reducido en grasa y enriquecido con un prebiótico y fibra dietética soluble (Salazar y col., 2009).

El enriquecimiento con ácido fólico, calcio y licopeno se realizó también en salchichón. Los embutidos obtenidos al incorporar AF fueron tecnológicamente y sensorialmente aceptables como en los productos cárnicos anteriores (Galán y col., 2011b), incluso en aquellos listos para consumo (RTE) tras 90 días de almacenamiento. En relación la incorporación de calcio, la concentración

de sales ensayadas tuvo que ser inferior a la señalada en productos frescos y tratados por el calor (descritos anteriormente), situándose en este caso el límite tecnológico en el 30% de la IDR; de nuevo el citrato-malato cálcico resultó ser la sal más adecuada (Selgas y col., 2009b). En el caso del licopeno, las cantidades máximas viables de piel de tomate y de tomate en polvo fueron del 2%. En estas concentraciones, el licopeno, pigmento de color naranja, y la presencia de fibra, modificaron el color y la textura de estos productos cárnicos. En los productos RTE, 2 kGy fue la máxima dosis aceptable. El licopeno se redujo ligeramente pero aun así, la concentración final fue suficiente para que 100 g aportaran el 24% de la ingesta recomendada como saludable. El tiempo de almacenamiento no influyó en la concentración ni en la isomerización del licopeno (Gámez y col., 2011).

Se ha empleado fibra de zanahoria en la formulación de sobrasada. Para optimizar su efecto se desarrollaron redes neuronales a fin de modelar la evolución de diferentes parámetros físico-químicos y sensoriales a lo largo del proceso de curado, en función de la concentración de fibra (0-12%). Se formuló y resolvió un problema de optimización, maximizando la cantidad del ingrediente, y estableciendo como restricción que se preservara la evolución de los parámetros durante el proceso de curado. El nivel óptimo de ingrediente depende, lógicamente, de las condiciones de operación (humedad relativa y temperatura) (Eim y col., 2013).

### 3. Declaraciones de propiedades nutricionales y saludables de los productos cárnicos obtenidos

La legislación europea exige que aquellos alimentos a los que se pretende atribuir un beneficio nutricional o saludable cumplan con ciertos requisitos en su composición y se haya demostrado científicamente los beneficios asociados a la presencia de ciertos compuestos bioactivos (Reglamento 1924/2006; Reglamento 116/2010; Reglamento 432/2012). La tabla 1 recoge algunos ejemplos de los productos desarrollados a lo largo del proyecto que son susceptibles de poder incluir declaraciones nutricionales de acuerdo con los dos primeros Reglamentos. Como consecuencia de los beneficios nutricionales logrados, es posible atribuir propiedades saludables relacionadas, ejemplos de las cuales se presentan de una forma sintética en la tabla 2.

### 4. Avances en la evaluación de efectos saludables de productos cárnicos diseñados como potencialmente funcionales

Como es bien sabido, en el desarrollo de alimentos funcionales resulta esencial la necesidad de demostrar de forma satisfactoria el efecto beneficioso relativo a la mejora del estado de salud y bienestar y/o para la reducción de riesgo de enfermedad de los productos reformulados. Tal demostración, que sin duda favorecerá la posibilidad de exhibir declaraciones de propiedades saludables, ha de sustentarse en evidencias científicas sólidas basadas en tres tipos generales de estudios: a) bioquímicos, celulares o en animales; b) observacionales y; c) de intervención en humanos (Ashwell, 2002). En este sentido, en el marco del subproyecto FUNCIOCA se han llevado a cabo tanto actividades centradas en estudios bioquímicos, celulares o de experimentación animal, como aquellos otros de intervención en humanos. A continuación se refieren los aspectos más destacables.

#### 4.1. Estudios de biodisponibilidad/bioaccesibilidad

Diversos estudios se han realizado sobre compuestos bioactivos (luteína, ácido fólico, calcio y licopeno) incorporados en productos cárnicos.

La bioaccesibilidad *in vitro* de luteína fue evaluada en salchichas tipo frankfurt (preparadas con dos niveles de grasa) y enriquecidas con este carotenoide. Los resultados obtenidos indicaron que la luteína en la matriz cárnica era muy estable a la digestión *in vitro*, con una recuperación total de más de 84% al final de la fase duodenal y con baja isomerización. La

Tabla 1. Ejemplos de productos cárnicos desarrollados en el marco de FUNCIOCA susceptibles de incluir declaraciones nutricionales de acuerdo con el Reglamento 1924/2006

|   | Declaraciones  | Referencia                               |
|---|--|--|
| <b>Productos frescos</b>  |  |  |
| Salchichas: Con aceite de lino o pescado preemulsificado como sustituto de tocino (15%) y con antioxidantes   | Alto contenido omega-3<br>Alto contenido proteínas   | Valencia y col. (2008)                   |
| Hamburguesas: Adición de ácido fólico (máx 2.4 mg/100 g)  | Fuente de ácido fólico   | Galán y col. (2010)                      |
| Hamburguesas: Adición de licopeno (máx 7.9 mg/100 g)  | Contiene licopeno  | Selgas y col. (2009a)                    |
| Hamburguesas: Adición de Ca (400 mg/100 g) en forma de citrato-malato y lactato cálcico   | Fuente de calcio   | Soto y col. (2010)                       |
| Producto tipo hamburguesa con algas (Wakame)  | Fuente de magnesio y potasio   | López-López y col. (2010)                |
| <b>Productos cocidos</b>  |  |  |
| Salchichas tipo frankfurt: Mezcla de aceites preemulsificada (oliva+lino+pescado) como sustituto de tocino (100%)   | Alto contenido omega-3, AGM y AGI<br>Alto contenido proteínas  | Delgado Pando y col. (2010)              |
| Mortadela: Adición de ácido fólico (máx 2.4 mg/100 g)   | Fuente de ácido fólico   | Galán y col. (2011a)                     |
| Mortadela: Aceite de lino preemulsificado como sustituto de tocino (25%) y con antioxidantes ( <i>Melissa officinalis</i> )   | Alto contenido omega-3<br>Alto contenido proteínas   | Berasategi y col. (2011b)                |
| Mortadela: Adición de Ca (máx. 400 mg/100 g) en forma de citrato-malato, gluconato y lactato cálcico  | Fuente de calcio   | Soto y col. (2011)                       |
| Paté: Gel de konjac con mezcla de aceites (oliva+lino+pescado) como sustituto de tocino (100%)  | Valor energético reducido<br>Alto contenido proteínas<br>Alto contenido omega-3, AGM y AGI               | Delgado-Pando y col. (2011a)             |
| <b>Productos crudos curados</b>   |  |  |
| Chorizo: Aceite de lino preemulsificado como sustituto de tocino (25%) y con antioxidantes ( <i>Borago officinalis</i> )  | Alto contenido omega-3<br>Alto contenido proteínas   | García Iñiguez de Ciriano y col. (2009)  |
| Chorizo: Mezcla de aceites preemulsificada (lino+alga 3:2) como sustituto de tocino (25%), con sal yodada, levadura de selenio y antioxidantes ( <i>Melissa officinalis</i> ) | Alto contenido omega-3<br>Alto contenido proteínas<br>Alto contenido en yodo y selenio                   | García Iñiguez de Ciriano y col. (2010b) |
| Chorizo: Aceite de lino preemulsificado como sustituto de tocino (25%) , con sal yodada y ascorbato cálcico   | Fuente de omega-3<br>Alto contenido proteínas<br>Alto contenido en calcio<br>Contenido reducido de sodio | García Iñiguez de Ciriano y col. (2013)  |
| Chorizo: Gel de konjac con mezcla de aceites (oliva+lino+pescado) como sustituto de tocino (25-100%)  | Valor energético reducido<br>Alto contenido proteínas<br>Alto contenido omega-3, AGM y AGI               | Jiménez-Colmenero y col. (2013b)         |
| Salchichón: Adición de Ca (máx. 300 mg/100 g) en forma de citrato, gluconato y lactato cálcico.   | Fuente de calcio<br>Contenido reducido de grasa  | Selgas y col. (2009b)                    |
| Salchichón: Adición de ácido fólico (máx 2,4 mg/100 g)  | Fuente de ácido fólico   | Galán y col. (2011a)                     |
| Salchichón con fructooligosacáridos, FOS (máx. 6%)- Reducción de grasa (58%)  | Fuente de fibra<br>Contenido reducido de grasa   | Salazar y col. (2009)                    |
| Salchichón: Adición de licopeno (1,2 mg/100 g)  | Contiene licopeno  | Gámez y col. (2011)                      |

AGM: Ácidos grasos monoinsaturados; AGI: Ácidos grasos insaturados.

| Tabla 2. Ejemplos de declaraciones de propiedades saludables autorizadas para elaborados cárnicos desarrollados en FUNCIOCA con propiedades avaladas por declaración nutricional (Reglamento 432/2012) |  |
|--|--|
| <i>Declaración nutricional</i>   | <i>Declaración saludable</i>   |
| Fuente de ácidos grasos omega-3 ( $\alpha$ -linolénico)  | El ácido linolénico contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo   |
| Fuente de ácidos grasos omega-3 (EPA-DHA)  | Los ácidos EPA y DHA contribuyen al funcionamiento normal del corazón  |
| Mín 40mg DHA/100g y 100kcal  | El ácido DHA contribuye a mantener el funcionamiento normal del cerebro y al mantenimiento de la visión en condiciones normales.   |
| Alto contenido en grasas insaturadas   | La sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo. El ácido oleico es una grasa insaturada.   |
| Alto contenido en grasas insaturadas   | La sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo (los AGM y AGP son grasas insaturadas).   |
| Fuente de calcio   | El calcio contribuye a la coagulación sanguínea normal, al metabolismo energético normal, al funcionamiento normal de los músculos, de la neurotransmisión y de las enzimas digestivas. El calcio contribuye al proceso de división y diferenciación de las células y es necesario para el mantenimiento de los huesos y dientes en condiciones normales.  |
| Fuente de yodo   | El yodo contribuye a la función cognitiva normal, al metabolismo energético normal, al funcionamiento normal del sistema nervioso, al mantenimiento de la piel en condiciones normales, a la producción normal de hormonas tiroideas y a la función tiroidea normal.   |
| Fuente de selenio  | El selenio contribuye al mantenimiento del cabello y uñas en condiciones normales, al funcionamiento normal del sistema inmunitario, a la función tiroidea normal, a la protección de las células frente al daño oxidativo y a la espermatogénesis normal.   |
| Contenido reducido en sodio  | Un menor consumo de sodio contribuye a mantener la tensión arterial normal.  |
| Fuente de folatos  | Los folatos contribuyen al crecimiento de los tejidos maternos durante el embarazo, a la síntesis normal de aminoácidos, a la formación normal de células sanguíneas, al metabolismo normal de la homocisteína, a la función psicológica normal, al funcionamiento normal del sistema inmunitario, al proceso de división celular, al metabolismo energético normal y ayudan a disminuir el cansancio y la fatiga. |
| Fuente de proteínas  | Las proteínas contribuyen a conservar y aumentar la masa muscular, y al mantenimiento de los huesos en condiciones normales  |

micelarización resultó elevada, aunque dependió del contenido de grasa: va desde 29-34% de la cantidad inicialmente presente en salchichas con bajo contenido de grasa, hasta 73-81% con alto contenido de grasa. La conservación (22 días a 4 °C) no afectó significativamente el contenido de luteína o su bioaccesibilidad. Estos resultados demuestran dos aspectos relevantes. Por un lado, la utilidad de los modelos *in vitro* para proporcionar una destacada información sobre la biodisponibilidad de nutrientes funcionales añadidos a nuevas formulaciones de alimentos. Por otra, la idoneidad de los productos cárnicos como portadores de luteína y como un medio para incrementar su ingesta de manera sistemática (Granado-Lorencio y col., 2010).

El estudio de la bioaccesibilidad del AF en los elaborados cárnicos se realizó por procedimientos *in vitro* estáticos (Galán y col., 2012) y dinámicos, en este último caso, en el TNO Quality for Life de Zeist (Holanda) con el grupo del Dr. R. Havenaar; la bioaccesibilidad fue alta en todos los casos, llegando a alcanzar el 100% en los elaborados cárnicos frescos. En productos RTE se observó aumento de la bioaccesibilidad en los productos cocidos y en los madurados, probablemente debido a que la irradiación modifica la estructura de la matriz cárnica, favorece su extracción y deja, en consecuencia, mayor cantidad libre de AF para poder ser absorbido.

En el caso del calcio, la bioaccesibilidad se estudió utilizando células Caco-2. Los estudios se realizaron en los elaborados cárnicos con las concentraciones máximas de las sales cálcicas con las que se habían obtenido los mejores resultados. Los niveles de bioaccesibilidad variaron en función de la matriz cárnica; así, los índices de permeabilidad aparente (Papp) fueron más bajos en los productos madurados (máximo 70%), mientras que la mayor bioaccesibilidad fue observada en los productos frescos, con valores muy próximos a los obtenidos en la leche enriquecida en calcio utilizada como control (aprox. 20%) (Soto y col., 2012).

Se han evaluado mediante métodos *in vitro* estáticos, utilizando membranas de diálisis, la bioaccesibilidad del licopeno en los productos cárnicos reformulados. Los resultados obtenidos mostraron una accesibilidad baja, inferior al 20%. Los mayores valores se observaron también en los productos cárnicos frescos, independientemente del derivado del tomate utilizado. En colaboración con la Dra. Paola Palozza en el Instituto de Patología General de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica del Sacro Cuore de Roma, y empleando cultivos celulares de fibroblastos RAT-1, se ha demostrado que la irradiación es capaz de aumentar la capacidad antioxidante del licopeno presente tanto en los derivados del tomate utilizados, como en las hamburguesas a los que se ha añadido, al inhibir el estrés oxidativo inducido y disminuir de forma significativa la producción intracelular de especies reactivas al oxígeno. Así mismo se observó que la irradiación reduce los niveles de todo-*E*-licopeno y aumenta los de *Z*-licopeno.

#### 4.2. Estudios de experimentación animal

En coordinación con las estrategias de obtención de los derivados cárnicos reformulados con algas y con glucomanano (konjac) descritos en la sección 2, en el marco de FUNCIOCA y con el propósito de avanzar en la evaluación de las propiedades saludables, se han realizado estudios de experimentación animal empleando este tipo de derivados.

En tal sentido se ha analizado el efecto que lleva aparejado la ingesta continuada de reestructurados de cerdo (RC) enriquecidos con distintos tipos de algas en ratas Wistar macho. Tales productos fueron diseñados para mejorar el perfil lipoproteico y el *status* antioxidante por su riqueza en compuestos bioactivos. Con tal fin se han empleado cuatro tipos de algas: Nori (*Porphyra* sp.), Kombu (*Laminaria* sp), Espagueti de mar y Wakame. Los resultados obtenidos han demostrado que el consumo de los reestructurados ofrece protección frente a la enfermedad cardiovascular, aunque los mecanismos implicados varían en función del tipo de alga (Sánchez-Muniz, 2012). Sin embargo, también se ha constatado que estos productos, por su elevado contenido en hierro, producen peroxidación lipídica hepática, oxidación de proteínas hepáticas y daño oxidativo asociado a otros tejidos (Olivero-David y col., 2011). Niveles de inclusión de algas (desecadas) de hasta el 7% no afectan a la aceptabilidad de las dietas. El crecimiento de las ratas (ganancia de peso) en términos generales fue bueno, aunque la dieta conteniendo Kombu

sin colesterol produjo un menor crecimiento, lo que originó un índice de conversión (ganancia de peso/ingesta) también ligeramente menor. La generalización de que cualquier alga es hipocolesterolemia y antioxidante no parece acertada. En tal sentido se ha demostrado que dietas ricas en colesterol inducen hipercolesterolemia, infiltración grasa hepática y peroxidación lipídica en las ratas, efectos que fueron parcialmente controlados con la inclusión en la dieta de productos cárnicos conteniendo algas Nori y Espagueti de mar (Schultz-Moreira y col., 2011 y 2013). También, se ha observado que la presencia del alga Espagueti de mar en los reestructurados bloquea parcialmente el efecto hipercolesterolemico de la dieta y modifica la expresión de enzimas lipogénicas/lipolíticas, reduciendo el efecto atrofico de la hipercolesterolemia en el tejido adiposo de las ratas (Gonzalez-Torres y col., 2012a). El consumo de algas afecta al glutathion total y reducido, a la actividad de la glutathion reductasa, y a la capacidad antioxidante global en el hígado. Moreira y col. (2010) demostraron que la inclusión de Wakame en RC, incluso en dietas enriquecidas con colesterol, mejora la actividad y expresión génica de enzimas antioxidantes. La disminución en el *status* antioxidante de las ratas alimentadas con Kombu se relacionó con el elevado contenido de arsénico de este alga, el cual lleva al incremento compensatorio de la actividad del enzima glutathion reductasa.

Las diferencias en las propiedades hipolipemiantes y antioxidantes de las dietas con RC enriquecidos con distintas algas se atribuyeron a su diferente composición (por ejemplo, fibra dietética soluble o total, minerales, vitaminas, y contenido fitoquímico) (González-Torres y col., 2012a; Moreira y col., 2010). Por otra parte, los resultados obtenidos también sugieren que algunos elementos de la carne (por ejemplo, hierro) pueden interactuar con algunos compuestos de las algas y neutralizar sus efectos (Moreira y col., 2010).

El glucomanano, como fibra dietética, y el alga espirulina (*Spirulina máxima*), se han incorporado en reestructurados cárnicos para su inclusión en dietas para ratas diabéticas obesas con el fin de reducir el exceso de lípidos en la sangre. Dichas dietas fueron bien toleradas y resultaron más efectivas en la pérdida de peso que la control. La asociación de glucomanano y espirulina disminuyó notablemente el efecto hipercolesterolemico de una dieta enriquecida con RC adicionado de colesterol, y normalizó las distintas lipoproteínas, fundamentalmente las LDL (González-Torres y col., 2012b). Los efectos de la adición de un 15% de un producto cárnico con glucomanano y espirulina en la dieta hipercolesterolemica en ratas Fa/Fa, se asocian a una reducción en el hígado del estado inflamatorio y a una activación de la AMPK (proteína quinasa dependiente de AMP). La AMPK regula el metabolismo de los carbohidratos y lípidos y su fosforilación se inhibe en el síndrome metabólico, caracterizado por obesidad, diabetes y dislipidemia. La mejora de la dislipidemia en las ratas hipercolesterolemicas sugiere que el glucomanano tiene beneficios notables en el síndrome metabólico (Benedi y col., 2012). En resumen, la menor resistencia a la insulina producida por la fibra soluble y la espirulina en las dietas hipercolesterolemicas conduce a la activación de la AMPK en el hígado y tejido adiposo, dirigiendo la actividad metabólica hacia el consumo de energía. Con ello contribuye a una menor acumulación lipídica y a un menor estado oxidativo a nivel hepático.

### 4.3. Estudios de intervención en humanos

La fundamentación científica del efecto funcional (declaraciones de salud) debe basarse en estudios metodológicamente correctos realizados sobre seres humanos y de manera especial en estudios experimentales o de intervención (Ashwell, 2002; Aggett y col., 2005). En este contexto se ha realizado un estudio de intervención empleando algunos de los productos cárnicos desarrollados en FUNCIOCA. Concretamente se ha comparado el consumo de salchichas tipo frankfurt y paté reformulados: a) reducidos en grasa (RF) ( $\approx$  15% de grasa); b) reducidos en grasa y enriquecidos con ácidos grasos n-3 (n-3 RF) ( $\approx$  15% de grasa), con c) productos tipo comercial (NF) (contenido en grasa 18% salchichas y 30'8% paté). Sobre tales elaborados, además de establecer su viabilidad tecnológica y sensorial (comentadas en el apartado 2.3), se evaluó el posible efecto funcional de su consumo (durante 4 semanas) en una población diana en riesgo cardiovascular (Delgado-Pando y col., 2013). Para ello se diseñó un estudio de intervención cruzado y

controlado con 22 voluntarios, incorporando como criterio de inclusión dos de los siguientes factores de riesgo de ECV: nivel de colesterol total superior a 200 mg/dl, nivel de LDL-colesterol superior a 110 mg/dl e índice de masa corporal entre 25 y 34,9 kg/m<sup>2</sup>. Las variables principales del estudio fueron parámetros de uso clínico como colesterol total, LDL y HDL colesterol y triglicéridos, y también una medida de la oxidación de las LDL.

Los resultados obtenidos indicaron que el consumo regular de productos cárnicos con reducido contenido en grasa, enriquecidos o no en ácidos grasos n-3, afecta positivamente el perfil de lipoproteínas de los voluntarios, disminuyendo los niveles de LDL colesterol y LDL oxidado, y por lo tanto el riesgo de accidente cardiovascular. En comparación con los efectos de la ingesta de productos con el nivel habitual de grasa (NF), las respuestas que presenta el consumo de elaborados con reducido contenido en grasa enriquecidos o no con PUFA n-3 (n-3 RF y RF) es diferente. Mientras que la ingesta de productos n-3 RF indujo una reducción del LDL colesterol, LDL oxidado y de la relación de colesterol LDL-colesterol/HDL, la ingesta de productos RF modificó sólo el nivel de LDL oxidado. Para verificar que la muestra de sujetos en la que se ha observado el efecto funcional es representativa de la población con riesgo cardiovascular, y poder así generalizar resultados, se deberán realizar adicionales estudios de intervención con este tipo de productos (Delgado-Pando y col., 2013). En todo caso se puede señalar que a través de la estrategia de reformulación planteada, se pueden elaborar productos cárnicos saludables, de contenido graso reducido, estables, con propiedades físico-químicas y organolépticas adecuadas y con un perfil lipídico optimizado de acuerdo a los objetivos nutricionales actuales. La inclusión en la dieta de estos productos cárnicos reformulados da lugar a una disminución de la concentración de LDL-colesterol en sujetos con riesgo cardiovascular elevado.

## 5. Conclusiones

Como consecuencia del trabajo realizado en el marco de FUNCIOCA se ha puesto de manifiesto la viabilidad tecnológica y sensorial de un notable número de elaborados cárnicos (frescos, crudo curados o tratados por el calor) reformulados mediante diversas estrategias tecnológicas. Estas han sido empleadas tanto para reducir la presencia de componentes no deseados (p.e. grasa y sodio), como para favorecer la de aquellos otros con efectos beneficiosos (DHA, EPA, minerales, carotenoides, fibra, ácido fólico, etc.). Otra novedad ha sido la elaboración de productos cárnicos funcionales listos para el consumo. Acompañando al desarrollo tecnológico, los estudios realizados sobre su biodisponibilidad, así como en los ensayos de experimentación animal han demostrado la actividad funcional de varios de los ingredientes bioactivos incorporados en los elaborados cárnicos. De igual modo se ha realizado un estudio de intervención en humanos que ha puesto de manifiesto que la ingesta de este tipo de productos (menor contenido en grasa y perfil lipídico optimizado) dentro de la dieta habitual produce efectos funcionales, ya que mejora los niveles de algunos biomarcadores de riesgo cardiovascular en los consumidores.

Por otro lado, complementariamente se ha ensayado la aplicación de algunas tecnologías nuevas de conservación a los productos reformulados. En tal sentido los electrones acelerados se perfilan como una tecnología útil para la higienización de productos cárnicos funcionales RTE obteniéndose alimentos seguros y sensorialmente aceptables (véase el capítulo VI del subproyecto PROCARTE) con un contenido de los compuestos bioactivos estudiados que los hace adecuados para su inclusión en una dieta “más saludable”.

## Equipos participantes

Los resultados que se recogen en este capítulo derivan de las investigaciones llevadas a cabo en las distintas acciones realizadas por los equipos que han participado en el subproyecto FUNCIOCA que han sido coordinadas por F. Jiménez Colmenero (ICTAN-CSIC), I. Astiasarán (UNAV), M.D. Selgas (UCM), J.A. García Regueiro (IRTA) y J. Bon (UPV).

## Agradecimientos

La investigación que recoge este capítulo ha sido llevada a cabo en el marco del Proyecto Consolider-Ingenio 2010 CARNISENUSA CSD2007-00016, en colaboración con los siguientes proyectos: AGL2005-07204-CO2-02, AGL-2008-04892-C03-01/ALI, AGL2008-01099/ALI, AGL2011-29644-C02-01 (Ministerio de Economía y Competitividad), S-505/AGR-0314 (TEMINYSA) (Comunidad de Madrid) y BSCH-UCM GR58/08 (Gr.º. 920276) (Universidad Complutense).

## 6. Referencias

- Aggett P.J., Antoine J.M., Asp N.G., Bellisle F., Contor L., Cummings J.H., Howlett J., Müller D.J.G., Persin C., Pijls L.T.J., Rechkemmer G., Tuijelaars S., Verhagen H. 2005. PASSCLAIM. Process for the assessment of scientific support for claims on foods. Consensus Criteria. European Journal Nutrition Suppl 1, 44:I/1 – I/30.
- Ashwell, M. 2002. Concepts of functional foods. International Life Science Institute. ILSI Europe Concise Monograph Series. Brussels. Belgium.
- Bastida, S., Sánchez-Muniz, F., Olivero, R., Pérez-Olleros, L., Ruiz-Roso, B., Jiménez-Colmenero, F. 2009. Antioxidant activity of carob fruit extracts in cooked pork meat systems during chilled and frozen storage. Food Chemistry 116, 748-754.
- Benedi, J., González-Torres, L., Vázquez-Velasco, M., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F.J. 2013. Restructured meat enriched in glucomannan increases the pAMPK levels and ameliorates dyslipidemia in Fa/Fa rats. 6<sup>th</sup> European Congress of Pharmacology. EPHAR2012, Granada Spain. P450. [http://bps.conference-services.net/resources/344/3046/pdf/EPHAR2012\\_0412.pdf](http://bps.conference-services.net/resources/344/3046/pdf/EPHAR2012_0412.pdf)
- Berasategi, I., Cuervo, M., Ruiz de las Heras, A., Santiago, S., Martínez, J.A., Astiasarán, I., Ansorena, D. 2011a. The inclusion of functional foods enriched in fibre, calcium, iodine, fat-soluble vitamins and omega-3 fatty acids on a conventional diet improve the nutrient profile according to the Spanish reference intakes. Public Health Nutrition 14, 451-458.
- Berasategi, I., Legarra, S., García-Iñiguez de Ciriano, M., Calvo, M.I., Cavero, R.Y., Navarro-Blasco, I., Ansorena, D., Astiasarán, I. 2011b. High in omega-3 fatty acids bologna-type sausages stabilized with an aqueous-ethanol extract of *Melissa officinalis*. Meat Science 88, 705-711.
- Calvo M.M., García, M.L., Selgas, M.D. 2008. Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel. Meat Science 80, 167-172.
- Campos, S., Berasategi, I., Poyato, C., García-Iñiguez de Ciriano, M., Larequi, E., Astiasarán, I., Ansorena, D. 2011. Effect of antioxidants on thermal stability of oil in water emulsions Rich in unsaturated fatty acids. 9th EURO FED LIPID CONGRESS: Oils, Fats and Lipids for a Healthy and Sustainable World. Rotterdam (Holanda), 19-21 Septiembre.
- Carmona, P., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F., Pintado, T., Herrero, A. M. 2011. Infrared study of structural characteristics of frankfurter formulated with olive oil-in-water emulsion stabilized with casein as pork backfat replacer. Journal Agriculture and Food Chemistry 59, 12998-13003.
- Clariana, M., Gratacós-Curbasí, M., García-Regueiro, J. A., Castellari, M. 2010. Analysis of seven purines and pyrimidines in pork meat products by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1217, 4294-4299.
- Cofrades, S., Antoniou, I., Solas, M. T., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F. 2013. Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems. Food Chemistry 141, 338-346.
- Cofrades, S., López-López, I., Bravo, L., Ruiz-Capillas, C., Bastida, S., Larrea, M. T., Jiménez Colmenero, F. 2010. Nutritional and antioxidant properties of different brown and red spanish edible seaweeds. Food Science and Technology International 16, 361-370.
- Cofrades, S., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Jiménez-Colmenero, F. 2011a. Quality characteristics of low-salt restructured poultry with microbial transglutaminase and seaweed. Meat Science 87, 373-380.
- Cofrades, S., Salcedo, L., Delgado-Pando, G., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. 2011b. Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. Food Chemistry 129, 429-436.
- Delgado-Pando, G., Celada, P., Sánchez-Muniz, F., Jiménez-Colmenero, F., Olmedilla-Alonso, B. 2013. Effects of improved fat content of frankfurters and pâtés on lipid and lipoprotein profile of volunteers at increased cardiovascular risk. A placebo-controlled study. European Journal of Nutrition DOI 10.1007/s00394-013-0502-1.

- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Rodríguez-Salas, L., Jiménez-Colmenero, F. 2011a. A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté. *Meat Science* 88, 241-248.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T. Triki, M., Jiménez-Colmenero, F. 2011b. Low-fat frankfurters formulated with a healthier lipid combination as functional ingredient: Microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation. *Meat Science* 89, 65-71.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. 2010a. Healthier lipid combination as functional ingredient influencing sensory and technological properties of low-fat frankfurters. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 859-870.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T., Jiménez Colmenero, F. 2010b. Healthier lipid combination oil-in-water emulsions prepared with various protein systems. An approach for the development of functional meat product. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 791-801.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Jiménez-Colmenero, F. 2012. Low-fat pork liver pâtés enriched with n-3 PUFA/konjac gel: Dynamic rheological properties and technological behaviour during chilling storage. *Meat Science* 92, 44-52.
- Eim, V., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A., Bon, J. 2013. Optimization of the functional effect of the carrot fibre in a dry fermented sausage (Majorcan sobrassada) using artificial neural networks. *Meat Science* 94, 341-348.
- Encalada, M.A., Hoyos, K.M., Rehecho, S., Berasategi, I., García-Iñiguez de Ciriano, M., Ansorena, D., Astiasarán, I., Navarro-Blasco, I., Caverro, R.Y., Calvo, M.I. 2011. Anti-proliferative effect of *Melissa officinalis* on human colon cancer cell line. *Plant Foods for Human Nutrition* 66, 328-334.
- Fernández-Martín, F. López-López, I., Cofrades, S., Jiménez Colmenero, F. 2009. Influence of adding Sea Spaghetti seaweed and replacing the animal fat with olive oil or a konjac gel on pork meat batter gelation. Potential protein/alginate association. *Meat Science* 83, 209-217.
- Galán, I.; García, M. L.; Selgas, M.D. 2010. Effects of irradiation on hamburgers enriched with folic acid. *Meat Science* 84, 437-443.
- Galán, I., García, M.L., Selgas, M.D. 2011a. Irradiation is useful for manufacturing ready-to-eat cooked meat products enriched with folic acid. *Meat Science* 87, 330-335.
- Galán, I., García, M.L., Selgas, M.D. 2011b. Effects of ionising irradiation on quality and sensory attributes of ready-to-eat dry fermented sausages enriched with folic acid. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 469-477.
- Galán, I., García, M.L., Selgas, M.D. 2012. Bioaccessibility of folic acid from ready-to-eat meat products using an *in vitro* static method. *Fleischwirtschaft International*, 2, 54-56.
- Galán, I., García, M.L. Selgas, M.D. 2013. Effect of the storage time on the folic acid added to ready-to-eat meat products manufactured by irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.11.004>.
- Gámez, C., Calvo, M.M., García, M.L., Selgas, M.D. 2011. Tomato powder as source of lycopene and fiber in meat products. *Italian Journal Food Science Technology* 23, 260-269.
- García, M.L., Calvo, M.M., Selgas, M.D. 2009. Beef hamburgers enriched in lycopene using dry tomato peel as an ingredient. *Meat Science* 83, 45-49.
- García Iñiguez de Ciriano, M., Berasategi, I., Navarro-Blasco, I., Astiasarán, I., Ansorena, D. 2013. Reduction of sodium and increment of calcium and  $\omega$ -3 PUFA in dry fermented sausages: effects on the mineral content, lipid profile and sensory quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 876-881.
- García Iñiguez de Ciriano, M., García-Herreros, C., Larequi, E., Valencia, I., Ansorena D, Astiasarán, I. 2009. Use of natural antioxidants from lyophilized water extracts of *Borago officinalis* in dry fermented sausages enriched in  $\omega$ -3 PUFA. *Meat Science* 83, 271-277.
- García-Iñiguez de Ciriano, M., Larequi, E., Berasategi, I., Calvo, M.I., Caverro, R.Y., Navarro-Blasco, I., Astiasarán, I., Ansorena, D. 2012. A lyophilized water extract of *Melissa officinalis* L. as an effective natural antioxidant during the storage of dry fermented sausages high in  $\alpha$ -linolenic acid and DHA. *Journal of Food Science and Engineering* 2, 56-63.
- García Iñiguez de Ciriano, M., Rehecho, S., Calvo, M.I., Caverro, R.Y., Navarro, I., Astiasarán, I., Ansorena, D. 2010a. Effect of lyophilized water extracts of *Melissa officinalis* on the stability of algae and linseed oil-in-water emulsion to be used as a functional ingredient in meat products. *Meat Science* 85, 373-377.

- García Iñiguez de Ciriano, M., Larequi, E., Rehecho, S., Calvo, M.I., Cavero, R.Y., Navarro, I., Astiasarán, I., Ansorena, D. 2010b. Selenium, iodine,  $\omega$ -3 PUFA and natural antioxidant from *Melissa officinalis* L.: a combination of components for healthier dry fermented sausages formulation. *Meat Science* 85, 274-279.
- González-Torres, L., Churrua, I., Schultz Moreira, A.R., Bastida, S., Benedí, J., Portillo, M.P., Sánchez-Muniz, F.J. 2012a. Effects of restructured pork containing *Himantalia elongata* on adipose tissue lipogenic and lipolytic enzyme expression of normo- and hypercholesterolemic rats. *Journal of Nutrigenet and Nutrigenomics* 5, 158-167.
- González-Torres, L., Vázquez-Velasco, M., Matos, C., Sánchez-Muniz, F.J., Benedí, J. 2012b. Liver damage of Fa/Fa rats fed with restructured pork enriched with glucomannan and spirulin. 11° ENCONTRO DE QUÍMICA DOS ALIMENTOS. QUALIDADE DOS ALIMENTOS: NOVOS DESAFIOS. Poster CP1173, 2012. Libro de resúmenes ISBN 978-972-745-132-6. Braganza, Portugal.
- Granado-Lorencio, F., López-López, I., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Cofrades, S., Pérez-Sacristán, B., Delgado-Pando, G., Jiménez-Colmenero, F. (2010). Lutein-enriched frankfurter-type products: Physicochemical characteristics and lutein *in vitro* bioaccessibility. *Food Chemistry* 120, 741-748.
- Herrero, A., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. 2011a. Olive oil-in-water emulsions stabilized with caseinate: elucidation of protein-lipid interactions by infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids* 25, 12-18.
- Herrero, A.M., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. 2011b. Infrared spectroscopic analysis of structural features and interactions in olive oil-in water emulsions stabilized with soy protein. *Food Research International* 44, 360-366.
- Herrero, A.M., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. 2012. Lipid and protein structure analysis of frankfurters formulated with olive oil in water emulsion as animal fat replacer. *Food Chemistry* 135, 133-139.
- Jiménez-Colmenero, F. 2013. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International* 52, 64-74.
- Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., Herrero, A., Fernández-Martin, F., Rodríguez, L., Ruiz-Capillas, C. 2012a. Konjac gel fat analogue for use in meat products: Comparison with pork fats. *Food Hydrocolloids* 26, 63-72.
- Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., Herrero, A., Solas, M.T., Ruiz-Capillas, C. 2013a. Konjac gel for use as potential fat analogue for healthier meat product development: Effect of chilled and frozen storage. *Food Hydrocolloids* 30, 351-357.
- Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Pintado, T., Solas M.T. 2010a. Technological and sensory characteristics of reduced/low-fat, low-salt frankfurters as affected by the addition of konjac and seaweed. *Meat Science* 84, 356-363.
- Jiménez Colmenero, F., Herrero, A., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C. 2012b. Meat and functional foods. En Y. H. Hui (Ed.). *Handbook of Meat and Meat Processing*. (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press. Taylor & Francis Group, pp. 225-248.
- Jiménez-Colmenero, F., Herrero, A., Pintado, T., Solas, M.T., Ruiz-Capillas, C. 2010b. Influence of emulsified olive oil stabilizing system used for pork backfat replacement in frankfurters. *Food Research International* 43, 2068-2076.
- Jiménez-Colmenero, F., Triki, M., Herrero, A. M., Rodríguez-Salas, L., Ruiz-Capillas, C. 2013b. Healthy oil combination stabilized in a konjac matrix as pork fat replacement in low-fat, PUFA-enriched, dry fermented sausages. *LWT- Food Science and Technology* 51, 158-163.
- López-López, I., Bastida, S., Ruiz-Capillas, C., Bravo, L., Larrea, M.T., Sánchez-Muniz, F., Cofrades, S., Jiménez-Colmenero, F. 2009a. Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Science* 83, 492-498.
- López-López, I., Cofrades, S., Cañeque, V., Díaz, M. T., López, O., Jiménez-Colmenero, F. 2011. Effect of cooking on the chemical composition of low-salt, low-fat wakame/olive oil added beef patties with special reference to fatty acid content. *Meat Science* 89, 27-34.
- López-López, I., Cofrades, S. y Jiménez-Colmenero, F. 2009b. Low-fat frankfurters enriched with n - 3 PUFA and edible seaweed: effects of olive oil and chilling storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics. *Meat Science* 83, 148-154.
- López-López, I., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. 2009c. Design and nutritional properties of potential functional frankfurters based on lipid formulation, added seaweed and low salt content. *Meat Science* 83, 255-262.

- López-López, I., Cofrades, S., Solas, M.T., Jiménez Colmenero, F. 2010. Frozen storage characteristics of low-salt and reduced-fat beef patties as affected by Wakame addition and replacing pork backfat with olive oil-in-water emulsion. *Food Research International* 43, 1244-1254.
- Moreira, A.S., González-Torres, L., Olivero-David, R., Bastida, S., Benedi, J., Sánchez-Muniz, F.J. 2010. Wakame and Nori in restructured meats included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in Wistar rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 65, 290-298.
- Olivero-David, R., Schultz-Moreira, A., Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., Bastida, S., Benedi, J., Sanchez-Reus, M.I., González-Muñoz, M.J., Sánchez-Muniz, F.J. (2011). Effects of Nori- and Wakame-enriched meats with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing Wistar rats. *British Journal of Nutrition* 106, 1476-1486.
- Poyato, C., Astiasarán, I., Ansorena, D. 2012. Estabilidad de emulsiones W/O/W reducidas en grasa como vehículo de compuestos bioactivos. CESIA, Ciudad Real, 7-9 Noviembre 2012. Libro de resúmenes, pp 162.
- Poyato, C., Navarro-Blasco, I., Calvo, M.I., Cavero, R.Y., Astiasarán, I., Ansorena, D. 2013. Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: Effect of lipid composition and antioxidant polarity. *Food Research International* 51, 132-140.
- Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. DO L 404, 30.12.2006.
- Reglamento (UE) nº 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. DO L 136, 25.5.2012.
- Reglamento (CE) nº 116/2010 de la Comisión de 9 de febrero de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales. DO L 37, 10.2.2010.
- Rehecho, S., Hidalgo, O., García-Iñiguez de Ciriano, M., Navarro, I., Astiasarán, I., Ansorena, D., Cavero, R.Y., Calvo, M.I. 2011. Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L extracts. *LWT-Food Science and Technology* 44, 875-882.
- Rodríguez, J., Clemente, G., Sanjuán, N., Bon, J. 2012. Modeling drying kinetics of thyme (*Thymus vulgaris*): theoretical and empirical models, and neural networks. *Food Science and Technology International* DOI: 10.1177/1082013212469614.
- Rodríguez, J., Ortuño, C., Benedito, J., Bon J. 2013. Optimization of the antioxidant capacity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extracts: Management of the drying process. *Industrial Crops and Products* 46, 258-263.
- Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Herrero, A., Jiménez-Colmenero, F. 2012a. Biogenic amines in low- and reduced-fat dry fermented sausages formulated with konjac gel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 9242-9248.
- Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Herrero, A.M., Rodríguez-Salas, L., Jiménez-Colmenero, F. 2012b. Konjac gel as pork backfat replacer in dry fermented sausages: Processing and quality characteristics. *Meat Science* 92, 144-150.
- Salazar, M.P., García, M.L., Selgas, M.D. 2009. Short-chain fructooligosaccharides as potential functional ingredient in dry fermented sausages with different fat levels. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 1100, 1107.
- Salcedo-Sandoval, L., Cofrades, S., Ruiz-Capillas Pérez, C., Solas, M.T. Jiménez-Colmenero, F. 2013. Healthier oils stabilized in konjac matrix as fat replacers in n-3 PUFA enriched frankfurters. *Meat Science* 93, 757-766.
- Sánchez-Muniz, F.J. 2012. Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutrición Hospitalaria* 27, 31-45
- Sánchez-Muniz, F.J., Olivero-David, R., Medhi, T., Salcedo, L., González-Muñoz, M. J., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F., Benedi, J. 2012. Antioxidant activity of *Hypericum perforatum* L. extract in enriched n-3 PUFA pork meat systems during chilled storage. *Food Research International* 48, 909-915.
- Schultz-Moreira, A.R., Benedi, J., Gonzalez-Torres, L., Olivero-David, R., Bastida, S., Sánchez-Reus, M.I., González-Muñoz, M.J., Sánchez-Muniz, F.J. 2011. Effects of diet enriched with restructured meats, containing *Himantalia elongata*, on hypercholesterolaemic induction, CYP7A1 expression and antioxidant enzyme activity and expression in growing rats. *Food Chemistry* 129, 1623-1630.

- Schultz-Moreira, A.R., García-Fernández, R.A., Bocanegra, A., Teresa Méndez, M., Bastida, S., Benedí, J., Sánchez-Reus, M.I., Sánchez-Muniz, F.J. 2013. Effects of seaweed-restructured pork diets enriched or not with cholesterol on rat cholesterolaemia and liver damage. *Food and Chemical Toxicology* 56, 223-230.
- Selgas, M.D., García, M.L., Calvo, M.M. 2009a. Effect of irradiation and storage on physico-chemical and sensory properties of hamburguers enriched with lycopene. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 1983-1989.
- Selgas, M. D., Salazar, P., García, M.L. 2009b. Usefulness of calcium lactate, citrate and gluconate for calcium enrichment of dry fermented sausages. *Meat Science* 82, 478-480.
- Soto, A.M., Galán, I., Gámez, M.C., García, M.L., Selgas, M.D. 2010. Sensory properties of fresh meat products enriched with calcium. *Proceeding of the Fourth European Conference on Sensory and Consumer Research*. 5-8 September, P1.039. Pp. 1. Vitoria-Gasteiz, España.
- Soto, A.M., Galán, I., Gámez, M.C., García, M.L., Selgas, M.D. 2011. Cooked meat products enriched with calcium. *Proceedings 57th ICoMST International Congress of Meat Science and Technology*. 7-12 August Com. P396. Pp. 1-4. Gante. Bélgica. ISBN 978 90 798 92 013.
- Soto, A.M., Morales, P., Haza, A., García, M.L., Selgas, M.D. 2012. Bioaccesibilidad del calcio incorporado a productos cárnicos cocidos. VIII Congreso Español de Ingeniería de Alimentos CESIA 2012. Ref. BIO-P15. Ciudad Real, 7-9 Noviembre. Pp. 170. ISBN: 978-84-695-4196-8.
- Triki, M., Herrero, A.M., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. 2013a. Effect of preformed konjac gels, with and without olive oil, on the technological attributes and storage stability of merguez sausage. *Meat Science* 93, 351-360.
- Triki, M., Herrero, A.M., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. 2013b. Storage stability of low-fat sodium reduced fresh merguez sausage prepared with olive oil in konjac gel matrix. *Meat Science* 94, 438-446.
- Triki, M., Herrero, A.M., Rodríguez-Salas, L., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. 2013c. Chilled storage characteristics of low-fat, n-3 PUFA-enriched dry fermented sausage reformulated with a healthy oil combination stabilized in a konjac matrix. *Food Control* 31, 158-165.
- Valencia, I., O'Grady, M., Ansorena, D., Astiasarán, I., Kerry, J.P. 2008. Enhancement of the nutritional status and quality of fresh pork sausages following the addition of linseed oil, fish oil and natural antioxidants. *Meat Science* 80, 1046-1054.



## CAPITULO V

# Implicaciones de la reducción de los niveles de uso de nitratos y nitritos en la seguridad, conservación, características sensoriales y modificaciones tecnológicas de los productos cárnicos crudos-curados

---

*Jacint Arnau, M. Dolors Guàrdia y Marta Gratacós*

---

*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Monells*

---

*Manuela Fernández y Eva Hierro*

---

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria (UCM). Madrid*

---

*Pedro Roncalés*

---

*Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza (UNIZAR). Zaragoza*

---

*José Carballo*

---

*Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC). Madrid*

---

*Beatriz Villegas*

---

*Asociación de Investigación de la Industria Agroalimentaria (AINIA). Valencia*

---

*Jorge Ruiz*

---

*Universidad de Extremadura (UEX). Cáceres*

---

*Neus Sanjuan*

---

*Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Valencia*

---

### 1. Introducción

Los nitritos se han añadido tradicionalmente a los productos cárnicos para inhibir el crecimiento de los microorganismos alterantes y los patógenos que potencialmente puedan alcanzar al producto, conferir y estabilizar el color del curado, ejercer una acción antioxidante y contribuir al desarrollo de su flavor típico. El nitrato por sí solo carece de estas propiedades y su efecto depende de su reducción a nitrito. La acción antimicrobiana es, sin duda, una de las funciones más destacables ya que afecta a la seguridad alimentaria y, por tanto, a la salud del consumidor. La carne supone un sustrato ideal para el crecimiento de una gran diversidad de microorganismos y, por ello, los productos cárnicos han requerido del uso de métodos eficaces para su conservación. Algunos de estos métodos se basan en la acción conjunta de diferentes obstáculos. Así por ejemplo en los embutidos crudos-curados se produce la acción combinada de la disminución del pH, disminución de la actividad de agua ( $a_w$ ) y la adición de nitrificantes.

Cuando se añade nitrito a la carne, se producen reacciones con varios de sus componentes. El destino final del nitrito responde, según Cassens (1990), a la siguiente situación: nitrito residual (5-20%), reacción con la mioglobina (5-15%), transformación a nitrato (1-10%), disipación en forma de gas (1-5%) y productos derivados de su interacción con grupos sulfhidrilo (5-15%), con lípidos (1-5%) y con proteínas (20-30%). Esto implica que el nitrito total disminuye a lo largo de las etapas de procesado, conservación, preparación y consumo, en función de diversos factores relacionados con el tipo de producto y las condiciones de cada etapa. Por ello, la determinación del nitrito residual como parámetro para evaluar la cantidad de nitrito adicionado se ha considerado de utilidad limitada. Entre los distintos métodos analíticos disponibles para la determinación de nitratos y nitritos en carne, el análisis por inyección de flujo (FIA) es una importante alternativa a los métodos de control tradicionales tanto en laboratorios de análisis rutinarios, como en los de la administración y la industria, ya que este sistema presenta importantes ventajas, permitiendo una determinación precisa, simple y rápida de pequeñas cantidades de nitratos y nitritos con bajo consumo de reactivos y empleo de pequeños volúmenes de muestras (Ruiz-Capillas y Jiménez-Colmenero, 2008a y 2008b). Sin embargo, conocer el efecto de la reducción de los niveles de nitrito añadido es de gran interés no sólo por su importancia en la estabilidad de los productos (color, oxidación de lípidos, seguridad, etc.), sino también por su implicación en la salud de los consumidores. El nitrito que permanece en la matriz cárnica a lo largo del proceso de maduración sirve como reservorio de óxido nítrico con acción continuada en la estabilización de los pigmentos del color, pero también puede permitir la producción de nitrosaminas. Todo ello implica una acción directa de los nitrificantes sobre la seguridad abiótica de los productos cárnicos. Por otra parte, en las últimas décadas se ha descubierto en el ámbito de las ciencias biomédicas que el óxido nítrico obtenido a partir de la reducción del nitrito tiene importantes beneficios terapéuticos. Así, por ejemplo, puede prevenir, entre otros, varios tipos de problemas cardiovasculares (Sindelar y Milkowski, 2011). Por tanto, puede que haya que considerar a los nitratos como compuestos con efectos diversos, unos nocivos derivados de la formación de nitrosaminas, algunos necesarios como aditivos tecnológicos y, otros, recomendables como micronutrientes esenciales, por lo que no parece descabellado pensar que en un futuro próximo se considere esta última propiedad de los nitratos como deseable para la salud (Lundberg y col., 2011).

Además de la transformación de nitrato a nitrito, de nitrito a óxido nítrico y subsiguientes reacciones, las conversiones que los nitratos y/o nitritos experimentan en el proceso de elaboración de una pieza entera como el jamón curado son, si cabe, más complejas, pues dependen de la velocidad de difusión desde la superficie al interior (Arнау y col., 1995; Arнау y col., 2003; Gómez Salazar, 2013).

Actualmente, existe una importante presión por parte de las autoridades sanitarias de revisar los niveles de nitratos y nitritos autorizados en productos cárnicos. Por tanto, es posible que las cantidades de nitritos y nitratos autorizados se reduzcan en un futuro próximo. Por ello, el sector cárnico debe estar preparado para afrontar el posible cambio normativo garantizando en todo momento la seguridad de los productos cárnicos para proteger la salud de los consumidores. En estos fundamentos tiene su origen el subproyecto NITRARED que tiene dos objetivos principales: a) valorar el efecto de la reducción de la cantidad de nitritos y nitratos añadidos en la calidad sensorial, en la vida útil y en la seguridad de dos productos fermentados (salchichón extra y chorizo vela) y dos productos madurados (fuet extra y jamón curado) y b) optimizar las condiciones de nitrificación, según los resultados obtenidos, para mejorar la seguridad y las características sensoriales de los productos cárnicos crudos-curados.

Este capítulo tiene como objetivo fundamental exponer los resultados, de interés práctico para la industria cárnica, relacionados con la adición de nitrificantes a los productos cárnicos que se han obtenido en el subproyecto NITRARED. Se expone de forma resumida la actividad antimicrobiana de los nitrificantes, su efecto en los atributos sensoriales, en la seguridad abiótica, en los compuestos nutricionales y en la estabilidad oxidativa. Finalmente se discuten los factores que afectan a la heterogeneidad del contenido de nitrificantes, especialmente en jamón curado.

## 2. Actividad antimicrobiana del nitrato y nitrito

Como ya se ha indicado anteriormente, el nitrito ejerce una importante función en la seguridad microbiológica de los productos curados, destacando la inhibición del crecimiento de *Clostridium botulinum* y *Salmonella* spp. Sin embargo, el nitrato por sí sólo carece de actividad antimicrobiana y su contribución a la seguridad depende de su reducción a nitrito, lo cual tiene lugar durante la maduración.

No obstante, la estabilidad y seguridad de los productos cárnicos crudos-curados, desde el punto de vista microbiológico, no sólo se debe a la acción de los nitratos y nitritos, sino que es el resultado de la combinación de los obstáculos que se establecen consecutivamente durante el proceso de elaboración, como son el potencial redox, la actividad de los cultivos iniciadores, el pH y la  $a_w$  (Leistner, 1992). Cualquier variación en estos factores podría traducirse en importantes cambios microbiológicos en el producto, lo que supondría la necesidad de establecer modificaciones tecnológicas para garantizar la seguridad de estos alimentos. En particular, en los productos cárnicos crudos-curados, la adición de nitratos y nitritos, junto a la del cloruro sódico, es crítica en las fases iniciales del proceso cuando aún no se han establecido los demás obstáculos.

En los estudios que se han realizado en jamón curado en el marco del subproyecto NITRA-RED se ha observado que la adición de nitrificantes influye de forma notable en la concentración de aerobios mesófilos totales y *Staphylococcus* spp. (Fernández y col., 2011). En las experiencias realizadas en este subproyecto no se detectaron enterobacterias en el producto final, independientemente del tipo o la concentración de nitrificantes utilizada, ni tampoco se observó influencia de estos compuestos en los recuentos de mohos y levaduras en el interior del jamón.

Cuando no se emplearon nitrificantes y el pH inicial medido en el músculo *Semimembranosus* ( $pH_{SM}$ ) del pernil fue inferior a 5,5, los recuentos de aerobios mesófilos totales en el producto final fueron 2-4 log ufc/g más elevados que cuando se añadieron por frotación superficial 600 mg/kg de  $KNO_3$  y 800 mg/kg de  $NaNO_2$  en el presalado previo al apilado. Esta diferencia fue menor cuando el  $pH_{SM}$  fue de 5,5-6,0 (hasta 2 log ufc/g) y no se observó diferencia a valores de  $pH_{SM}$  superiores a 6,0 (Hospital y col., 2011).

También se han realizado investigaciones en jamón curado comparando la utilización de una mezcla de nitrato y nitrito a 150 mg/kg o 600 mg/kg de cada uno con la adición de sólo nitrato a 150 ó 600 mg/kg de  $KNO_3$ , los recuentos de aerobios mesófilos totales y *Staphylococcus* spp. fueron 0,5-2 log ufc/g menores (dependiendo del punto de muestreo y del grupo microbiano) en los jamones a los que se incorporaron las mezclas. Por otra parte, la concentración final de estos mismos grupos bacterianos fue del orden de 0,5-1 log ufc/g inferior en los lotes con 600 mg/kg, tanto de nitrato sólo como de la combinación de nitrato y nitrito, respecto a los lotes con 150 mg/kg. La incorporación de 500 mg/kg de ascorbato sódico a jamones elaborados con 600 mg/kg de  $KNO_3$  y 600 mg/kg de  $NaNO_2$  dio recuentos de aerobios mesófilos totales y *Staphylococcus* spp. similares a los jamones sin ascorbato sódico.

Por otra parte, en los estudios llevados a cabo en embutidos crudos-curados la adición de  $KNO_3$  y  $NaNO_2$  no tuvo efecto en los recuentos de aerobios mesófilos totales ni en los de bacterias lácticas. Sí que se observaron diferencias en los recuentos de cocos Grampositivos catalasa-positivos, cuya concentración final fue 1-2 log ufc/g inferior en los lotes con 150 mg/kg nitrato + 150 mg/kg nitrito y en los lotes elaborados con una reducción de nitrificantes al 75% en comparación con embutidos elaborados sin nitrificantes o con una reducción al 50% de los mismos.

Los resultados obtenidos también evidencian la importancia de una adecuada concentración de nitrificantes en la masa para controlar la población de enterobacterias de los embutidos. En salchichón, sólo en los lotes con el máximo añadido permitido por el Reglamento 1333/2008 (150 mg/kg nitrato + 150 mg/kg nitrito) no se detectaron estos microorganismos en el producto final. Empleando cantidades inferiores, los niveles finales de enterobacterias fueron de 1-2 log ufc/g, apreciándose en los lotes sin nitrificantes y con una reducción del 50% un incremento

durante la fase fermentativa. En el fuet, la reducción de la cantidad de nitrificantes dio lugar a recuentos de enterobacterias superiores, en torno a 1 (reducción al 75% de la cantidad máxima permitida), 2 (reducción al 50%) y 3 log ufc/g (sin nitrificantes) más que en los productos elaborados con el nivel máximo autorizado por la legislación.

Durante el desarrollo del subproyecto NITRARED también se han realizado ensayos de inoculación de embutidos con *Listeria innocua* (como subrogado de *Listeria monocytogenes*). En ausencia de sales nitrificantes, *Listeria* se multiplicó durante la fase fermentativa, lo que motivó que los recuentos finales fueran similares a los iniciales. En presencia de nitrificantes se observó una inhibición ya desde las primeras etapas del proceso de maduración, cuya dependencia de la concentración de nitratos y nitritos se hizo evidente a partir de la primera semana. Los recuentos finales fueron aproximadamente 1,5 log ufc/g mayores en los lotes con reducción de nitrificantes al 75 y 50% respecto del lote con el máximo permitido (Hospital y col., 2012).

### 3. Efecto del nitrato y nitrito en los atributos sensoriales

#### 3.1. Efecto sobre el aroma

El desarrollo del aroma en los productos cárnicos curados es muy complejo debido al gran número de reacciones implicadas. Los compuestos responsables del aroma surgen como consecuencia de fenómenos microbiológicos (fermentativos, esterificaciones y acciones sobre lípidos, proteínas, péptidos y aminoácidos), reacciones químicas (oxidación lipídica, reacción de Maillard y degradación vía Strecker de aminoácidos) y enzimáticas de origen endógeno (proteólisis y lipólisis), sin olvidar a los componentes aportados por la propia carne, ingredientes, aditivos, especias o ahumado (Ordóñez y col., 1999) y la interacción conjunta de los mismos. La adición de nitratos y/o nitritos afecta a la lipólisis y a las reacciones de degradación de aminoácidos, al crecimiento de determinados microorganismos y a la oxidación de distintos componentes de la carne. Además, evita la aparición de aromas no deseados relacionados con la degradación del producto. Sin embargo, la reducción de nitratos y nitritos a un 50% de la concentración máxima permitida no parece que afecte a las características sensoriales de embutidos crudos-curados como fuet, salchichón y chorizo (Lorente y col., 2011a y 2011b).

El perfil de compuestos volátiles de los salchichones estudiados en el subproyecto NITRARED mostró que el grupo mayoritario fue el procedente de la fermentación de los carbohidratos. Dicho perfil fue similar en todos los salchichones elaborados con nitratos y nitritos, independientemente de la concentración utilizada. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el lote preparado sin nitrificantes. Este lote se caracterizó por presentar, además de un mayor contenido de compuestos procedentes de la fermentación de carbohidratos, niveles más altos de volátiles derivados de la oxidación lipídica y de la degradación de aminoácidos que los lotes elaborados con nitrificantes. En fuet las muestras control elaboradas sin nitrificantes también presentaron niveles superiores de volátiles, concretamente aquellos derivados de la oxidación lipídica (Hierro y col., 2011).

En jamón, la reducción de la cantidad añadida de nitratos y nitritos de 600 mg/kg a 150 mg/kg disminuyó significativamente la intensidad del flavor a curado en los jamones de corta curación. En los jamones de larga curación, el efecto se detectó en la intensidad global de flavor. En ambos casos, el efecto fue significativo aunque se considera poco importante en términos sensoriales (Lorente y col., 2012). La adición de ascorbato en jamones de larga curación elaborados con 600 mg/kg de nitratos y nitritos dio lugar a un descenso de la intensidad de flavor global aunque de escasa importancia. En general, los resultados obtenidos sugieren que la reducción de nitrificantes en jamón de corta y larga curación resultaría viable desde el punto de vista sensorial (Lorente y col., 2012).

### 3.2. Efecto sobre el color

Los consumidores utilizan el color como uno de los parámetros para evaluar la calidad y el buen estado de conservación de los alimentos y, en definitiva, para tomar la decisión de compra, lo cual acentúa la importancia de conseguir y mantener un color atractivo para los mismos.

Los agentes nitrificantes son responsables de la formación del pigmento nitrosil-mioglobina que contribuye al color rojizo característico de los productos cárnicos curados. En los productos cocidos el pigmento nitrosil-mioglobina se transforma durante el tratamiento térmico en nitrosil-miocromógeno de color rosa.

En las experiencias realizadas en el marco del subproyecto NITRARED en jamón curado, tanto de corta como larga curación, el índice de curado ( $I_{\text{curado}} = I_{\text{nitrificación}} - I_{\text{decoloración}}$ ) demostró que la utilización de nitrificantes, bien a 600 mg/kg de nitrato y a 600 mg/kg de nitrato + 600 mg/kg de nitrito o bien a 150 mg/kg de nitrato y 150 mg/kg de nitrato + 150 mg/kg de nitrito, dio lugar a un color aceptable en todos los casos, a pesar de que se detectaron diferencias significativas entre lotes.

A nivel sensorial, para jamón de corta curación se observaron diferencias entre aquellos elaborados con 600 mg/kg de nitrato y 600 mg/kg de nitrato y nitrito, siendo la intensidad de color mayor en jamón con nitrato y nitrito añadidos. Para jamón de larga curación, a las concentraciones estudiadas no se observaron diferencias significativas (Lorente y col., 2011a).

La adición de ascorbato de sodio mejoró ligeramente el color de curado. Por otra parte, los jamones sin nitrificantes añadidos presentaron un índice de curado muy inferior. Sin embargo, en la evaluación sensorial del color no se detectaron diferencias significativas. Ello fue debido a que en ausencia de nitrificantes, se forma lentamente Zn-protoporfirina (ZnPP), que posee un color similar al de la nitrosil-mioglobina, como se demostró en el estudio de Wakamatsu y col. (2004). Estos resultados sugieren la posibilidad de la no utilización de nitrificantes como aditivos para la obtención de un color de curado apropiado, siempre que esté garantizada la seguridad alimentaria mediante el establecimiento de obstáculos apropiados durante el procesado. Si bien la Zn-protoporfirina es el pigmento mayoritario en jamones sin nitratos y nitritos añadidos, se observó también su presencia en el interior de jamones con  $\text{pH}_{\text{SM}} < 5,5$  y nitrificados por frotado superficial mediante 600 mg/kg de nitrato y 800 mg/Kg de nitrito por kg de jamón fresco. Sin embargo, no se observó cuando el  $\text{pH}_{\text{SM}} > 6,0$  (Roncales y col., 2011). La presencia de ZnPP se puede relacionar con la aparición de halos de nitrificación (Figuras 1a y 1b). Serra y col. (resultados no publicados) fruto de un estudio reciente obtuvieron un 38% de jamones con halos. La incidencia de halos fue de un 66% en los jamones con un  $\text{pH}_{\text{SM}} < 5,6$  y del 10% en los de  $\text{pH}_{\text{SM}} \geq 5,6$ . En los jamones sin nitrificantes añadidos la presencia de pequeñas cantidades de nitrificantes (p.e. agua de lavado) puede generar una ligera nitrificación de la zona cercana a la superficie del producto (Figura 2).



Figura 1 a/b. Halos de nitrificación



**Figura 2.** Halo externo producido por adición de pequeñas cantidades de nitrificantes

En los jamones y paletas, en ocasiones se produce una oxidación del pigmento responsable del color en la zona situada debajo de los huesos superficiales (coxal y escápula) debido a la combinación de una deficiente nitrificación y un ambiente microaerófilo (Figuras 3 y 4). Para evitarlo, debe asegurarse que se aplican nitrificantes sobre el hueso y que éste tiene suficiente humedad para absorberlos (Arнау, 2007).



**Figura 3.** Nitrificación deficiente del magro de paleta adyacente al hueso



**Figura 4.** Nitrificación deficiente del magro de jamón adyacente al hueso

En jamón curado se observó un aumento entre el post-salado y el final de proceso de los pigmentos totales (PT), los nitroso-hemo-pigmentos (NHP) y el porcentaje de conversión (NHP/PT). La intensidad de nitrosación (NHP/PT) fue mayor cuando se añadieron cantidades de nitrificantes elevadas (600 mg/kg de nitrato; 600 mg/kg de nitrato+600 mg/kg de nitrito; 600 mg/kg de nitrato+600 mg/kg de nitrito+500 mg/kg ascorbato) que cuando fueron bajas (150 mg/kg de nitrato; 150 mg/kg de nitrato+150 mg/kg de nitrito), sin que se observaran diferencias entre que fueran nitratos o nitritos (Carballo y Andrade, 2011).

Por lo que se refiere a la evolución del color a lo largo de la conservación, las lonchas envasadas al vacío y mantenidas a 4 °C conservaron un color adecuado durante 6 meses siempre que se mantuvieran en oscuridad. La presencia de luz dio lugar a una decoloración significativa (Figura 5), que fue mayor en las muestras con menor cantidad de nitrato o nitrito.

En el caso de los embutidos (salchichón, fuet y chorizo), la presencia de nitrato y/o nitrito (cantidad máxima, 25 y 50% de reducción) dio lugar a un índice de curado satisfactorio, con pequeñas diferencias dependientes de la concentración. La no adición de nitrificantes dio lugar a un bajo índice de curado, que se relaciona con un color no adecuado. Así pues, en embutidos crudos-curados resulta indispensable utilizar nitrificantes para obtener el color propio de los mismos (Lores y col., 2011).



Figura 5. Decoloración de loncha de jamón sometida a iluminación

En cuanto a la evolución del color a lo largo de la conservación, el embutido entero envasado en un material macroporoso permitió mantener el color durante 2 meses, incluso a temperatura ambiente. Lo mismo puede decirse de las lonchas envasadas al vacío y mantenidas a 4 °C en oscuridad, que sólo mostraron una ligera decoloración. Por el contrario, las lonchas de embutido sometidas a iluminación sufrieron una decoloración significativa a los dos meses de conservación.

En los embutidos crudos-curados debe evitarse el embarrado de la pasta, ya que afecta negativamente al color típico del curado y al de algunos colorantes (Figuras 6a y 6b). Por otra parte, cuando se añaden

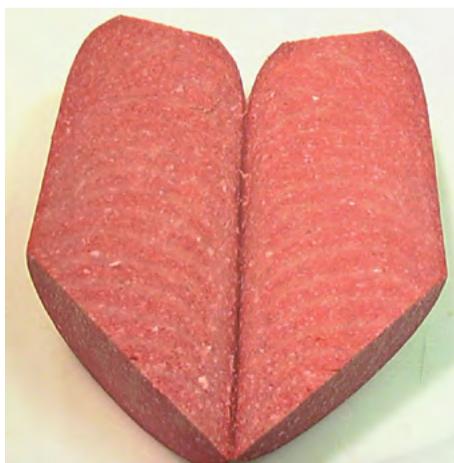


Figura 6 a/b. Defectos de coloración seriados debidos a embarrado durante la embutición.



Figura 7. Transformación deficiente de nitrato a nitrito

sólo nitratos, su transformación a nitrito se ve dificultada si el pH disminuye muy rápidamente, lo cual da lugar a un desarrollo deficiente del color (Figura 7). En los embutidos crudos-curados sin moho de cobertura, la acción combinada de una humedad baja que reduzca la absorción de oxígeno en la superficie del embutido (evitando el acortezado), la adición de nitrificantes y cultivos con capacidad nitrato-reductasa frena la oxidación del color en superficie (Figuras 8 y 9).

La presencia de pequeñas cantidades de nitrificantes provoca un cambio importante del color en productos cárnicos cocidos a

los que habitualmente no se añaden nitritos (Figura 10). Algunos autores (Sindelar y col., 2011) consideran que la adición de 2 a 14 mg/kg, en función de la especie animal utilizada como materia prima, son suficientes para alcanzar el color rosado, mientras que otros lo sitúan



Figura 8. Oxidación superficial del color

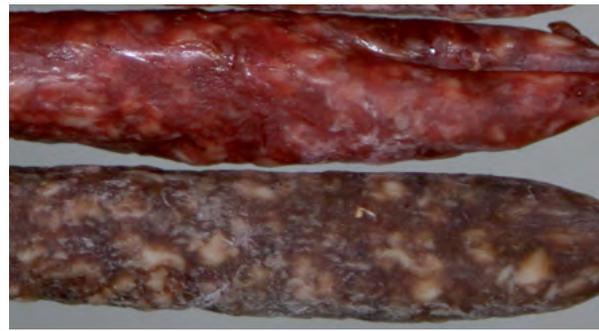


Figura 9. Efecto estabilizante del color producido por la adición de *Staphylococcus spp.*



Figura 10. Nitrificación superficial debida a la presencia de pequeñas cantidades de sustancias nitrificantes en el horno de cocción.

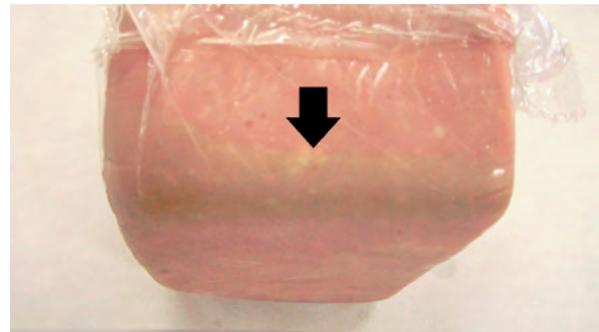


Figura 11. Oxidación superficial en jamón cocido producida durante la cocción

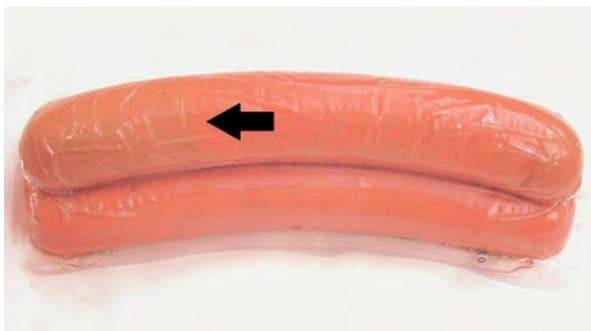


Figura 12. Oxidación superficial en salchichas cocidas debido a la acción combinada de iluminación y elevada permeabilidad al oxígeno.

en 30-50 mg/kg (Wirth, 1984). Por otra parte, en los productos cárnicos envasados se produce un aumento de la permeabilidad al oxígeno durante el tratamiento térmico debido a que la acción combinada de una temperatura y humedad relativa elevadas facilita la oxidación de la superficie del producto cárnico, especialmente en aquellas zonas donde el espesor del film se ha reducido por efecto de tensiones mecánicas (Figura 11). Este problema se ve especialmente agravado cuando el producto cárnico produce poca cantidad de óxido nítrico durante la cocción, debido a la adición de una cantidad reducida de nitrito, o a un valor de

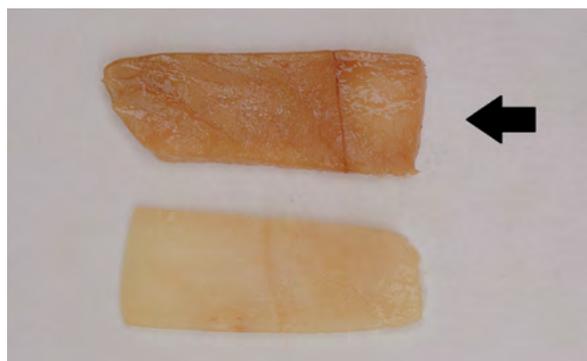
pH elevado (Arнау, resultados no publicados). En los productos con una cantidad de nitrito reducida, la adición de ascorbato, si bien sería beneficiosa en productos de pH elevado, afectaría negativamente a la estabilidad del color en los de pH bajo.

En los productos cocidos envasados, la acción combinada de la luz y el oxígeno produce un deterioro del color (Figura 12). Para evitar este problema se recomienda la utilización de envases alta barrera al oxígeno y en los productos envasados en atmósfera protectora un residual de oxígeno inferior a 0,15% en el espacio de cabeza.

El ascorbato y el isoascorbato aceleran la transformación del nitrito en óxido nítrico, evitan la “quemadura” superficial originada por nitrito (Figura 13) y frenan la formación de nitrosaminas en el magro. Ambos deben distribuirse de forma homogénea de manera que no for-



**Figura 13.** Efecto del ascorbato en el color superficial de un jamón nitrificado con nitrito y nitrato (rojo) y sin adición de ascorbato (verde).



**Figura 14.** Pardeamiento de la grasa producido por ascorbato

men grumos ya que éstos, en los productos crudos-curados, podrían producir manchas oscuras en la grasa debidas a la reacción de pardeamiento que sufren sus productos de oxidación (Figura 14).

#### 4. Efecto del nitrato y nitrito sobre la seguridad abiótica

Los compuestos N-nitroso (NOC) o compuestos nitro-derivados son agentes teratogénicos, mutagénicos y carcinógenos (Cassens, 1995). Se producen como resultado de la interacción de un agente nitrosante con un compuesto susceptible de sufrir dicha nitrosación. Los NOC se dividen en dos clases según la estructura química que presenten: las nitrosaminas (NAs), que derivan de aminas, y las nitrosamidas, que resultan de la sustitución de ureas, amidas, carbamatos, guanidinas y compuestos similares.

Las nitrosaminas constituyen el grupo más relevante de los NOC como sustancias carcinogénicas. Se forman por la reacción de compuestos derivados de los nitritos, fundamentalmente con aminas secundarias. Debido a la existencia de aminas en los alimentos, y la adición de nitritos y nitratos durante su elaboración, esta reacción es común en muchos alimentos, como en los productos cárnicos curados. Se ha comprobado que algunos aminoácidos que presentan el carácter de amina secundaria como la prolina, hidroxiprolina o sarcosina, pueden formar nitrosaminas con cierta facilidad. La glicina es el precursor de la N-nitrosodimetilamina y la alanina es el precursor más característico de la N-nitrosodietilamina. Otra nitrosamina como la N-nitrososarcosina tiene como precursor a la creatinina que es uno de los componentes de la carne. La prolina y la ornitina, originadas a partir de las proteínas del tejido conectivo, actúan como precursores nitrosables de la N-nitrosopirrolidina. Las aminas pueden también derivar de la adición de algunas especias, como es el caso de la piperidina, o incluso pueden provenir de los materiales empleados para el embalaje de dichos productos. Además, los tratamientos térmicos potencian la formación de nitrosaminas a partir de dichos precursores según el tiempo y temperatura de cocción utilizados (Antón y Lisazo, 2003).

Los resultados obtenidos en el subproyecto NITRARED mediante la técnica SPME/GC/MS (Ruiz y Calvarro, 2011), indican que las NAs más frecuentes en productos cárnicos, tan sólo se detectaron en un número reducido de embutidos crudos-curados y jamones curados, y no estuvieron asociadas a la mayor o menor presencia de sales nitrificantes en los mismos (Calvarro y Ruiz, 2011).

## 5. Otros efectos de los nitratos y nitritos

### 5.1. Efecto del nitrato y nitrito sobre compuestos nutricionales y estabilidad oxidativa

Además de las reacciones que se han indicado anteriormente, el óxido nítrico puede unirse al hierro de distintas hemoproteínas, como la guanilato ciclasa, los citocromos y la hemoglobina, reaccionar con el centro activo de la enzima alcohol deshidrogenasa y, posiblemente, con diferentes metaloproteínas biológicamente activas. En este sentido y, en jamón curado, se ha observado que en jamones elaborados con nitrato y nitrito el contenido de piridoxina ( $B_6$ ) es menor y el de nicotinamida ( $B_3$ ) es superior respecto a los jamones elaborados sin nitrificantes. El contenido de vitamina  $B_2$  y el de la mayoría de aminoácidos libres no se ve afectado. Asimismo, al adicionar nitrificantes se aumenta la actividad del enzima superóxido dismutasa (SOD) y no se afecta la actividad de otras enzimas antioxidantes como son la glutatión peroxidasa (GSHPx) y la catalasa (CAT) ni el índice de TBARs inducidos.

En embutidos crudos-curados las concentraciones de vitaminas del grupo B no se modificaron por las distintas cantidades de nitrificantes añadidos, pero si se pudo observar que el nivel de vitamina  $B_6$  disminuía en comparación con los productos elaborados sin nitrificantes (Gratacós y col., 2010).

### 5.2. Heterogeneidad en el contenido residual de nitrificantes

En la mayoría de los productos cárnicos existe una regulación de la cantidad añadida de nitratos y/o nitritos, por lo que las diferencias entre piezas se pueden minimizar si se efectúa una buena homogeneización de la mezcla de curado en el amasado. Para ello es conveniente diluir las sales de curado en agua o en sal común.

En los jamones curados, la cantidad residual de nitrificantes está regulada (Reglamento 1333/2008), por lo que es preciso conocer aquellos factores que pueden afectar a la absorción de los nitrificantes y a la transformación del nitrato a nitrito. Los nitrificantes se añaden habitualmente al inicio del proceso antes del apilado, por lo que debe evitarse un exceso de agua en la sal ya que podría arrastrar a los nitrificantes. Por otra parte, mientras que en los jamones con baja capacidad de retención de agua (p.e. carnes congeladas/descongeladas o carnes exudativas) puede darse una mayor pérdida de nitrificantes superficiales, en los que haya habido una deshidratación superficial se favorecerá su absorción por la parte magra.

El contenido de nitratos presente en el pernil es poco importante. En aquellos jamones a los que se le añaden nitratos, su concentración en el interior aumenta por difusión desde la zona externa y disminuye durante el reposo y secado por reducción a nitrito, mientras que en superficie disminuye a partir de la etapa de salado por difusión al interior y por reducción a nitrito. En los jamones con pH bajo ( $pH_{SM} < 5,5$ ) el contenido de nitratos es más elevado que en los de  $pH_{SM}$  entre 5,5 y 6,0. Por tanto, es en aquél rango de pH donde deben realizarse los controles para evitar que haya jamones con contenido superior al máximo permitido. Por otra parte, la concentración en los músculos interiores (más húmedos) es mayor que en los exteriores, lo cual puede deberse a la tendencia a equilibrar la relación nitrato/agua (Arnau y col., 1995).

El nitrito añadido en el presalado disminuye durante el salado y primeras semanas de reposo. A pH bajo, la reacción de transformación del nitrito a óxido nítrico se produce de forma más rápida, lo cual hace que se necesite mayor cantidad de nitrito añadido para lograr un color homogéneo al corte y evitar los halos de nitrificación (Arnau y col., 2003). En los procesos en los que se añaden nitratos, la concentración de nitrito aumenta durante el periodo de reposo e inicio del secado, especialmente en las zonas superficiales (Arnau y col., 1995). El momento en que se inicia la transformación del nitrato a nitrito depende del pH de la carne y de la microbiota nitrato-reductasa, cuyo crecimiento está influido por la temperatura. La can-

tividad de nitrito residual es muy baja (normalmente <10 mg/kg) tanto si se ha añadido como nitrito sódico como si se ha reducido a partir de nitrato. Sin embargo, en jamones con  $\text{pH}_{\text{SM}} > 6,0$  pueden encontrarse ocasionalmente valores superiores a 50 mg/kg.

La absorción de sales nitrificantes se efectúa principalmente por la parte magra, pero debe asegurarse que se produce también absorción a través de los huesos externos, corteza y grasa subcutánea. El óxido nítrico que se genera por acción de sustancias reductoras de la carne puede atravesar la corteza y la grasa, y contribuye a la nitrificación del jamón y de otros situados en la misma pila (Arnau y col., 2003).

En las mezclas de sales que contienen nitrito sódico, si éste está húmedo, tiende a depositarse en el fondo del recipiente, por lo que conviene mezclarlo de nuevo antes de usarlo. Por otra parte, el nitrito es inestable en presencia de agentes reductores y materiales orgánicos; por tanto, no debe premezclarse con sustancias reductoras o especias.

Los resultados obtenidos en el subproyecto NITRARED indican que de la cantidad de nitrito añadido inicialmente, se detecta un 64-66% al inicio del proceso de curación del salchichón (día 0), disminuyendo su detección durante la curación, alcanzando al final de la misma (día 27) un 12-17%, en función de las diferentes formulaciones estudiadas. Estos datos concuerdan con los de Cassens (1990) que indicó que del total del nitrito añadido a los productos cárnicos sólo un 5-20% permanecería como nitrito residual. La evolución de la determinación de los niveles de nitrato durante la curación del salchichón fue distinta a la del nitrito ya que aumentó, pasando del 101% (día 0) al 114-120% al final del período de curación en función de los diferentes niveles de sales nitrificantes añadidos (Carballo y Andrade, 2013). Estos resultados también coinciden con los aportados por Cassens (1995) que observó que un 1-10% del nitrito añadido al producto se transformaría en nitrato.

## 6. Conclusiones

La reducción de la cantidad de nitratos y nitritos añadidos del 25% y 50% respecto al máximo permitido en embutidos crudos-curados no afecta de forma importante al flavor y a la textura, pero puede facilitar el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos, lo cual plantea la necesidad de establecer modificaciones tecnológicas para garantizar su seguridad. El contenido de nitrosaminas detectadas ha sido muy bajo en todos los tratamientos. El pigmento Zn-protoporfirina se detectó en jamones sin nitrificantes y, en menor medida, en jamones nitrificados de pH bajo. Desde el punto de vista nutricional, la única consecuencia relevante observada de la adición de nitrificantes en embutidos crudos-curados y jamón curado fue la disminución del contenido de vitamina B<sub>6</sub>.

## Equipos participantes

Los resultados que se recogen en este capítulo derivan de las investigaciones realizadas en las distintas acciones desarrolladas por los equipos que han participado en las distintas acciones del subproyecto NITRARED y que han sido coordinadas por Jacint Arnau (IRTA), José Antonio García-Regueiro (IRTA), José Carballo (ICTAN-CSIC), Pedro Roncalés (UNIZAR), Jorge Ruiz (UEX), Eva Hierro (UCM), Carmen García (UEX), Manuela Fernández (UCM), Marta Gisbert (AINIA) y Neus Sanjuán (UPV).

## Agradecimientos

La investigación que recoge este capítulo ha sido realizada en el marco del Proyecto Consolider-Ingenio 2010 CARNISENUSA CSD2007-00016.

## 7. Referencias

- Antón A., Lisazo J. 2003. Nitritos, nitratos y nitrosaminas. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria, ([www.fundisa.org](http://www.fundisa.org)).
- Arnau, J. 2007. Factores que afectan a la salazón del jamón curado. Eurocarne 160, 59-76.
- Arnau, J., Guerrero, L., Gou, P. 2003. Effect of meat pH and the amount of added nitrite and nitrate on colour uniformity of dry-cured hams. Fleischwirtschaft International 1, 31-32.
- Arnau, J., Guerrero, L., Casademont, G., Gou, P. 1995. Physical and chemical changes in different zones of normal and PSE dry-cured ham during processing. Food Chemistry 52, 63-69.
- Calvarro, J., Ruiz, J. 2011. Cuantificación de nitrosaminas en productos cárnicos con diferentes niveles de sales nitrificantes. En: Ordoñez, J.A., Córdoba, J.J. y Ventanas, J. (Eds.). Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables. Universidad de Extremadura. Cáceres, pp. 318.
- Carballo, J., Andrade, S. 2011. Evolución de los nitritos, nitratos y nitroso hemo pigmentos en jamón curado con diferentes niveles de sales nitrificantes. En: Ordoñez, J.A., Córdoba, J.J. y Ventanas, J. (Eds.). Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables. Universidad de Extremadura. Cáceres, pp. 135-138.
- Carballo, J., Andrade, S. 2013. Evolución de los nitratos y nitritos durante la curación de salchichones con diferentes niveles de sales nitrificantes. Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria 33, 114-115.
- Cassens R.G. 1995. Use of sodium nitrite in cured meats today. Food Technology 49, 72-81.
- Cassens, R. G. 1990. Nitrite-Cured Meat. A Food Safety Issue in Perspective. Food & Nutrition Press, Inc. Trumbull, Connecticut, pp. 3-36.
- Fernández, M., Hospital, X.F., Hierro, E. 2011. Influencia de la concentración de nitratos y nitritos en la microbiota de los productos cárnicos crudo curados. En: Ordoñez, J.A., Córdoba, J.J. y Ventanas, J. (Eds.). Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables. Universidad de Extremadura. Cáceres, pp. 159-166.
- Gómez Salazar, J.A. 2013. Modelización de las cinéticas de difusión de nitrato de sodio y nitrito de sodio durante el salado de carne. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.
- Gratacós, M., Castellari, M., Sárraga, C. 2010. Implicaciones de la reducción de nitratos y nitritos en la concentración de vitaminas del grupo B y la estabilidad oxidativa del fuet, salchichón y chorizo. Eurocarne 186, 102-106.
- Hierro, E., Hospital, F.X., Fernández, M., Villegas, B., Lorente, M., Sánchez, M.J., García, C., Calvario, J., Sánchez del Pulgar, J., Gratacós-Curvasí, M. 2011. Calidad sensorial de productos cárnicos madurados elaborados con distintas concentraciones de nitrificantes. En: Ordoñez, J.A., Córdoba, J.J. y Ventanas, J. (Eds.). Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables. Universidad de Extremadura. Cáceres, pp. 145-158.
- Hospital, X.F., Hierro, E., Fernández, M. 2011. Efecto de la presencia/ausencia de nitrato y del pH inicial del pernil en la microbiota del jamón curado. Proceedings del VI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 8-10 junio, Valencia, España.
- Hospital, X.F., Hierro, E., Fernández, M. 2012. Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. International Journal of Food Microbiology 153, 395-401.
- Leistner, L. 1992. The essentials of producing stable and safe raw fermented sausages. En: Smulders, F.J.M., Toldrá, F., Flores, J., Prieto, M. (Eds). New technologies for meat and meat products. Eceamst, Audet, Nijmegen, Holanda, pp. 1-19.
- Lorente, M., Villegas, B., Sánchez, M.J. 2011a. Efecto de la reducción de la concentración de nitratos y nitritos en la calidad sensorial de productos cárnicos crudo-curados. Eurocarne 194, 74-79.
- Lorente, M., Villegas, B., Sánchez, M.J. 2011b. Análisis sensorial de embutidos crudo-curados con distintos niveles de nitratos y nitritos. En: Ordoñez, J.A., Córdoba, J.J. y Ventanas, J. (Eds.). Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables. Universidad de Extremadura. Cáceres, pp. 323.
- Lorés A., Pérez-Beriaín T., Roncalés P. 2011. La formación de color y su estabilidad en los productos curados-curados. En: Ordoñez, J.A., Córdoba, J.J. y Ventanas, J. (Eds.). Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables. Universidad de Extremadura. Cáceres, pp. 127-133.
- Lundberg, J.O., Carlström, M., Larsen, F.J., Weizberg, E. 2011. Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. Cardiovascular Research 89, 525-552.
- Ordoñez, J.A., Hierro, E.M., Bruna, J.M., De la Hoz, L. 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 39, 329-367.

- Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios. DO L354, 31.12.2008.
- Roncalés P., Pérez-Berriain T., Lorés A. 2011. Formación y conservación del color y flavor en jamones con adición reducida o sin nitrificantes. VI Congreso Mundial del Jamón. Lugo, (España), 21-23 Septiembre.
- Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. 2008a. Review: Determination of preservatives in meat products by flow injection analysis (FIA). *Food Additives and Contaminants, Part A*, 25, 1167-1178.
- Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. 2008b. Aplicación del análisis de inyección de flujo (FIA) a la determinación de nitratos y nitritos en productos cárnicos. *Eurocarne* 171, 51-58.
- Ruiz J., Calbarro, J. 2011. Estudio de nitrosaminas en productos cárnicos mediante microextracción en fase sólida (SPME). En: Ordoñez, J.A., Córdoba, J.J. y Ventanas, J. (Eds.). *Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables*. Universidad de Extremadura. Cáceres, pp. 139-144.
- Sindelar, J.J., Milkowski, A. L. 2011. Sodium nitrite in processed meat and poultry. *Meats: a review of curing and examining the risk/benefit of its use*. AMSA White Papers, Series, Number 3. American Meat Science Association. <http://www.meatscience.org/SodiumNitriteReview.aspx>
- Wakamatsu, J., Okui, J., Ikeda, I., Nishimura, T., Hattori, A. 2004. Establishment of a model experiment system to elucidate the mechanism by which "Zn-protoporphyrin IX" is formed in nitrite free dry-cured ham. *Meat Science* 68, 313-317.
- Wirth, F. 1984. Pökeln, Farbbildung, Farbbhaltung. *Technologie der Brühwurst*. Institut für Technologie der Bundesanstalt für Fleischforschung. pp. 123-143.



## CAPITULO VI

# Uso de tecnologías emergentes para garantizar la seguridad alimentaria de la carne y sus derivados

*M<sup>a</sup> Isabel Cambero y Gonzalo D. García de Fernando*

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria (UCM). Madrid*

*Margarita Medina*

*Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Madrid*

### 1. Introducción

En los últimos lustros, los hábitos alimentarios han cambiado en las sociedades desarrolladas y en especial en las grandes ciudades, donde las distancias y la ajetreada forma de vida dificultan, o incluso impiden, perpetuar los hábitos gastronómicos tradicionales. De esta forma, un creciente porcentaje de la ingesta de alimentos, tanto en el hogar como fuera de él, se lleva a cabo bajo el síndrome de la “rapidez”, y habitualmente se habla de comida de consumo rápido o cocina rápida. Dentro de esta dinámica se incluyen alimentos listos para el consumo, listos para calentar o listos para cocinar, cuyas denominaciones derivan de su terminología anglosajona *ready-to-eat* (RTE), *ready-to-heat* (RTH) o *ready-to-cook* (RTC), respectivamente.

Estas circunstancias han conducido a que alimentos ya procesados (como jamón cocido, jamón curado, embutidos, mortadela, fiambres de ave, quesos frescos y curados) o frescos (*carpaccio*, frutas y hortalizas, etc.) se transformen en productos RTE, lo que habitualmente implica una reducción de tamaño para la preparación de lonchas, filetes, cortes, rodajas, etc. que se envasan en porciones individuales o familiares. Estos alimentos, al igual que los RTH y RTC, facilitan el consumo, ofrecen una calidad sensorial estable, ahorran tiempo y agilizan el trabajo en el hogar. Sin embargo, su preparación conlleva diversos problemas derivados de la manipulación del alimento, siendo el más preocupante la potencial contaminación con microorganismos patógenos durante las últimas operaciones (fundamentalmente reducción de tamaño, dosificación y envasado) que hay que realizar para transformar el producto elaborado en la ración envasada que se suministra al consumidor. Los alimentos RTE adquieren especial importancia desde el punto de vista de salud pública porque normalmente se consumen directamente sin ningún calentamiento o cocinado adicional. Sin restar importancia a otros microorganismos patógenos que puedan alcanzar el producto durante su preparación, los más peligrosos son, sin duda, varios serovares de *Salmonella* spp. y de *Escherichia coli* (incluido el O157:H7), *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, este último en situaciones de abuso (aumento incontrolado) de la temperatura de almacenamiento y distribución que, desgraciadamente, no es infrecuente. Entre estos, *L. monocytogenes* alcanza especial relevancia por ser una bacteria psicrotrofa, que puede multiplicarse, si las condiciones son favorables, durante el almacenamiento del alimento RTE en refrigeración pudiendo alcanzar niveles peligrosos.

Es obvio que la contaminación por patógenos es, afortunadamente, un fenómeno casual. Sin embargo, no es posible confiar en el azar a la espera de que los patógenos no alcancen el producto incluso aplicando las más estrictas normas higiénicas y realizando las operaciones de

transformación en productos RTE en “salas blancas”. Por otra parte, las bacterias patógenas no sólo son importantes porque ocasionalmente pueden alcanzar el producto con el consiguiente aumento del riesgo microbiano, sino que pueden pasar a otros alimentos a través de contaminaciones cruzadas en las instalaciones industriales y establecimientos de preparación y venta, lo que en alimentos de comida rápida alcanza especial importancia porque muchos de ellos se preparan con diversos ingredientes (incluidos diversos RTE, RTH o RTC) sin o con escaso tratamiento térmico.

Las circunstancias anteriormente expuestas permiten deducir la necesidad de poner a punto un medio de reducir el número de patógenos de estos alimentos para garantizar su seguridad. Esto implica la consecución del objetivo de seguridad alimentaria (FSO) que puede definirse como “la máxima frecuencia o concentración de un peligro microbiano en un alimento en el momento de su consumo”.

El criterio microbiológico universal para *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 (y otros serovares afines) es ausencia en 25 g. Para *L. monocytogenes*, el criterio varía en la Unión Europea (UE) dependiendo de la población receptora y del tipo de alimento de acuerdo a lo establecido en el Reglamento de la Comisión 1441/2007. En la Tabla 1 se muestra un resumen de los criterios a seguir cuando el alimento RTE va destinado a consumidores normales, es decir, exento de cualquier causa sensibilizadora.

Tabla 1. Criterios de seguridad alimentaria para *L. monocytogenes* (Lm) de acuerdo con el Reglamento de la Comisión de las Comunidades Europeas 1441/2007

| Producto                     | Condición   | Límite        |
|------------------------------|---|---------------|
| 1. Con las características   | a) pH ≤ 4,4 o $a_w \leq 0,92$   | 100 ufc/g     |
|                              | b) pH ≤ 5,0 y $a_w \leq 0,94$   | 100 ufc/g     |
|                              | c) Vida útil < 5 días   | 100 ufc/g     |
| 2. Puede crecer <i>Lm</i>    | a) Si se puede demostrar que no superará el valor 100 ufc/g durante su vida útil    | 100 ufc/g     |
|                              | b) Si no se puede demostrar que no superará el valor 100 ufc/g durante su vida útil | Ausencia/25 g |
| 3. NO puede crecer <i>Lm</i> |   | 100 ufc/g     |

A los alimentos que presenten valores más elevados que los expresados en la Tabla 1 (apartado 1) se les aplica el criterio de “tolerancia cero” (ausencia en 25 g) si no hay un tratamiento listericida incluido en el proceso. En las reglamentaciones de otros países (por ejemplo, Japón y USDA en EEUU), el criterio microbiológico sobre *L. monocytogenes* es siempre de “tolerancia cero”. En la UE, el cumplimiento del Reglamento (CE) de la Comisión 1441/2007, así como la normativa antes mencionada, implica que algunos alimentos deberían higienizarse antes de ser librados al mercado. Las tecnologías convencionales, de forma particular los tratamientos térmicos, no pueden aplicarse a muchos productos; tal es el caso de la mayoría de los productos cárnicos RTE y de las carnes frescas, porque, además de estar ya envasados, se modificarían notablemente sus características sensoriales. Es necesario, pues, recurrir a métodos de higienización no térmicos. Con este fin, las acciones del subproyecto PROCARTE han evaluado la viabilidad de tratamientos físicos (electrones acelerados, altas presiones hidrostáticas y pulsos de luz blanca de alta intensidad) y biológicos (agentes antimicrobianos, como bacteriocinas, lactoferrina y sus derivados y sistema lactoperoxidasa). Las dos primeras tecnologías pueden aplicarse en el producto envasado. En el caso de los pulsos de luz, es preciso primero estudiar la permeabilidad del material polimérico del envase a la energía aplicada. En conjunto, se han llevado a cabo, en distintos productos cárnicos, investigaciones conducentes a la optimización de los tratamientos con las mencionadas tecnologías para la consecución de los FSO para los

principales agentes patógenos. También en este contexto, se han utilizado distintas técnicas y modelos estadísticos y se ha analizado cómo influye la variabilidad del comportamiento microbiano en los tratamientos microbicidas a aplicar en un alimento para alcanzar un FSO determinado. En una de las acciones se ha evaluado, además, el efecto de las mencionadas tecnologías no térmicas en virus entéricos de transmisión alimentaria. Cabe añadir que el grupo de la Universidad Politécnica de Valencia ha desarrollado y patentado un nuevo sistema de conservación no térmica basado en el tratamiento combinado de ultrasonidos y dióxido de carbono supercríticos, inicialmente orientado al tratamiento de alimentos líquidos (Benedito y col., 2011; Ortuño y col., 2012a).

## 2. Potencial de la aplicación de electrones acelerados (EA) para garantizar la seguridad microbiológica de productos cárnicos

El tratamiento con EA (rayos beta o ionización electrónica) se considera una de las tecnologías no térmicas más adecuadas para higienizar alimentos RTE, por su facilidad de aplicación, la posibilidad de hacerlo de forma continua en alimentos ya envasados y su capacidad para tratar un número muy elevado de producto en tiempos cortos. Además es una tecnología barata (aproximadamente 0,10 euros/envase de 250 g), no requiere operaciones preparativas ni de postproceso y ofrece resultados repetitivos. Es una de las modalidades de los tratamientos con radiaciones ionizantes bien conocida desde la década de 1980 y su aplicación está permitida y regulada para diversos alimentos.

Para el tratamiento de alimentos pueden utilizarse EA con una energía nominal (energía cuántica máxima)  $\leq 10$  Mev (Real Decreto 348/2001). De acuerdo con las recomendaciones de las organizaciones internacionales (FAO, OMS, OIEA), a las que la AESAN se adhirió hace unos años, la dosis máxima autorizada es de 10 kGy. El poder bactericida de los EA se basa en el daño producido a moléculas vitales, normalmente los ácidos nucleicos, de los microorganismos (efecto directo) que mueren cuando no pueden reparar la lesión. A esto se une el efecto de los radicales libres generados en la radiolisis (efecto indirecto), sobre todo a partir de moléculas de agua. El poder de penetración (5-8 cm en productos cárnicos) de los EA es menor que el de la radiación gamma y rayos X, pero suficiente para franquear el material de los envases comerciales de productos cárnicos RTE (Cambero y col., 2008).

### 2.1. Optimización del tratamiento

En las investigaciones llevadas a cabo en el subproyecto PROCARTE se ha analizado la aptitud de los EA para conseguir el FSO en distintos productos cárnicos comerciales. Con este objetivo y para determinar las dosis requeridas se han tenido en cuenta los siguientes aspectos:

- Nivel de contaminación inicial. En el caso de los productos RTE, si se observan las más estrictas condiciones higiénicas, se ha estimado, de acuerdo con la opinión de ICMSF en las operaciones postproceso de salchichas tipo frankfurt (ICMSF, 2004), que el número de células que puede alcanzar al producto es, en el peor de los casos, de 10 células/g o  $\text{cm}^2$ .
- Los criterios microbiológicos para los distintos patógenos, de acuerdo a lo establecido por la UE (Tabla 1) y otros países.
- Posible crecimiento de los microorganismos durante el almacenamiento del producto. La bacteria de mayor relevancia es *L. monocytogenes* por su carácter psicrotrofo. Sin embargo, esta bacteria no puede multiplicarse si la  $a_w$  del producto es inferior a 0,92. Las otras bacterias patógenas que preocupan no pueden multiplicarse a temperaturas de refrigeración y, por tanto, basta con reducir su carga en el alimento por debajo de su dosis infectiva o considerando los niveles estipulados en las regulaciones microbiológicas. Teniendo en cuenta los datos de la FDA, se han considerado incrementos medios de *L. monocytogenes* en productos cárnicos con  $a_w$  superior a 0,92 de alrededor de 0,135 unidades logarítmicas (unidades logarítmicas)/día a 5 °C (Cabeza y col., 2011).

Uno de los factores limitantes de la aplicación de un determinado tratamiento es su repercusión en las características sensoriales del alimento. Las radiaciones ionizantes pueden originar cambios en el olor, color y sabor del producto con un impacto significativo en su aceptación por el consumidor (Ordóñez y col., 2007; Cambero y col., 2012). Por ello, para la optimización del tratamiento, se consideró que la máxima dosis que podría aplicarse sería aquella que garantizase un producto final con características sensoriales similares a las de un producto sin irradiar. Con este objetivo se llevaron a cabo distintos tipos de análisis sensoriales (de diferenciación, preferencia y descriptivos) en los que se ha evaluado, de forma aislada y en conjunto, el olor, sabor y sensación en boca. Para determinar el efecto de los EA en el color se estudiaron los parámetros CIELAB [ $L^*$  (luminosidad o brillo),  $a^*$  (tendencia al rojo) y  $b^*$  (tendencia al amarillo)]. El efecto en la textura se valoró mediante análisis de perfil de textura (TPA) y ensayos de tracción en los que se determinaron diversos parámetros (dureza, cohesividad, adhesividad, elasticidad y resistencia a la rotura).

La aplicación de EA, aparte de inactivar hasta niveles seguros las bacterias patógenas, reduce también el número de bacterias alterantes, que se traduce en un aumento de la vida útil. En los estudios realizados, la vida útil se limitó al momento en que el recuento de microorganismos en un medio nutritivo alcanzó el valor de  $5 \times 10^7$  ufc/g o  $\text{cm}^2$ .

### 2.1.1. Tratamiento con EA de distintos productos cárnicos RTE

Los productos cárnicos suelen presentar un pH por encima de 5, pero su  $a_w$  puede ser superior o inferior a 0,92. Por tanto, la higienización de productos cárnicos RTE por cualquier tecnología tendría que cumplir los valores de las regulaciones que se recogen en los apartados 2a y 3 de la Tabla 1. Entre los productos cárnicos con una  $a_w$  superior a 0,92 se incluyen jamón cocido, mortadela, fiambres de ave y otros alimentos nitrificados ( $\text{pH} > 5,5$ ) y una serie de productos frescos de consumo en crudo (p.e. *carpaccio* y *tartar*). Entre los que presentan una  $a_w$  menor de 0,92, los de mayor interés son el jamón, lomo curado y cecina ( $\text{pH} > 5$ ) y embutidos madurados ( $\text{pH} 4,5 - 5$ ).

Se ha estudiado la aplicación de EA en un amplio abanico de productos cárnicos RTE (fermentados, cocidos, curados y crudos). La tabla 2 muestra resumidamente el criterio del proceso (dosis que es necesario aplicar para conseguir el FSO) para diversos productos. Puede observarse que todas las dosis establecidas para la higienización (optimización del proceso) están muy por debajo (en un 70–90%) de la dosis permitida (10 kGy) por diversas organizaciones nacionales e internacionales. Dosis de 1,5–1,8 kGy logran productos cárnicos que cumplen el criterio microbiológico del Reglamento 1441/2007 para la UE. Sin embargo, en países con el criterio de “tolerancia cero” para *L. monocytogenes*, es necesario aumentar la dosis del tratamiento hasta, en el peor de los casos, 2,8 kGy. En general, con dosis  $\leq 2$  kGy, puede afirmarse que apenas se ve afectado el flavor, sin que se diferencien significativamente los productos tratados de los controles. En cambio, con dosis próximas a 3 kGy, se han apreciado modificaciones ligeras en el sabor y olor del alimento recién tratado que, normalmente, se disipa durante su almacenamiento. En productos RTE a base de carne fresca con elevado contenido en mioglobina, como el *carpaccio* de vacuno, el tratamiento, aún siendo a bajas dosis, ocasiona una oxidación de la mioglobina a metamioglobina, adquiriendo un color pardo que sería cuestionable para el consumidor. Sin embargo, cuando el pigmento se ha fijado al formarse nitrosohemocromo, como en el caso del jamón cocido, o nitrosomioglobina, como en el curado, no se producen cambios notorios en el color.

En relación con la vida útil, los productos RTE con  $a_w < 0,92$  almacenados a temperaturas de refrigeración pueden considerarse microbiológicamente estables, por lo que no cabe valorar el efecto de los EA. Sin embargo, las dosis requeridas para alcanzar el FSO de acuerdo con los criterios microbiológicos de la UE y EEUU, permitieron duplicar la vida útil de la mayoría de los productos cárnicos con  $a_w \geq 0,92$  (Tabla 2).

Cabe destacar que la ubicuidad de los microorganismos patógenos, sobre todo *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*, y la posibilidad de que esta última pueda multiplicarse en alimentos

refrigerados con  $a_w \geq 0,92$ , unido a los criterios microbiológicos de “tolerancia cero”, está ocasionando un gran perjuicio a las exportaciones de productos cárnicos, lo que supone un problema tanto desde el punto de vista sanitario como comercial. Los datos mostrados anteriormente demuestran que mediante la aplicación de EA a dosis bajas puede conseguirse la inocuidad de los productos cárnicos y superar las dificultades de exportación existentes.

### 2.1.2. Avances en la aplicación de EA en carne y productos cárnicos frescos

Una proporción considerable de las toxiinfecciones alimentarias se ha asociado al consumo de carne y productos cárnicos. La mayoría de los brotes en los que la carne ha estado implicada se han debido a un infracalentamiento o recontaminación post-cocinado. Por otra parte, por su composición, pH (5,8-5,5) y  $a_w$  (en torno a 0,99), la carne tiene una vida útil muy corta (5-7 días en refrigeración). Su deterioro se debe fundamentalmente al crecimiento de la microbiota aeróbica Gram-negativa productora de limo, principalmente representada por *Pseudomonas* spp. (Ordóñez y col., 2007).

A lo largo del desarrollo del subproyecto PROCARTE se ha estudiado la viabilidad del tratamiento con EA para higienizar y aumentar la vida útil de carnes (de pollo, porcino y vacuno) envasadas en porciones domésticas así como de piezas enteras (lomo de cerdo fresco y adobado y solomillo de vacuno), para su comercialización en el mercado nacional y para la exportación.

#### A) Aplicación en carne de pollo

En la carne de ave, las bacterias patógenas de mayor trascendencia son *Salmonella* spp y *C. jejuni*. Ambas son termolábiles; así, la mayoría de los brotes en los que la carne de ave ha estado implicada se han debido a un infracalentamiento o recontaminación post-cocinado (Ordóñez y col., 2007). No obstante, el mayor riesgo radica en que la carne portadora se convierta en fuente de estas bacterias para otros alimentos mediante contaminaciones cruzadas. De aquí la necesidad de controlar (destruir/inhibir) esta bacteria en ese material.

Para estudiar el potencial del tratamiento con EA se eligió como modelo filetes y carne picada de pechuga de pollo envasados. Como se ha mencionado, el criterio universal para *Salmonella* spp. en prácticamente todos los alimentos es de ausencia en 25 g de producto. Puede considerarse, pues, equivalente a un FSO de 4 ufc/100g ( $\log_{10} 0,04 = -1,39$ ). En las experiencias realizadas, *S. Typhimurium* mostró un valor de reducción decimal de 0,46 y 0,52 kGy en filetes y carne picada, respectivamente; algo mayores que los que presentó *S. Enteritidis* (0,37 y 0,38 kGy) (Ordóñez y col., 2007).

Asumiendo una carga inicial de 1,42 ( $\log 1,42 = 0,152$ ) células/g, considerando que en un gramo de carne picada se mantiene esa misma concentración de salmonelas (Ordóñez y col., 2007) y teniendo en cuenta la situación más desfavorable, es decir, el valor D de *S. Typhimurium* (0,52 kGy), puede calcularse el criterio del proceso en 0,8 kGy que se podría aumentar hasta 1 kGy para proporcionar un aceptable margen de seguridad. Si se sospechara que se pudiese originar un “abuso de temperatura” el tratamiento para conseguir el FSO sería de 1,4 kGy. A estas dosis no hubo cambios significativos en las características sensoriales (tanto en carne picada como en filetes). A dosis  $\geq 2$  kGy se produjo un ligero aumento de la tonalidad rojiza, que favoreció la aceptación del producto. Esta modificación del color se ha atribuido a la formación del complejo monóxido de carbono-mioglobina inducido por la generación de cantidades traza de monóxido de carbono y las condiciones reductoras durante el tratamiento con EA (Ordóñez y col., 2007). La carne tratada a 3 kGy presentó además mayor brillo y una liberación de exudados más alta. Respecto al olor, se detectaron olores anómalos, con intensidad creciente con el aumento de la dosis aplicada. Los olores generados se calificaron como “a corral” o “a ave” a dosis cercanas a 2 kGy y a “pluma quemada” en torno a 4 kGy. Sólo a dosis  $> 3$  kGy la intensidad de estos olores redujo la aceptación del producto y tras el cocinado, la carne se calificó con sabor a “quemado”, astringente, regusto metálico y ligeramente picante, textura más seca, compacta y apelmazada (Ordóñez y col., 2007), lo que, en cierto modo, limita el uso de ese nivel de ionización.

Tabla 2. Resultados de la aplicación de electrones acelerados (EA) en productos cárnicos RTE

| Producto                                     | $a_w$ | Microorganismo                         | D (kGy) | Criterio del proceso        | Vida útil                                | Ref.  |
|--|-------|--|---------|-----------------------------|--|-------|
| Jamón cocido                                 | 0,92  | <i>L. monocytogenes</i> ScottA         | 0,36    | 0,78 (UE);<br>2,00 (EEUU)   | Aprox.<br>duplicación<br>(microbiología) | 1,2,3 |
|  |       | <i>L. monocytogenes</i><br>Otras cepas | 0,48    | 1,00 (UE);<br>2,67 (EEUU)   |  |       |
|  |       | <i>L. innocua</i>                      | 0,49    | 1,07 (UE);<br>2,73 (EEUU)   |  |       |
|  |       | <i>S. aureus</i>                       | 0,47    | No crece<br><5 °C (no tto*) |  |       |
|  |       | <i>E. coli</i> O157:H7                 | 0,35    | 0,84                        |  |       |
| Jamón cocido<br>MAP** (100% N <sub>2</sub> ) | 0,92  | <i>L. monocytogenes</i> ScottA         | 0,45    | 0,98 (UE);<br>2,50 (EEUU)   | Aprox.<br>duplicación<br>(microbiología) | 4     |
|  |       | <i>L. innocua</i>                      | 0,69    |                             |  |       |
| Jamón curado                                 | 0,89  | <i>L. monocytogenes</i> ScottA         | 0,42    | no tto (UE);<br>1,00 (EEUU) | Microbiológicamente estable              | 5,6   |
|  |       | <i>L. innocua</i>                      | 0,47    | no tto (UE);<br>1,12 (EEUU) |  |       |
|  |       | <i>S. Typhimurium</i>                  | 0,53    | 1,27                        |  |       |
|  |       | <i>E. coli</i> O157:H7                 | 0,26    | 0,62                        |  |       |
| Salchichón                                   | 0,88  | <i>L. innocua</i>                      | 0,47    | no tto (UE);<br>1,12 (EEUU) | Microbiológicamente estable              | 7     |
|  |       | <i>S. Enteritidis</i>                  | 0,41    | 0,98                        |  |       |
|  |       | <i>S. Typhimurium</i>                  | 0,53    | 1,27                        |  |       |
| Chorizo                                      | 0,82  | <i>L. innocua</i>                      | 0,53    | no tto (UE);<br>1,27 (EEUU) | Microbiológicamente estable              | 7     |
|  |       | <i>S. Enteritidis</i>                  | 0,43    | 1,03                        |  |       |
|  |       | <i>S. Typhimurium</i>                  | 0,54    | 1,29                        |  |       |
| Cecina                                       | 0,90  | <i>L. monocytogenes</i> ScottA         | 0,49    | no tto (UE);<br>1,17 (EEUU) | Microbiológicamente estable              | 5     |
|  |       | <i>L. innocua</i>                      | 0,57    | no tto (UE);<br>1,36 (EEUU) |  |       |
|  |       | <i>S. Typhimurium</i>                  | 0,52    | 1,24                        |  |       |
|  |       | <i>E. coli</i> O157:H7                 | 0,25    | 0,60                        |  |       |
| Atún ahumado                                 | 0,89  | <i>L. monocytogenes</i>                | 0,43    | 0,50 (UE);<br>2,00 (EEUU)   | Microbiológicamente estable              | 5     |
|  |       | <i>L. innocua</i>                      | 1,67    | 0,86 (UE);<br>3,13 (EEUU)   |  |       |
|  |       | <i>S. Typhimurium</i>                  |         | 1,67                        |  |       |

\* No tto: No requiere tratamiento.

\*\* MAP: Envasado en atmósferas modificadas.

Ref. 1: Benedito y col. (2011); 2, 3, 4: Cabeza y col. (2007, 2010, 2011); 5: Cambero y col. (2012); 6: Hoz y col. (2008); 7: Cabeza y col. (2009).

Aunque la carne fresca de ave es la fuente más importante de *C. jejuni*, esta bacteria no se consideró como microorganismo diana debido a que su peligrosidad es mucho menor que la de *Salmonella* spp. ya que se trata de una bacteria muy radiolábil, ya que se han descrito valores D en torno a 0,16-0,19 kGy, al menos, dos veces menor a los considerados para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (Ordóñez y col., 2007). Por tanto, la optimización para *Salmonella* spp. aseguraría la destrucción de *C. jejuni* hasta niveles estadísticamente despreciables.

Las dosis requeridas para la consecución de los FSO permitieron además una razonable ampliación de la vida útil, una duplicación en el caso de los filetes (de 4 días a 8) y un 50% más en el caso de la carne picada (de 4 a 6 días). Incluso se podría aplicar dosis de hasta 1,5 kGy para cubrir un ocasional abuso de temperatura (incremento hasta unos 8 °C) durante el almacenamiento y distribución de la carne, sin menoscabo de su calidad.

### B) Aplicación en carne de cerdo

El lomo (*longissimus dorsi*) es una de las piezas de la canal de porcino de mayor calidad y valor comercial. En este estudio, el microorganismo considerado para el establecimiento del criterio de proceso fue *L. monocytogenes*. La presencia de *Y. enterocolitica* tiene menor interés debido a que su radioresistencia es mucho menor que la de *L. monocytogenes* [por ejemplo, 0,1 a 0,2 kGy del primer microorganismo frente a 0,35 a 0,5 kGy del segundo (Cabeza y col., 2007 y 2009)]. *S. Enteritidis* es otro microorganismo a controlar. Sin embargo, dado que esta bacteria no puede crecer a temperaturas de refrigeración, y que sus tiempos de generación son mayores que los de *L. monocytogenes*, [por ejemplo, 14 h frente a 7 h en jamón cocido a 10 °C (Cabeza y col., 2010)] supone un riesgo menor que el correspondiente a la listeria. Por lo tanto, el tratamiento establecido para eliminar *L. monocytogenes* permitiría el control de *Yersinia* y *Salmonella*. En resumen, puede decirse que el tratamiento con dosis de 1 y 2 kGy del producto envasado en películas plásticas de baja permeabilidad a los gases, duplica y cuadruplica respectivamente la vida útil del producto refrigerado (4 °C), pasando de los habituales 5 días a 11 y 20 días, respectivamente (García-Márquez y col., 2012a). Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, el tratamiento con EA a dosis inferiores a 2 kGy permite el suministro de carne libre de *L. monocytogenes* durante 2 semanas. Este tratamiento no produjo modificaciones significativas de las características sensoriales de la carne. Cuando el tratamiento aplicado sobrepasó los 2 kGy se observó un incremento de la liberación de exudados asociado a una pérdida de la capacidad de retención de agua (CRA), lo que condujo a un producto menos jugoso tras el cocinado de la carne. Asimismo, se describieron ligeros matices aromáticos a “quemado” y a “medio de cultivo calentado”. Respecto al color, el tratamiento de irradiación redujo la tonalidad roja e incrementó el brillo de la carne, sin duda debido a la mayor liberación de exudados. Sin embargo, estos cambios fueron sutiles no afectando a la aceptación general del producto (García-Márquez y col., 2012a).

Resultados análogos se obtuvieron cuando se trató lomo adobado con EA (García-Márquez y col., 2012b), aunque el efecto en las características sensoriales fue menor. Cuando ambos productos (fresco y adobado) se envasaron a vacío o en atmósferas modificadas (MAP), y se trataron con 1 y 2 kGy, se consiguió igualmente duplicar y triplicar la vida útil respecto al control y asegurar un producto libre de *L. monocytogenes* durante al menos 15 días (Cabeza y col., 2011). Estos tipos de envasado modificaron el efecto de los EA en el color de la carne fresca de forma que el producto tratado presentó un color rojo más intenso, probablemente asociado a la formación de carboximioglobina. Cabe añadir que el tratamiento con EA, tanto de lomo fresco como adobado, en ningún caso afectó a la textura del producto.

Se ha sugerido que los tratamientos de irradiación pueden acelerar las reacciones de oxidación debido a la formación de radicales libres, lo que podría conducir a la formación de compuestos nocivos, como los derivados de la oxidación del colesterol (COPs). Ante esta conjetura, se estudió el contenido de COPs en lomo fresco y adobado (García-Márquez y col., 2010), tratado con distintas dosis. Los resultados obtenidos permitieron concluir que los productos no tratados presentan los mismos COPs que los tratados con dosis de 1 y 2 kGy, aunque

en estos últimos el contenido total de COPs fue ligeramente superior. Por otra parte, no se observaron cambios en la fracción de fosfolípidos de la grasa intramuscular atribuibles al tratamiento con EA (García-Márquez y col., 2013). En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la ionización electrónica a dosis  $\leq 2$  kGy permite incrementar la seguridad y la vida útil de ambas formas de comercialización del lomo de cerdo sin efectos adversos.

### C) *Aplicación en carne de vacuno*

El solomillo de vacuno es una pieza de elevado valor comercial tanto para el consumo directo como para la preparación de algunos RTE como el *carpaccio*. Al aplicar EA, para incrementar su seguridad microbiológica y vida útil, se obtuvieron resultados muy similares a los descritos en lomo fresco de cerdo. La vida útil en refrigeración (4 °C) se incrementó desde los 8 días del producto no tratado y envasado en atmósfera de aire, hasta 18 y 28 días cuando se aplicaron 1 kGy y 2 kGy, respectivamente. En el caso de abuso de temperatura (8 °C), los resultados fueron igualmente satisfactorios, manteniéndose la carne aceptable para el consumo durante 15 y 22 días con las dosis mencionadas, frente a los 4 días del mismo producto sin tratar. Este tratamiento además permitió la consecución del FSO para *L. monocytogenes* de acuerdo al criterio de la UE (Tabla 1) y de EEUU durante 28 y 18 días, respectivamente, en refrigeración correcta (4 °C) y durante 22 y 15 días si se produce un abuso en la temperatura de refrigeración. Sin embargo, dosis  $\geq 2$  kGy dieron lugar a la liberación de exudados y aparición de ligeros olores extraños aunque el cocinado enmascaró estos defectos. A dosis de 1 kGy no se observaron cambios en el color pero a partir de 2 kGy se produjo un oscurecimiento de la carne sin llegar a la aparición de la tonalidad pardo-marrón que refleja la oxidación de la mioglobina.

La carne picada fue otro de los productos de vacuno estudiados, dado su gran interés industrial. Este material es un medio excelente para el crecimiento bacteriano tanto superficial como en su interior y, en general, presenta una vida útil muy corta (no más de 2-4 días a 4 °C). Al igual que la microbiota alterante, la posibilidad de encontrar patógenos en la carne picada es mayor que en las canales, piezas o filetes. *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. son algunos de los más frecuentes. Por ejemplo, en Estados Unidos, el 49% de los casos anuales de infecciones con *E. coli* O157:H7 y el 3% de las salmonelosis se atribuyen al consumo de hamburguesas u otras preparaciones a base de carne picada tras un cocinado insuficiente. En el trabajo aquí esbozado se trató carne picada envasada sin exclusión de aire y en MAP con EA. En las primeras experiencias realizadas se observó que, independientemente del tipo de envasado, este tratamiento era muy eficaz para reducir la carga de microorganismos alterantes. Sin embargo, el color de la carne se vio intensamente afectado, perdiéndose la tonalidad rojiza con la concomitante aparición de zonas oscuras pardo-marrón y negruzcas, incluso con dosis de 1 kGy (Cambero y col., 2012). Estos cambios asociados a la rápida oxidación de la mioglobina confieren a la carne fresca un aspecto inaceptable para el consumidor. Como estrategia para evitar, o reducir este efecto se recurrió a la adición de sulfitos, en una formulación similar a la establecida para la *burger meat* (83% carne picada y un 17% de una mezcla de agua, sulfito sódico, proteína de soja, ácido ascórbico y cítrico) y/o a la incorporación de CO en un 1% en la mezcla de gases del envasado [CO<sub>2</sub> (50%)/O<sub>2</sub> (24%)/N<sub>2</sub> (25%)/CO (1%)]. De esta forma, se consiguió la fijación del pigmento de la carne con la formación de un color rojizo estable debido, sin duda, a la carboximioglobina. Fue necesaria la combinación de ambas estrategias (sulfitos y CO) para el mantenimiento del color de la carne tras el tratamiento (Cambero y col., 2012). El incremento de la vida útil (considerando el criterio microbiológico y sensorial) fue entonces de hasta 40 días con la aplicación de 2 kGy y hasta 35 días con 1 kGy, lo que suponía duplicar el tiempo de almacenamiento de este producto y garantizar niveles seguros de *L. monocytogenes*. La ausencia de *E. coli* O157:H7 también está asegurada por su mayor radiosensibilidad (valor D calculado de 0,26 kGy frente a 0,41 y 0,35 kGy para *L. monocytogenes* respectivamente en carne picada y *burger meat*).

## 2.2. Evaluación del efecto de la aplicación de EA. Identificación de alimentos irradiados

En la actualidad, más de 40 países permiten la aplicación de radiaciones ionizantes a alimentos en alguna de las tres modalidades, sobre todo radiación gamma y EA. Sin embargo, las normativas que regulan este tratamiento (tipo de alimentos, dosis, etc.) varían de unas naciones a otras, siendo, en todo caso, obligatorio la indicación del tratamiento en el etiquetado del producto. En este marco, adquiere importancia disponer de métodos analíticos para la estimación del tratamiento aplicado, tanto para facilitar la inspección y control legislativo como para contribuir a la confianza del consumidor en esta tecnología. En esta línea de trabajo, se han utilizado distintos métodos de análisis para, por una parte, profundizar en el estudio del efecto de la aplicación de EA en distintas matrices alimentarias y, por otra, conocer su utilidad para la trazabilidad de alimentos tratados con radiaciones ionizantes. En concreto, se ha recurrido a las espectroscopias de resonancia magnética nuclear (RMN) y de resonancia de espín electrónico (REE) y a la imagen de resonancia magnética nuclear (IRM). Todas ellas son técnicas no destructivas, que requieren una mínima cantidad de muestra para su análisis. Seguidamente, se resumen los resultados más destacados.

La IRM aporta información de la estructura de distintas matrices, a partir de las cuales se pueden cuantificar diversos parámetros, entre los que se encuentran los tiempos de relajación longitudinal (T1) y transversal (T2), y coeficiente de difusión aparente (ADC). Estos parámetros son potencialmente sensibles a modificaciones de la estructura de los tejidos. Esta técnica se ha aplicado a distintos miosistemas tratados con EA (jamón curado, cocido y salmón ahumado en frío) (Herrero y col., 2010).

La espectroscopia REE es el único método disponible para la detección directa de especies paramagnéticas en sistemas biológicos. Por tanto, puede utilizarse para evaluar la formación de radicales libres en alimentos sometidos a diversos procesos. La UE ha aceptado la REE como método estándar para la detección de alimentos irradiados que contengan residuos óseos (EN 1786, 1996), celulosa (EN 1787, 2000) o azúcar cristalizado (EN 13708, 2001). En el trabajo realizado se ha demostrado la utilidad de esta espectroscopia (Escudero y col., 2012) para evaluar el tratamiento con radiaciones ionizantes en diversos tipos de jamón habiéndose obtenido modelos de regresión que permiten relacionar la intensidad de distintas señales del espectro con la dosis aplicada. Asimismo, se ha comprobado el potencial de la espectroscopia RMN del exudado cárnico como un método no invasivo, fácil y rápido para la trazabilidad de carnes irradiadas (Escudero y col., 2013).

En colaboración con la Universidad de Milán, se han analizado, mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS), los volátiles de carne de vacuno, habiéndose identificado algunos hidrocarburos asociados al tratamiento con EA. La GC/MS de hidrocarburos es una de las técnicas admitidas para la detección de alimentos irradiados que contienen grasa (EN 1784, 2003). Los avances en este campo de análisis permitirían su mejor adaptación a la detección de carnes irradiadas.

## 3. Potencial de la aplicación de pulsos de luz (PL) para garantizar la seguridad microbiana de productos cárnicos

Los PL son una tecnología no térmica de conservación de los alimentos que consiste en la aplicación de destellos de luz blanca de amplio espectro (200-1000 nm) y corta duración ( $10^{-3}$ - $10^2$  ms). Su efecto antimicrobiano se debe principalmente al componente UV-C (200-290 nm) emitido en cada pulso, que impide la replicación celular debido a la formación de dímeros de pirimidina en el ADN. En los alimentos sólidos, dada la escasa penetración de la luz, la descontaminación tiene lugar en la superficie, por lo que esta tecnología puede ser adecuada para la higienización de algunos alimentos RTE. En el marco del subproyecto PROCARTE, y de forma similar a lo indicado en el tratamiento con EA, se han realizado diversos estudios para evaluar la eficacia listericida de los PL en productos cárnicos crudos, cocidos y crudos-cura-

dos, loncheados y envasados al vacío. Paralelamente, se ha analizado la calidad sensorial y microbiológica durante el almacenamiento en refrigeración de los productos tratados.

La inactivación de *L. monocytogenes* osciló entre reducciones de 0,3 y 0,9 log ufc/cm<sup>2</sup> en *carpaccio* de ternera, entre 0,4 y 1,8 log ufc/cm<sup>2</sup> en productos cocidos (jamón y mortadela) y entre 0,9 y 1,8 log ufc/cm<sup>2</sup> en productos crudos-curados (salchichón y lomo), con la aplicación de tratamientos comprendidos entre 0,7 y 11,9 J/cm<sup>2</sup> (Hierro y col., 2011 y 2012; Ganan y col., 2013). La menor inactivación en el *carpaccio* podría explicarse por las características estructurales de este material. La eficacia del tratamiento con PL depende no sólo de la energía aplicada, sino también de la topografía superficial. Así, la presencia de rugosidades y fisuras puede crear zonas de sombra que protejan a los microorganismos de los efectos letales del tratamiento. Los productos cocidos y crudos-curados muestran una superficie más firme que la de la carne cruda, en la que los microorganismos pueden encontrar un mayor número de cavidades donde alojarse y protegerse de la luz.

En algunos productos, la fluencia que proporcionó el mayor grado de inactivación modificó en cierta medida las propiedades sensoriales, con la aparición de una ligera decoloración, acompañada o no de notas aromáticas azufradas o ácidas según el producto. La tabla 3 ilustra los tratamientos que lograron una inactivación razonable sin afectar a la calidad sensorial.

El tratamiento PL no prolongó la vida útil del *carpaccio* ni de la mortadela, ya que fluencias superiores a 2,1 J/cm<sup>2</sup>, con las que el grado de inactivación microbiana fue bajo, modificaron las características sensoriales del producto. En cambio, en el jamón cocido, los PL ocasionaron un incremento de 30 días de la vida útil respecto al producto sin tratar (Hierro y col., 2011).

Tabla 3. Tratamientos con pulsos de luz adecuados para la inactivación de *L. monocytogenes* en la superficie de productos cárnicos RTE

| Producto                    | Fluencia (J/cm <sup>2</sup> ) | Inactivación (log ufc/cm <sup>2</sup> )±DS |
|-----------------------------|-------------------------------|--|
| <i>Carpaccio</i> de ternera | 2,1                           | 0,5 ± 0,10                                 |
| Jamón cocido                | 8,4                           | 1,8 ± 0,12                                 |
| Mortadela                   | 2,1                           | 0,7 ± 0,04                                 |
| Lomo curado                 | 11,9                          | 1,6 ± 0,15                                 |
| Salchichón                  | 11,9                          | 1,8 ± 0,19                                 |

Puede concluirse que, si bien el grado de inactivación de *L. monocytogenes* obtenido en estos estudios es menor que el que se puede conseguir con otras tecnologías no térmicas, no sería desdeñable ante la posible contaminación post-procesado en la propia industria o en un establecimiento de restauración. La tecnología PL se puede integrar fácilmente en las líneas de procesado y a un coste admisible. Además, habría que considerar el incremento de la vida útil que puede proporcionar en algunos productos. Todo ello hace de los PL una tecnología de interés potencial para la comercialización de algunos productos cárnicos RTE.

#### 4. Potencial de la aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH) y bioconservantes para garantizar la seguridad microbiológica de productos cárnicos

La tecnología de APH es un proceso físico no térmico que se emplea para eliminar microorganismos patógenos y alterantes de alimentos, lo que permite ampliar su vida útil y conseguir alimentos seguros. El tratamiento con APH se está utilizando en la práctica industrial para diversos alimentos. En este proyecto, en un afán de aportar más conocimientos acerca del poder letal de las APH, se ha profundizado en su estudio utilizando como modelos diversas

matrices cárnicas, habiéndose establecido el grado de reducción del número de diversas bacterias patógenas.

Se han demostrado efectos antimicrobianos sinérgicos de combinaciones de APH con bacteriocinas frente a diversos patógenos, aumentando su espectro de acción al sensibilizar a algunas bacterias Gram negativas. La lactoferrina (LF) es una glicoproteína cuya actividad bacteriostática se ha asociado a su capacidad de secuestrar hierro, mientras que su actividad bactericida se ha atribuido a su unión o alteración de componentes de la pared celular. Algunos de sus derivados, como su forma amidada (AMILF) y su forma digerida con pepsina (PDLF), han sido propuestos como conservantes naturales en los alimentos. Otro sistema antimicrobiano, el lactoperoxidasa (LPS), constituido por la enzima lactoperoxidasa, el ión tiocianato y el peróxido de hidrógeno, está catalogado como GRAS por la FDA.

#### 4.1. Tratamientos con APH y bioconservantes

##### 4.1.1. Efecto de la lactoferrina y derivados en sistemas tampón y en carne

La LF y sus derivados (AMILF, PDLF y su forma comercial activada ALF) ejercen una potente actividad bactericida *in vitro* (tampón Tris 50 mM, pH 7,0), con reducciones de hasta más de 7 unidades logarítmicas para LF y ALF frente a *L. monocytogenes*, y de hasta 6 para AMILF frente a *P. fluorescens*. La concentración de máxima actividad bactericida depende del tipo de lactoferrina y ciertas combinaciones logran potenciar el efecto bactericida conjunto (Del Olmo y col., 2008 y 2009). La actividad de la LF y sus derivados depende de la especie y cepa bacteriana (Del Olmo y col., 2010, 2011, 2012a y 2012b), la carga microbiana inicial (inversamente relacionada con la eficacia bactericida), la fase de crecimiento (siendo la fase exponencial la más resistente a la LF) y el polisacárido capsular (inversamente relacionado con la eficacia bactericida). El potente efecto bactericida que la LF y derivados ejercen en condiciones *in vitro* se ve muy reducido, e incluso totalmente abolido, en carne (Del Olmo y col., 2009). La presencia de iones de K, Na, P, Mg y Ca afecta a la pérdida de actividad bactericida del bioconservante y sus derivados en carne.

##### 4.1.2. Tratamientos combinados en carne de ternera y pollo

Se ensayaron tratamientos por APH de ciclo único y de ciclos múltiples en muestras de carne picada de ternera inoculada con *E. coli* O157:H7 consiguiéndose reducciones de 0,8 a 3,1 log ufc/g con tiempos de aplicación de 1 a 20 min a 400 MPa (Morales y col., 2008). Con tres ciclos de 1 min (duración total 10,5 min) se alcanzó una reducción de 3,1 log ufc/g, igual a la obtenida con un ciclo de 20 min (duración total 22,5 min). Los tratamientos de ciclos únicos aumentaron los parámetros  $L^*$  y  $b^*$  con la duración, mientras que en los de ciclos múltiples se incrementaron con el número de ciclos. La fuerza al corte aumentó hasta valores máximos con un ciclo de 10 min o con dos ciclos de 5.

Las APH (400 MPa, 10 min) aplicadas en carne de pollo mostraron un notable efecto bactericida sobre *L. monocytogenes*, *E. coli* y *P. fluorescens*, alcanzando reducciones de entre 4 y 5 unidades logarítmicas durante los 8 días de almacenamiento en refrigeración post-presurización. No obstante, se observó una cierta recuperación bacteriana tanto de las bacterias inoculadas como de la microbiota endógena del pollo. Se ensayaron tratamientos por APH de ciclo único y de ciclos múltiples sobre filetes de pechuga inoculados con una mezcla de tres cepas de *S. Enteritidis* (Morales y col., 2009). El empleo combinado de las APH (400 MPa, 10 min) y la adición de LF y sus derivados (0.5 mg/g) en este producto logró una ligera mejora de la eficacia bactericida de los antimicrobianos, probablemente por una sensibilización microbiana inducida por las APH, aunque la reducción adicional sobre la conseguida por la presurización no llegó a alcanzar 1 unidades logarítmicas.

El empleo combinado de sonicación, electrospray y tratamiento térmico con la LF y sus derivados (a 0,5 mg/g) en carne de pollo logró tan sólo una ligera potenciación de la eficacia bactericida de los antimicrobianos (inferior a 1 unidad logarítmica).

#### 4.1.3. Tratamientos combinados en carpaccio de ternera

Los niveles de *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7 inoculados en *carpaccio* de ternera no variaron durante 30 días de almacenamiento a 8 °C. La aplicación de APH para inactivar *S. Enteritidis* provocó reducciones de 3,7 y 5,9 log cfu/g a 450 MPa durante 5 y 10 min, respectivamente, mientras que el patógeno no se detectó en *carpaccio* presurizado a 450 MPa durante 15 min. Se registraron cambios en el color y la textura, mayores con los tratamientos más prolongados. Los valores de  $L^*$  aumentaron significativamente, mientras que  $a^*$  disminuyó (De Alba y col., 2012).

Con tratamientos combinados de bacteriocinas y APH a 450 MPa durante 5 min, la presurización redujo los niveles de *L. monocytogenes* en 1 unidades logarítmicas. Con las distintas bacteriocinas se consiguieron descensos de 0,2 a 1,4 unidades, y el efecto de los tratamientos combinados fue aditivo. Los recuentos de *S. Enteritidis* disminuyeron 4,1 unidades logarítmicas por la APH, no resultaron afectados por las bacteriocinas, ni se observó actividad antimicrobiana sinérgica. Sin embargo, con la APH se consiguieron reducciones de *E. coli* O157:H7 de 2,7 unidades logarítmicas, las bacteriocinas no afectaron a su supervivencia, y el efecto de la combinación fue sinérgico con las enterocinas A y B, la pediocina y la nisina, con tasas de inactivación 2 unidades logarítmicas superiores a las alcanzadas con la suma de los tratamientos individuales. Las APH sensibilizarían a las células de *E. coli* O157:H7 frente a las bacteriocinas, dando lugar al efecto sinérgico.

La ALF o el sistema LPS no inactivaron a *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* o *E. coli* O157:H7 en *carpaccio* mantenido durante 7 días a 8 ó 22 °C, mientras que los tratamientos a 450 MPa durante 5 min redujeron los niveles entre 1 y 3 log ufc/g, permaneciendo este efecto durante los 7 días incluso a 22 °C. Se registró un efecto antimicrobiano sinérgico de la combinación LPS con APH frente a *E. coli* O157:H7.

#### 4.1.4. Tratamientos combinados en jamón curado y en jamón cocido

Se han aplicado tratamientos de 400, 500 y 600 MPa durante 5 min a lonchas de jamón curado contaminadas con *S. Enteritidis* y mantenidas a 8 °C durante 60 días (De Alba y col., 2012). En jamón no presurizado los niveles de *S. Enteritidis* decrecieron aproximadamente 2 log ufc/g durante los 60 días de almacenamiento. Tras la aplicación de 400, 500 y 600 MPa, los niveles disminuyeron 1,6, 3,0 y 4,8 log ufc/g, respectivamente. En jamón presurizado a 600 MPa no se detectó el patógeno desde el día 7 hasta el final del periodo de almacenamiento. A los 60 días, se registraron valores de 4,0 log ufc/g en jamón no presurizado y de 1,4 log ufc/g en jamón tratado a 400 y 500 MPa. La presurización provocó una ligera tonalidad pálida del producto, con valores superiores de  $L^*$  y menores de  $a^*$  en las muestras presurizadas con mayor intensidad.

Los tratamientos de APH a 400 y 500 MPa durante 10 min resultaron efectivos en la inactivación de *E. coli* O157:H7 en jamón curado loncheado, aunque las reducciones fueron bajas. Los tratamientos con nisina o pediocina no afectaron a la supervivencia del patógeno. Sin embargo, con APH combinadas con nisina se registró un efecto antimicrobiano sinérgico. Los cambios en la textura fueron mínimos, mientras que los valores de  $L^*$  fueron afectados por la presurización a 500 MPa, tendiendo a disminuir las diferencias durante el almacenamiento, como también ocurrió con los valores de  $a^*$  (De Alba y col., 2013).

La ALF o el LPS aplicados individualmente no afectaron a *L. monocytogenes* ni a *S. Enteritidis* en jamón curado, mientras que 450 MPa durante 10 min redujeron los niveles 0,6 y 2,2 unidades logarítmicas, respectivamente. La combinación de la APH con estos bioconservantes resultó sinérgica frente a *S. Enteritidis*.

En la superficie del jamón cocido se observó una acción bactericida inmediata de las enterocinas A y B (2000 AU/g), con reducciones de *L. monocytogenes* de 1,3 unidades logarítmicas. Sin embargo, las bacteriocinas no tuvieron capacidad bacteriostática ni modificaron la tasa de crecimiento durante el posterior almacenamiento a 4 °C. Mediante APH (600 MPa, 5 min) se consiguió reducir el nivel de patógeno por debajo del límite de detección (ausencia en 25 g) durante 14 y 21 días de almacenamiento sin y con enterocinas A y B, respectivamente (Jofré y col., 2011).

4.2. Modelización matemática del efecto de las APH en el comportamiento de *L. monocytogenes* en productos cárnicos cocidos RTE

4.2.1. Inactivación por APH

Se ha modelizado (Hereu y col., 2012a) la cinética de inactivación por APH (300- 800 MPa) de *L. monocytogenes* en productos cárnicos con diferente contenido en grasa (jamón cocido con ca. 4,5% y mortadela con ca. 17%). Debido a la presencia de “colas”, principalmente a presiones superiores a 450 MPa (Figura 1), el modelo primario log-lineal con cola fue el más adecuado para describir la cinética de inactivación. Se han desarrollado dos modelos, uno para cada alimento, jamón cocido y mortadela (Hereu y col., 2012a).

La validez de las predicciones de los modelos desarrollados se comprobó, tanto en condiciones dinámicas (i) como estáticas (ii):

- i) Mediante el desarrollo de un sistema de integración tiempo-presión para calcular el efecto acumulado del incremento de presión durante el periodo de subida de ésta (*come-up*) se comprobó la concordancia entre los valores estimados y los observados.
- ii) Los valores de  $k_{max}$  (tasa de inactivación) que predicen los modelos desarrollados se compararon con valores determinados experimentalmente (observados) en diferentes alimentos. En productos cárnicos los valores de sesgo ( $B_f=1,01$ ) y exactitud ( $A_f=1,24$ ) fueron muy satisfactorios. El valor de exactitud nos indica que el error que puede cometerse al aplicar el modelo debe ser menor del 24%, mientras que un sesgo por encima de la unidad nos dice que las predicciones estiman un número de supervivientes mayor del que realmente deben quedar tras el tratamiento con APH. Es decir, es un modelo seguro.

La satisfactoria validación, tanto dinámica como estática, de los modelos desarrollados utilizando datos externos e independientes apoyan su idoneidad para fines predictivos para productos cocidos RTE, como establecer o fijar los criterios de proceso necesarios para cumplir con los FSO. Así, a través de los diagramas de isoreducción (Figura 1) se deduce que para conseguir el criterio de funcionamiento de 4 unidades logarítmicas de reducción, mediante un procesado con APH durante 3 min, se requerían presiones de entre 500 y 525 MPa para los productos cárnicos cocidos magros (tipo jamón cocido) y más grasos (tipo mortadela), respectivamente (Hereu y col., 2012a).

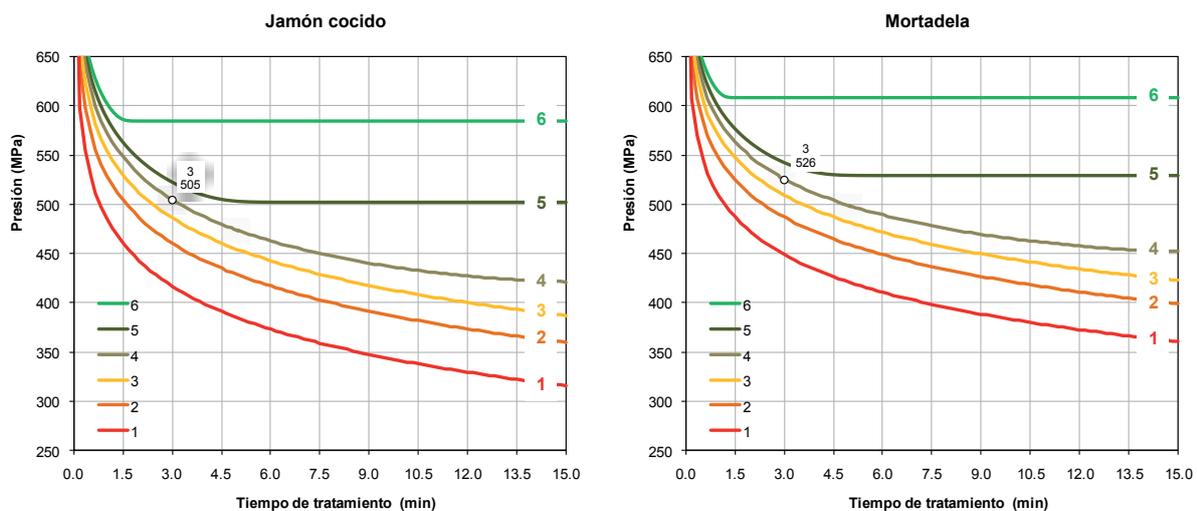


Figura 1. Líneas de isoreducción ( $\log N/N_0$ ) de *L. monocytogenes* en productos cárnicos cocidos RTE en función de la presión y tiempo de tratamiento.

#### 4.2.2. Comportamiento durante el almacenamiento en refrigeración posterior a la presurización

Se ha modelizado el crecimiento de *L. monocytogenes* en jamón cocido y mortadela presurizados (400 MPa, 5 min), según el inóculo ( $10^7$  y  $10^4$  ufc/g) y el estado fisiológico (después del crecimiento a 8 °C y estrés a -80 °C), durante la refrigeración (4 a 12 °C) (Hereu y col., 2012b). El nivel de inóculo no tuvo un efecto significativo. Sin embargo, las características del producto y el estado fisiológico del patógeno ejercieron una influencia significativa, siendo las células previamente crecidas en refrigeración más sensibles a las APH que las sometidas a congelación. De acuerdo con estos resultados y con los de Bover-Cid y col. (2011), el efecto del estado fisiológico del patógeno es dependiente de las condiciones del medio (es decir, matriz alimentaria) en el que se encuentra durante la aplicación de las APH (Hereu y col., 2012a). La APH no afectó a la tasa específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), independientemente del nivel de inóculo, el estado fisiológico de *L. monocytogenes* y el tipo de producto. La fase de latencia de *L. monocytogenes* estresadas por congelación se prolongó de forma significativa (3 días a 12 °C y 25 a 4 °C) en comparación con las células mantenidas en refrigeración (Hereu y col., 2012b; Bover-Cid y col., 2013). Los periodos de latencia en mortadela fueron ligeramente más largos que en jamón cocido.

#### 4.3. Efecto de las APH sobre la formación de compuestos volátiles

En carne picada de vacuno el tratamiento a 400 MPa durante 10 min tuvo un efecto significativo sobre 22 de los 62 compuestos volátiles encontrados después de 3 días a 4 °C, y en pechuga de pollo sobre 18 de los 53 compuestos analizados (Rivas-Cañedo y col., 2009a).

En jamón Serrano (Rivas-Cañedo y col., 2009b) se encontraron 108 compuestos volátiles, de los cuales 38 se vieron afectados por el tratamiento a 400 MPa. El efecto de las APH en jamón fue menor que en las carnes frescas. Sus condiciones fisicoquímicas (alto contenido en sal, baja  $a_w$ ) no favorecen el crecimiento bacteriano. Únicamente en la superficie se desarrollan levaduras y mohos, que se asocian con la formación de cetonas insaturadas, 2-alcanoles y estireno.

En salchichón se encontraron 109 compuestos volátiles, de los que 33 se vieron afectados por la APH a 400 MPa (Rivas-Cañedo y col., 2009c). La fracción volátil estuvo dominada por terpenos procedentes de las especias añadidas. En paleta cocida de cerdo (Rivas-Cañedo y col., 2011a) se encontraron 126 compuestos volátiles, 98 de ellos afectados por los tratamientos a 400, 500 ó 600 MPa durante 5 ó 10 min a lo largo de 28 d a 4 °C.

El elevado número de volátiles presentes en carne y productos cárnicos aconseja el empleo de más de una técnica de extracción (Rivas-Cañedo y col., 2011b y 2012).

## 5. Sensibilidad de virus modelo a distintos tratamientos no térmicos

La seguridad de los alimentos requiere controlar y eliminar los potenciales patógenos de naturaleza vírica de transmisión alimentaria. En PROCARTE se ha estudiado la inactivación, mediante tres tecnologías no térmicas, PL, EA y APH (Bosch y col., 2011), de los virus entéricos más relevantes de transmisión alimentaria: los Norovirus Genogrupo I y II (NoV GGI, NoV GGII), agentes más frecuentes de brotes de gastroenteritis de origen alimentario y su modelo propagable *in vitro* Norovirus murino tipo-1 (MNV-1) y el virus de la hepatitis A (HAV) causante de la enfermedad de mayor gravedad dentro de las más frecuentes de transmisión por alimentos. Las experiencias se han realizado utilizando como modelo jamón cocido RTE.

En el caso de los tratamientos con EA, se han aplicado entre 1 y 16 kGy observándose que, conforme se aumentaba la dosis se incrementaba la caída del título infeccioso de los virus. Sin embargo, aplicando la dosis máxima recomendada de 10 kGy, sólo se consiguió inactivar entre 1,8 y 1,9 unidades logarítmicas en el caso del HAV y entre 2,7 y 2,9 unidades logarítmicas para el MNV-1. Dosis elevadas de hasta 16 kGy aumentaron la inactivación de los virus HAV y MNV-1, alcanzándose en éste último valores máximos de hasta 4 unidades logarítmicas (Beguiristain y col., 2011).

Por otra parte, tras la aplicación de PL de hasta 20 J/cm<sup>2</sup>, la máxima inactivación experimental observada fue de 2,9 unidades logarítmicas en el caso del HAV y 2,6 unidades logarítmicas en el caso del MNV-1. Cuando se aplicaron dosis más bajas, dentro de las permitidas por la FDA, como 12 J/cm<sup>2</sup>, el grado de inactivación fue de 2,3 y 2,0 unidades logarítmicas, para el HAV y MNV-1, respectivamente.

Con el objetivo de conocer con mayor profundidad el mecanismo de acción de las tecnologías más eficaces para inactivar virus, se utilizaron poblaciones complejas de HAV adaptadas a crecer en ausencia y presencia de actinomicina D, a concentraciones de 0,05 y 0,2 mg/ml. En ambos casos, se emplearon poblaciones adaptadas durante un periodo de tiempo corto o largo.

Las poblaciones adaptadas a actinomicina D, con sus potenciales cambios de plegamiento de la cápside podrían dar lugar a cápsides con mayor o menor grado de alteración, por lo que podrían ser excelentes modelos para esclarecer si los mecanismos de inactivación (en APH y PL) están relacionados con las conformaciones que adoptan dichas cápsides.

Los resultados mostraron que las poblaciones sometidas a la concentración más alta de actinomicina, son más sensibles a las APH, lo que pone de manifiesto la relación de inactivación del virus en función del grado de estructuración de sus cápsides. Sin embargo, cuando se sometieron dichas poblaciones a PL de 20 J/cm<sup>2</sup>, el efecto fue similar en todas las poblaciones, observándose caídas en la infectividad del virus de 6 unidades logarítmicas. Estos resultados muestran que el efecto mayoritario de los PL podrían ser a nivel de ácido nucleico, al contrario que las APH cuyo efecto parece estar directamente relacionado con la conformación de la cápside del virus.

## 6. Inactivación de microorganismos mediante fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos

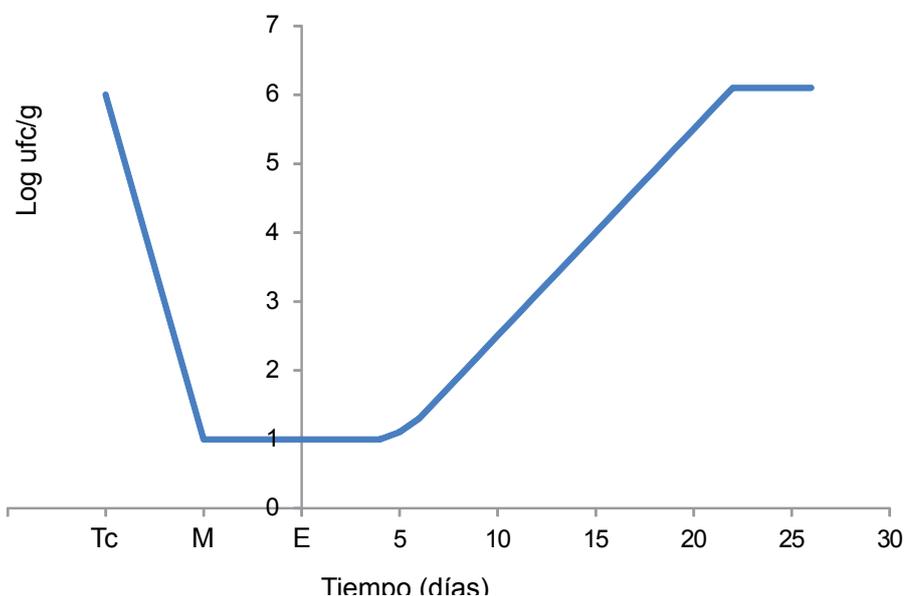
En el contexto del subproyecto PROCARTE, se han estudiado las cinéticas de inactivación de *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* mediante la aplicación de ultrasonidos (US) en combinación con CO<sub>2</sub>-supercrítico (FSC) (Ortuño y col., 2012a, 2012b). Las experiencias se realizaron inicialmente en distintos medios líquidos (medio de cultivo, zumo de manzana y de naranja), donde se han ensayado diferentes presiones (10-35 MPa) y temperaturas (31-41 °C). Cuando sólo se aplicó el tratamiento con FSC, la velocidad de inactivación aumentó con la presión y la temperatura del proceso. En el caso de *E. coli* en medio de cultivo, el tiempo promedio requerido (en las diferentes condiciones de proceso) para conseguir una reducción de 8 unidades logarítmicas fue de 50 min. La inactivación fue más lenta en zumos, probablemente debido al efecto protector ejercido por los componentes del alimento. En el proceso combinado de FSC+US, el tiempo de inactivación se redujo en un 95% para conseguir el mismo grado de reducción que con FSC. De esta forma, para *E. coli* se requirieron 2 min a 31 °C y 22,5 MPa para alcanzar la mencionada reducción de 8 unidades logarítmicas y el efecto de la presión, temperatura, y tipo de medio se minimizó. Aplicando FSC, las cinéticas de inactivación de *S. cerevisiae* fueron más lentas que para *E. coli*, lo que puede atribuirse a un mayor grosor de su pared celular (Ortuño y col., 2012b). Sin embargo, aplicando FSC+US los resultados obtenidos en ambos microorganismos fueron muy similares. Estos resultados sugieren que la aplicación simultánea de FSC+US reduce el efecto de las variables de proceso (incluido tipo de microorganismo).

Adicionalmente, se han llevado a cabo pruebas preliminares para evaluar la eficacia del mismo tratamiento en una matriz sólida y el efecto del contenido de agua en el medio. Para ello, se ha utilizado pechuga de pollo y solución isotónica. Los resultados obtenidos indican que mediante el uso de US es posible acelerar el proceso de inactivación de *E. coli* y la eficacia se potencia con el incremento de la adición de solución isotónica.

Los resultados obtenidos sugieren que esta novedosa tecnología no térmica tiene un elevado potencial para la higienización de alimentos, especialmente líquidos. Además, las suaves condiciones de procesado permitirían mantener sus características sensoriales y nutritivas.

## 7. Análisis de la variabilidad de la destrucción microbiana

Por regla general, si se pretende estudiar la evolución de un microorganismo en un alimento, se toman unas cuantas muestras, quizás 3 ó 5, en diferentes etapas del proceso de elaboración; se obtendrá después la media de los recuentos microbianos y podrá construirse una gráfica similar a la mostrada a continuación.



**Figura 2.** Representación esquemática de la evolución de la carga microbiana de un alimento sometido a un proceso conservante y después almacenado a una temperatura compatible con el desarrollo microbiano. Materia prima (M). Tratamiento conservante (Tc). Envasado (E).

En la figura 2 se aprecia que la materia prima contenía, de media,  $10^6$  ufc/g, cantidad que se redujo a  $10^1$  ufc/g tras la aplicación del tratamiento de conservación, cifra que se mantuvo durante el envasado y unos cuantos días (fase de latencia), para luego comenzar a crecer paulatinamente a lo largo del almacenamiento hasta, finalmente, estabilizarse en torno a  $10^6$  ufc/g en la fase estacionaria. Todas las cifras serán medias de las muestras analizadas.

En el marco del proyecto se ha puesto de manifiesto que tanto la inactivación microbiana (Aguirre y col., 2009, 2011 y 2012a) como la duración de la fase de latencia (Aguirre y col., 2011, 2012a, 2012b y 2013) están sujetas a cierta variabilidad que, afortunadamente, sigue unas reglas y, por tanto, es cuantificable. Cuanto más intenso es el tratamiento aplicado (térmico, de irradiación u otro) en un alimento, menor es el número de supervivientes, pero este número es más variable (Aguirre y col., 2009, 2011 y 2012a). Los incrementos de la variabilidad de la inactivación microbiana conforme se intensifica el tratamiento higienizante justifican la aplicación de tratamientos “sobredimensionados”, más intensos de los estrictamente necesarios, predichos por los valores D y z. Piénsese que el valor D a una determinada temperatura es una media que se ha obtenido con una serie de datos experimentales que, en realidad, se caracterizan por estar más o menos dispersos, dispersión que se cuantifica con la desviación estándar.

Obsérvese la figura 3 para una mejor comprensión del alcance práctico de tal variabilidad. Para aplicar la variabilidad de la inactivación en la práctica deben utilizarse distribuciones de frecuencias en las que se refleje la probabilidad de que, tras aplicar un determinado tratamiento microbicida, se logre una inactivación determinada. ¿Qué significa esta variabilidad a nivel práctico? Considérese un ejemplo: a la vista de la figura 3, si la carga inicial en un producto coincide con la mostrada en esa figura, y se fija un FSO de 2 células por envase, debería aplicarse un tratamiento de 6,1 ciclos logarítmicos para lograrlo. Pero ese tratamiento dejaría 2

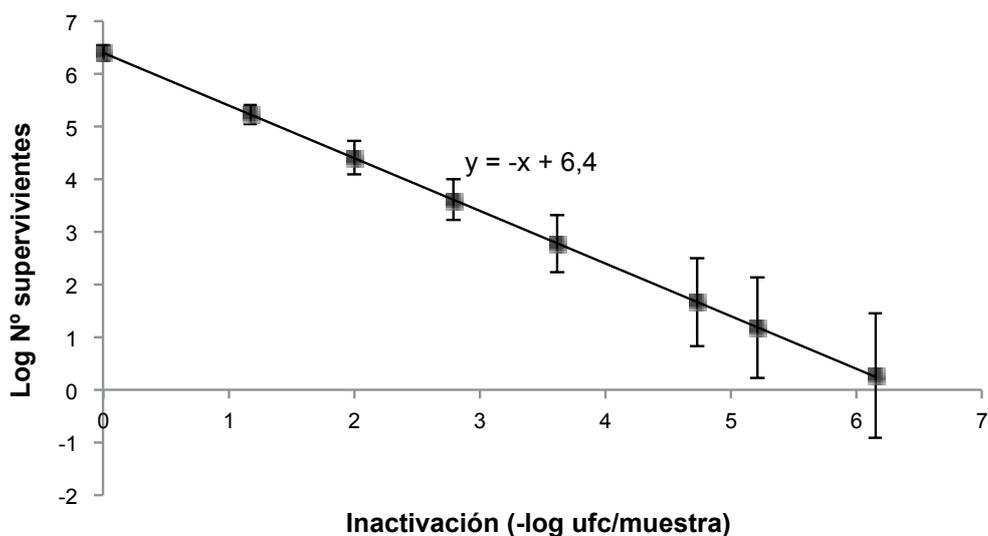


Figura 3. Inactivación de *L. innocua* en TSB a 54 °C. Se muestran las medias del número de supervivientes  $\pm 1,96 \times DS$ , lo que indica que entre los extremos de las barras se incluyen el 95% de los datos. Cada punto es media de unas 70 determinaciones, excepto el dato de muestras no tratadas, que es media de 10.

células, de media, por envase y no 2 viables en todos los envases. Es muy probable que haya envases sin viables y, claro está, otros que contengan más de 2. Para poder determinar qué probabilidad se tiene de que haya un determinado número de supervivientes en un envase, ha de modelarse la variabilidad. Para ello se representa el efecto de la inactivación en la desviación estándar (Figura 4).

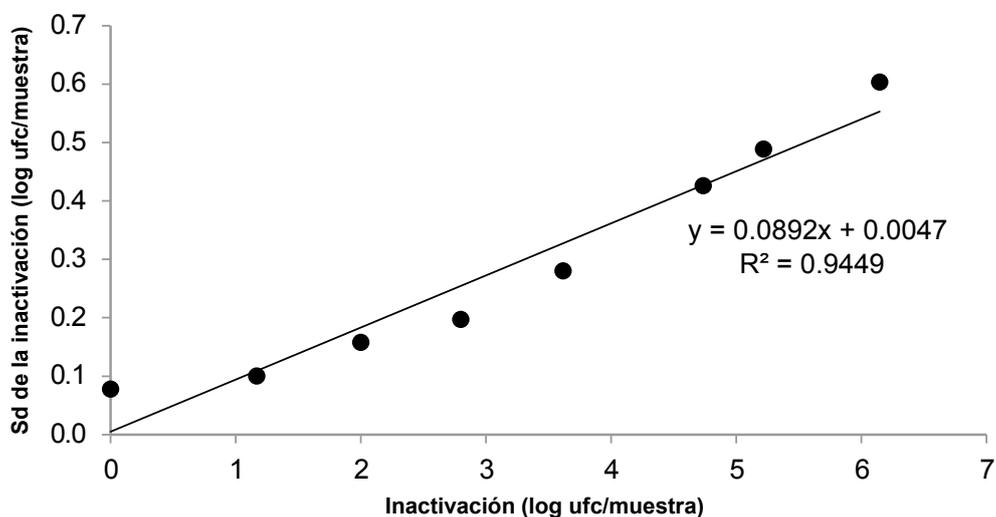


Figura 4. Efecto de la inactivación en el grado de variabilidad de la inactivación en términos de la desviación estándar de los datos de la figura 3.

Con ayuda de las ecuaciones de las figuras 3 y 4, se obtienen los datos necesarios para simular distribuciones normales de frecuencia, calculadas con la función DISTR.NORM de Microsoft Excel. De esta manera, para tener 2 células de media por envase hay que aplicar un tratamiento de 6,1 ciclos, predicho por la ecuación mostrada en la figura 3, y este tratamiento conlleva una DS de 0,5488 (predicha por la ecuación mostrada en la figura 5). Con estos datos se obtiene la distribución de frecuencias del número de supervivientes mostrada en la figura 5.

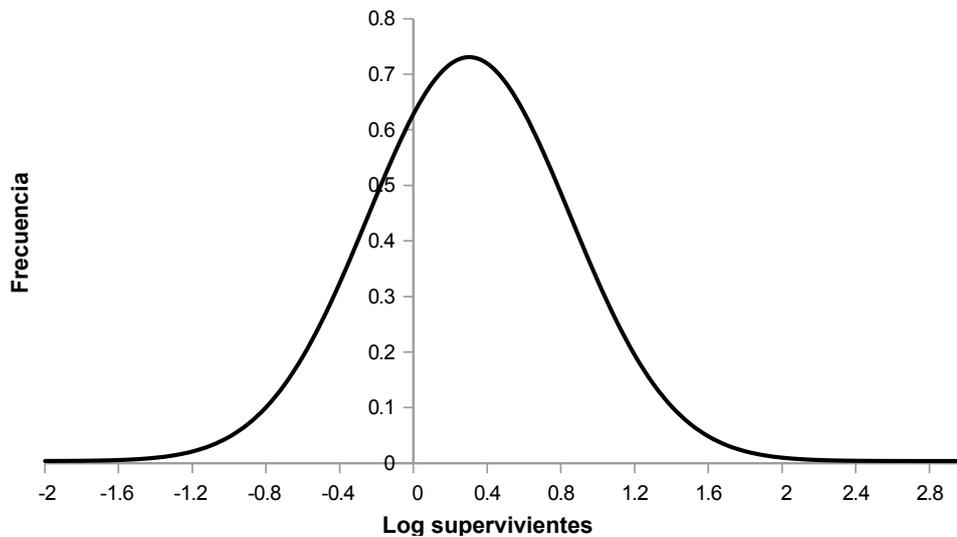


Figura 5. Distribución de frecuencias del número de supervivientes para una media de 2 ( $\log 2 = 0,3010$ ) y una DS de 0,5488.

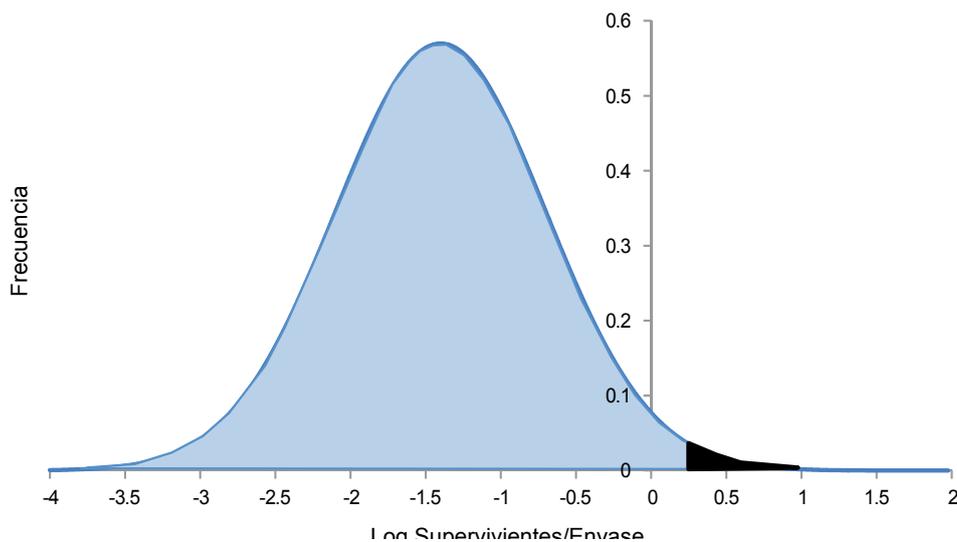


Figura 6. Distribución de frecuencias del número de supervivientes para que existan 2 células o más en el 1% de los envases. Zona más oscura de la gráfica.

Es evidente que la mitad de los envases de ese supuesto lote contendrán menos de 2 células y la otra mitad más. Parece obvio que este resultado no debe satisfacer a una industria cuyo FSO sea que sus envases contengan 2 o menos células. Entonces, ¿qué tratamiento debe aplicarse en este ejemplo para que un determinado porcentaje, pequeño, por ejemplo el 1%, de los envases contengan 2 o menos células? La respuesta está en las predicciones de los modelos aquí desarrollados. En efecto, si el tratamiento térmico aplicado hubiera sido de 7,8 ciclos logarítmicos, la media de supervivientes sería de 0,04 por envase, con una DS de 0,70, lo que arrojaría la distribución de frecuencias mostrada en la figura 6 en la que el área encerrada en la esquina de la derecha (más oscura), supone el 1% del total, que representa el porcentaje de muestras que contendrán 2 o más células.

La aplicación de estos modelos debe permitir a la industria aquilatar lo más posible el tratamiento microbicida a aplicar para conseguir un FSO concreto.

## 8. Conclusiones

Como resultado de las distintas investigaciones realizadas se han determinado las condiciones óptimas para el tratamiento con electrones acelerados, la viabilidad de los pulsos de luz y se han establecido distintas estrategias para potenciar el efecto de las altas presiones hidrostáticas, con el objetivo común de garantizar la seguridad alimentaria de distintos tipos de productos cárnicos y prolongar su vida útil. Al finalizar el subproyecto PROCARTE puede decirse de forma concluyente que es posible ofrecer al sector industrial distintas tecnologías para asegurar el cumplimiento de los objetivos de seguridad alimentaria en relación con los microorganismos patógenos más relevantes de acuerdo a las normativas de los distintos países.

## Equipos participantes

Los resultados que se recogen en este capítulo derivan de las investigaciones realizadas en las distintas acciones realizadas por los equipos que han participado en el subproyecto PROCARTE que han sido coordinadas por T. Aymerich (IRTA, Monells), A. Bosch (UB), J. Benedito (UPV), G. García de Fernando (UCM), M. Fernández y E. Hierro (UCM), M. Núñez y M. Medina (INIA), J. A. Ordóñez, L. de la Hoz (†) y M.I. Cambero (UCM).

## Agradecimientos

Las investigaciones que recogen este capítulo ha sido llevada a cabo en el marco del Proyecto Consolider-Ingenio 2010 CARNISENUSA CSD2007-00016, en colaboración con los siguientes proyectos: AGL2007-65235-C02-01/ALI, AGL2007-65235-C02-02/ALI, AGL2010-19158, AGL2010-16598, AGL2010-16600, AGL2011-29325 (Ministerio de Economía y Competitividad), CPE03-012-C3-02 (INIA), S-505/AGR-0314 (TEMINYSA) (Comunidad de Madrid) y BSCH-UCM GR58/08 (Gr.Nº. 920276) (Universidad Complutense).

## 9. Bibliografía

- Aguirre, J.S., Pin, C., Rodríguez, M.R, García de Fernando, G.D. 2009. Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. *Applied Environmental Microbiology* 75, 6992-6997.
- Aguirre, J.S., Rodríguez, M.R, García de Fernando, G.D. 2011. Effects of electron beam irradiation on variability of the number of survivors and on duration of lag phase of four food-borne organisms. *International Journal of Food Microbiology* 149, 236-246.
- Aguirre, J., Ordóñez, J.A., García de Fernando, G.D. 2012a. A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of *Bacillus cereus* inactivation and lag phase duration of surviving cells. *International Journal of Food Microbiology* 153, 444-452.
- Aguirre, J., Bravo, M.C., Ordóñez, J.A., García de Fernando, G.D. 2012b. The Poisson distribution is applied to improve the estimation of individual cell and micropopulation lag phases. *Advances in Microbiology* 2, 146-161.
- Aguirre, J., Gonzalez, A., Özçelik, N., Rodríguez, M.R., García de Fernando, G.D. 2013. Modeling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability. *International Journal of Food Microbiology* 164, 60-69.
- Beguiristain, N., Fuentes, C., Pintó, R., Bosch, A. 2011. Nuevas técnicas de eliminación de virus en alimentos. En: Ordóñez, J.A., Córdoba, J.J., Ventanas, J. (Eds.), *Productos Cárnicos para el Siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables*. Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones, Cáceres, pp. 197-200.
- Benedito, J.J., Martínez-Pastor, M.T., Mulet, A., Ortuño, C., Peña, R. 2011. Procedure of inactivation microorganisms by combination of supercritical fluids and ultrasound. Spain. Patent No. P201131099. 1.
- Benedito, J., Cambero, M.I., Ortuño, C., Cabeza, M.C., Ordóñez, J.A., de la Hoz, L. 2011. Modeling and optimization of sensory changes and shelf-life in vacuum packaged cooked ham treated by E-beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* 80, 505-513.

- Bosch, A., Beguiristain, N., Fuentes, C., Pintó, R.M. 2011. Nuevas técnicas de eliminación de virus en alimentos. *Virología* 14, 133-134.
- Bover-Cid, S., Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T. 2013. Effects of the physiological state of *Listeria monocytogenes* and high pressure processing on relative lag times during growth in chilled RTE cooked meat product. 8th International Conference on Predictive Modeling of Food, París.
- Bover-Cid, S., Hereu, A., Garriga, M., Aymerich, T. 2011. Pre-culture conditions and food characteristics influence the high pressure resistance of *Listeria monocytogenes* on RTE cured meat products. Summer Conference of the Society for Applied Microbiology, Dublin.
- Cabeza, M.C., Cambero, M.I., Hoz, L., Ordóñez, J.A. 2007. Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 299-305.
- Cabeza, M.C., Cambero, M.I., Nuñez, M., Medina, M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A. 2010. Lack of growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in temperature abuse of E-beam treated ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Food Microbiology* 27, 777-782.
- Cabeza, M.C., de la Hoz, L., Velasco, R., Cambero, M.I., Ordóñez, J.A. 2009. Safety and quality of ready-to-eat dry fermented sausages subjected to E-beam radiation. *Meat Science* 83, 320-327.
- Cabeza, M.C., de la Hoz, L., Cambero, M.I., Velasco, R., García-Márquez, I., Manzano, S., Ordóñez, J.A. 2011. Higienización y vida útil de alimentos listos para su consumo (RTE) Tratados con electrones acelerados. En: Ordóñez, J.A., Córdoba, J.J., Ventanas, J. (Eds), *Productos Cárnicos para el Siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables*. Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones, Cáceres, pp. 167-177.
- Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Ordóñez, J.A., Hoz, L. 2008. Estudio de la penetración de electrones acelerados para optimizar su aplicación en un alimento compuesto por ingredientes heterogéneos. CE-SIA-CIBSA II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria y V Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Barcelona.
- Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Escudero, R., Manzano, S., García-Márquez, I., Velasco, R., Ordóñez, J.A. 2012. Sanitation of selected ready-to-eat intermediate-moisture foods of animal origin by E-beam irradiation. *Foodborne Pathogens and Disease* 9, 594-599.
- Cambero, M.I., Roncalés, P., Manzano, S., Cabeza, M.C., Escudero, R., Velasco, R., García Márquez, I., Ordóñez, J.A. 2012. Strategies to retain the red colour of ground meat E-Beam treated and effects on the shelf-life and safety. *International Congress of Chemical Engineering*. ANQUE ICCE, Sevilla.
- De Alba, M., Bravo, D., Medina, M. 2012. High pressure treatments on the inactivation of *Salmonella* Enteritidis and the characteristics of beef carpaccio. *Meat Science* 92, 823-828.
- De Alba, M., Montiel, R., Bravo, D., Gaya, P., Medina, M. 2012. High pressure treatments on the inactivation of *Salmonella* Enteritidis and the physicochemical, rheological and color characteristics of sliced vacuum-packaged dry-cured ham. *Meat Science* 91, 173-178.
- De Alba, M., Bravo, D., Medina, M. 2013. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in dry-cured ham by high pressure treatments combined with biopreservatives. *Food Control* 31, 508-513.
- Del Olmo, A., Morales, P., Nuñez, M. 2008. Bactericidal effect of lactoferrin and its amidated and pepsin digested derivatives on *Pseudomonas fluorescens*: influence of environmental and physiological factors. *Journal of Food Protection* 71, 2468-2474.
- Del Olmo, A., Morales, P., Nuñez, M. 2009. Bactericidal effect of lactoferrin and its amidated and pepsin digested derivatives against *Pseudomonas fluorescens* in ground beef and meat fractions. *Journal of Food Protection* 72, 760-765.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M. 2010. Antimicrobial effect of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives against *Salmonella* Enteritidis and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science* 93, 3965-3969.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M. 2011. Antimicrobial efficacy of lactoferrin, its amidated and pepsin-digested derivatives, and their combinations, on *Escherichia coli* O157:H7 and *Serratia liquefaciens*. *Letters in Applied Microbiology* 52, 9-14.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M. 2012. Effect of lactoferrin and its derivatives against gram-positive bacteria *in vitro*, and combined with high pressure, in chicken breast fillets. *Meat Science* 90, 71-76.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M. 2012. Effect of lactoferrin and its derivatives, high hydrostatic pressure, and their combinations, on *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas fluorescens* in chicken fillets. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 13, 51-56.

- Escudero, R., Valhondo, M., Ordóñez, J.A., de la Hoz, L., Cabeza, C., Velasco, R., Cambero, M.I. 2012. Electron spin resonance (ESR) spectroscopy study of dry-cured ham treated with E-beam. *Food Chemistry* 133, 1530-157.
- Escudero, R., García-García, A.B., Cambero, M.I., Ordóñez, J.A., Romero de Ávila, M.D., Castejón, D. 2013. Viabilidad del análisis de exudados cárnicos por resonancia magnética nuclear (RMN) para el estudio de carne tratada con electrones acelerados. Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria. ACO-FESAL, Madrid.
- Ganan, M., Hierro, E., Hospital, X.F., Barroso, E., Fernández, M. 2013. Use of pulsed light to increase the safety of ready-to-eat cured meat products. *Food Control* 32, 512-517.
- García-Márquez, I., Cambero, M.I., Ordóñez, J.A., Cabeza, M.C. 2012a. Shelf-life extension and sanitation of fresh pork loin by E-beam treatment. *Journal of Food Protection* 75, 2179-2189.
- García-Márquez, I., Escudero, R.M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Cambero M.I.; Lozada, J.J. Santos-Delgado, M.J., Polo-Díez, L.M. 2010. Cholesterol oxides in irradiated raw and marinated pork loin. 3rd EuChems Chemistry Congress, Nürnberg.
- García-Márquez, I., Narváez-Rivas, M., Gallardo, E., Cabeza, M.C., León-Camacho, M. 2013. Changes in the phospholipid fraction of intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage. *Grasas y Aceites* 64, 7-14.
- García-Márquez, I., Ordóñez, J.A., Cambero, M.I. y Cabeza, M.C. 2012b. Use of E-beam for shelf-life extension and sanitizing of marinated pork loin. *International Journal of Microbiology* 2012:962846 doi: 10.1155/2012/962846.
- Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T., Bover-Cid, S. 2012a. Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16, 305-315
- Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T., Bover-Cid, S. 2012b. Modeling the growth response of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products after high pressure processing. 23rd International ICFMH Symposium. FoodMicro, Istanbul.
- Herrero, A.M., Castejón, D., Hoz, L., Ordóñez, J.A., Cambero, M.I. 2010. Imagen de Resonancia magnética nuclear de salmón ahumado tratado con electrones acelerados. CESIA-CIBSA 2010. VI Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Logroño.
- Hierro, E., Barroso, E., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Manzano, S., Fernández, M. 2011. Efficacy of pulsed light for shelf-life extension and inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat cooked meat products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, 275-281.
- Hierro, E., Ganan, M., Barroso, E., Fernández, M. 2012. Pulsed light treatment for the inactivation of selected pathogens and the shelf-life extension of beef and tuna *carpaccio*. *International Journal of Food Microbiology* 158, 42-48.
- Hoz, L., Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Herrero, A.M., Ordóñez, J.A. 2008 Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by E-beam irradiation. *Journal of Food Protection* 71, 2001-2006.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 2004. Microorganismos de los Alimentos 7. Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Jofré, A., Aymerich, T., Valdivia, E., Garriga, M. 2011. Control de *L. monocytogenes* en jamón cocido loncheado mediante la aplicación combinada de enterocinas y alta presión hidrostática. 5ª Reunión de la Red Temática de BAL, Logroño.
- Morales, P., Calzada, J., Ávila, M., Nuñez, M. 2008. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef by single-cycle and multiple-cycle high pressure treatments. *Journal of Food Protection* 71, 811-815.
- Morales, P., Calzada, J., Rodríguez, B., De Paz, M., Nuñez, M. 2009. Inactivation of *Salmonella* Enteritidis in chicken breast fillets by single-cycle and multiple-cycle high pressure treatments. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 577-581.
- Olmo, A., Morales, P., Nuñez, M. 2009. Bactericidal effect of lactoferrin and its amidated and pepsin digested derivatives against *Pseudomonas fluorescens* in ground beef and meat.
- Ordóñez, J.A., Cabeza, M., de la Hoz, L., Cambero, M.I. 2007. Uso de radiaciones beta para conseguir el objetivo de seguridad alimentaria (FSO) en carne de pollo con respecto a *Salmonella* spp. *Revista del Comité Científico de la AESAN* 6, 67-87.
- Ortuño, C., Martínez Pastor, M.T., Mulet, A., Benedito, J. 2012a. An ultrasound-enhanced system for microbial inactivation using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 15, 31-37.

- Ortuño, C., Martínez Pastor, M.T., Mulet, A., Benedito, J. 2012b. Supercritical carbon dioxide inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in different growth stages. *Journal of Supercritical Fluids* 63, 8-15.
- Rivas-Cañedo, A., Fernández-García, E., Nuñez, M. 2009a. Volatile compounds in fresh meats subjected to high pressure processing. Effect of the packaging material. *Meat Science* 81, 321-328.
- Rivas-Cañedo, A., Fernández-García, E., Nuñez, M. 2009b. Volatile compounds in dry-cured Serrano ham subjected to high pressure processing. Effect of the packaging material. *Meat Science* 82, 162-169.
- Rivas-Cañedo, A., Nuñez, M., Fernández-García, E. 2009c. Volatile compounds in Spanish dry-fermented sausage 'salchichón' subjected to high pressure processing. Effect of the packaging material. *Meat Science* 83, 620-626.
- Rivas-Cañedo, A., Juez-Ojeda, C., Nuñez, M., Fernández-García, E. 2011a. Effects of high pressure processing on the volatile compounds of sliced cooked pork shoulder during refrigerated storage. *Food Chemistry* 124, 749-758
- Rivas-Cañedo, A., Juez-Ojeda, C., Nuñez, M., Fernández-García, E. 2011b. Volatile compounds in ground beef subjected to high pressure processing. A comparison of dynamic headspace and solid-phase microextraction. *Food Chemistry* 124, 1201-1207.
- Rivas-Cañedo, A., Juez-Ojeda, C., Nuñez, M., Fernández-García, E. 2012. Volatile compounds in low-acid fermented sausage "espetec" and sliced cooked pork shoulder subjected to high pressure processing. A comparison of dynamic headspace and solid-phase microextraction. *Food Chemistry* 132, 18-26.

## CAPÍTULO VII

# Programa de formación. Resultados del máster y del curso internacional

---

*Mar Rodríguez*

---

*Facultad de Veterinaria (UEX). Cáceres*

---

*Filiberto Sánchez*

---

*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Monells (Girona)*

---

*Jesús Ventanas*

---

*Facultad de Veterinaria (UEX). Cáceres*

### 1. Introducción

El Programa de Formación del proyecto Consolider CARNISENUSA, por su carácter singular y ser el único específico del sector cárnico, se ha convertido en una de las señas de identidad de dicho proyecto. Ha contribuido de una manera destacada a la visibilidad del mismo, al flujo de ideas entre investigadores (y entre investigadores y técnicos de empresas) pero, especialmente, a la transferencia del importante *pool* de conocimientos generados sobre la calidad y seguridad de la carne y productos cárnicos a más de 200 profesionales, investigadores y técnicos que lo han cursado. Aunque las opciones que ofrece el Programa de Formación, el Curso Internacional de IRTA-Monells y el Máster de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, se dictaban antes del inicio del proyecto (en el 2002 el curso y en 1992 el máster). La inclusión de los mismos en el proyecto CARNISENUSA los ha convertido en las propuestas formativas de referencia en el ámbito del sector cárnico, que es nuestra primera industria del sector agroalimentario. Con su acreditación por la ANECA (2009), se ha logrado su consolidación definitiva, lo que garantiza su continuidad. Cuentan con un fuerte respaldo institucional, y una demanda creciente, que deriva de los contenidos que han sido cuidadosamente elegidos y de los excelentes recursos humanos y materiales de que disponen, lo que permite ofrecer una formación idónea y de alto nivel para quienes deseen especializarse ó actualizar sus conocimientos en esta materia.

Cabe destacar, además, la complementariedad entre ambas acciones; el máster se dirige más hacia la formación de investigadores (integrado en un Programa de Doctorado de Ciencia de los Alimentos con mención de calidad), de profesionales que trabajan en la administración pública en seguridad alimentaria o en docencia, y de tecnólogos vinculados a Departamentos de I+D ó de Calidad de empresas del sector y Consultorías. Por su parte, el curso internacional prepara técnicos y jefes de producción para la industria cárnica y auxiliares (maquinaria, servicios) y tiene un fuerte compromiso con la preparación de titulados iberoamericanos a través de la colaboración con la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID).

Una vez expuestos los antecedentes, objetivos y contenidos del programa de formación, procede ahora hacer una valoración de los resultados tanto del Máster como del Curso Internacional, desde el punto de vista del destino de los egresados (Figura 1) y su grado de satisfacción con la formación recibida.



Figura 1. Esquema de las condiciones de acceso, orientación y entidad de la formación y actividad que desarrollan los titulados del Máster y del Curso Internacional.

## 2. Resultados de satisfacción e inserción laboral del Máster en Ciencia y Tecnología de la Carne

Durante el curso 2012-2013 se está cursando la VII edición del *Máster en Ciencia y Tecnología de la Carne*, durante los siete cursos que ya han transcurrido desde que se inició el máster, se ha ofrecido a los alumnos amplios conocimientos relacionados con la carne y productos cárnicos haciendo especial énfasis en los avances que se iban produciendo en esta temática, gracias a la colaboración de profesores de varias universidades, organismos públicos de investigación, centros tecnológicos y destacados profesionales tanto del sector industrial cárnico como de la administración.

Uno de los aspectos que permite garantizar la calidad de este máster es el reducido número de alumnos admitidos por curso académico, ya que el límite está fijado en 15, lo que asegura una enseñanza muy personalizada y permite al alumno un mayor aprovechamiento de las clases. A lo largo de estos cursos, se ha podido comprobar el interés que despertaba el máster tanto en estudiantes recién licenciados, como en personal procedente de las industrias cárnicas, la investigación e investigadores. Este interés ha sido cuantificado por el alto número de preinscripciones realizadas durante cada curso académico (más del doble de las plazas ofertadas), lo que condujo a aplicar estrictos sistemas de selección priorizando las solicitudes en función del currículum académico (50%), experiencia profesional en empresas relacionadas con el sector cárnico (30%) y otros méritos declarados por los solicitantes (20%).

Para determinar, con objetividad, el éxito y la viabilidad de una titulación es necesario por un lado, saber el grado de satisfacción de los estudiantes con la docencia e información recibidas y, por otro, conocer el perfil de egreso de los titulados. Para ello, la Universidad de Extremadura ha desarrollado una normativa de funcionamiento de las Comisiones de Calidad de las Titulaciones, donde se recogen las pautas para velar por la garantía de calidad de la titulación. Entre las pruebas objetivas que se han llevado a cabo por la Comisión de Calidad del *Máster en Ciencia y*

*Tecnología de la Carne* creada en el curso 2010, está una encuesta de satisfacción de cada una de las asignaturas del máster, que se realiza de forma voluntaria por los alumnos, antes de la finalización del curso académico. De los resultados obtenidos con estas encuestas de satisfacción, se puede afirmar que, en una escala de 4 opciones (totalmente satisfecho, satisfecho, insatisfecho y completamente insatisfecho), el 95% de los estudiantes han respondido estar “totalmente satisfecho” o “satisfecho” con los contenidos de las asignaturas que han cursado y han considerado que han sido útiles para mejorar su formación.

Además, otro de los parámetros de calidad que se ha podido valorar es la comprobación de que los estudiantes han alcanzado los objetivos planteados y, quizás, el indicador de mayor impacto ha sido la inserción laboral de los estudiantes egresados que más adelante se comenta. Se ofrece a continuación un breve resumen de los resultados obtenidos con la encuesta realizada entre los alumnos que han finalizado una de las cuatro últimas ediciones del *Máster en Ciencia y Tecnología de la Carne*.

Durante estos últimos cuatro cursos en los que el máster ha coincidido con el desarrollo del proyecto CARNISENUSA, el número de alumnos formados ha sido de 60, correspondiendo al número máximo de admitidos (15 alumnos/curso). La encuesta se envió por correo electrónico a todos los alumnos durante el primer trimestre del año 2013 y fue cumplimentada por el 43,3% de los titulados. El 57,7% de los egresados que rellenaron la encuesta eran titulados que, en el momento de la matriculación en el máster se encontraban ya trabajando, aunque el 2,9% de ellos no tiene trabajo en la actualidad. Esto puede suponer una pequeña distorsión de los resultados, pues no representa la realidad de cada curso académico en el que de los 15 alumnos matriculados, solo entre el 13% y el 33% estaban ya trabajando, siendo el resto alumnos recién licenciados. De todas formas, como se puede ver en la tabla 1, el porcentaje de titulados en el *Máster en Ciencia y Tecnología de la Carne* que se encuentran trabajando en la actualidad supera el 80%. Por tanto, y respecto a la situación al inicio del máster, se ha incrementado notablemente el porcentaje de egresados que se encuentran trabajando. Además, la actividad profesional de estos titulados está, en una gran proporción, estrechamente relacionado con la desarrollada en el máster, como refleja los resultados de la encuesta (Tabla 1).

| Tabla 1. Resultados obtenidos a las principales cuestiones de la encuesta |        |            |        |            |
|---|--------|------------|--------|------------|
| ¿Estabas trabajando durante la realización del máster?                    |        |            |        |            |
|   | SI     |            | NO     |            |
|   | Número | Porcentaje | Número | Porcentaje |
| Total   | 15     | 57,7       | 11     | 42,3       |
| Actualmente ¿estás trabajando?  |        |            |        |            |
|   | SI     |            | NO     |            |
|   | Número | Porcentaje | Número | Porcentaje |
| Total   | 21     | 80,8       | 5      | 19,2       |
| En caso afirmativo ¿el trabajo está relacionado con el máster?            |        |            |        |            |
|   | SI     |            | NO     |            |
|   | Número | Porcentaje | Número | Porcentaje |
| Total   | 14     | 66,7       | 7      | 33,3       |
| En caso negativo ¿el máster te sirve para buscar trabajo?                 |        |            |        |            |
|   | SI     |            | NO     |            |
|   | Número | Porcentaje | Número | Porcentaje |
| Total   | 4      | 80         | 1      | 20         |

En la figura 2 se muestran las actividades que actualmente desarrollan los egresados, pudiéndose observar que el 52,4% se encuentra ejerciendo su labor en la Universidad realizando su tesis doctoral y el resto se distribuye principalmente entre la industria cárnica y la administración.

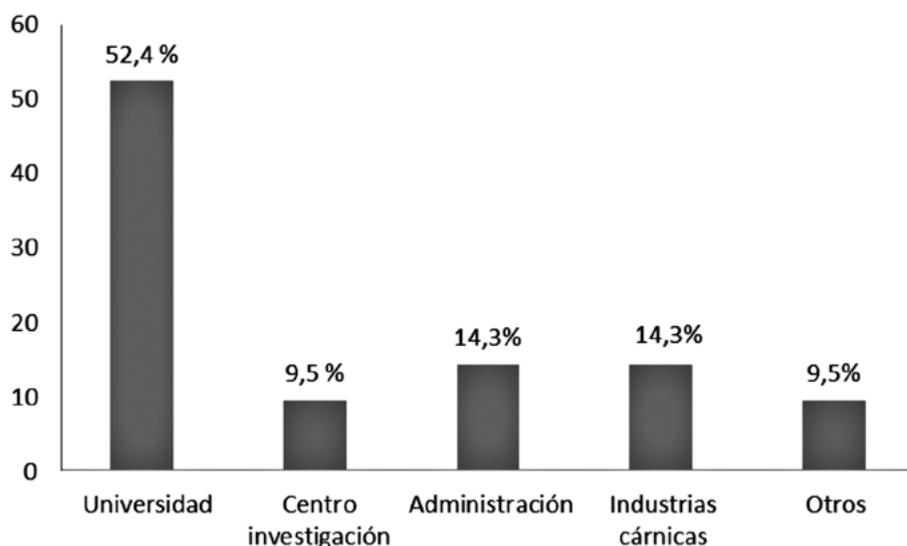


Figura 2. Actividades de trabajo de los titulados en el Máster en Ciencia y Tecnología de la Carne.

La encuesta realizada a los alumnos pretendía, por otra parte, obtener información acerca de la publicación de trabajos científicos y aportaciones a congresos que hubieran sido realizados por estos titulados, derivados principalmente del *Trabajo de Fin de Máster* que reglamentamente todos han tenido que realizar. En esta titulación el trabajo está enfocado especialmente al desarrollo de una investigación puntual para que el alumno consiga una serie de competencias que pueden ser importantes para su inserción laboral (Tabla 2). Un total del 46,2% de los titulados encuestados, habían logrado realizar la publicación de algún trabajo científico o comunicación en congresos, aunque es cierto que entre ellos se encontraban principalmente aquellos titulados que estaban trabajando en la universidad.

Tabla 2. Competencias a conseguir con la realización del Trabajo de Fin de Máster en la titulación del Máster en Ciencia y Tecnología de la Carne

1. Conocer la metodología de la investigación científica en Ciencia y Tecnología de la Carne.
2. Conocer el manejo de técnicas de laboratorio relacionados con la carne y los productos cárnicos.
3. Ser capaces de abordar un trabajo de investigación sobre problemas actuales de la industria cárnica.
4. Saber analizar los datos obtenidos y saber presentar los resultados y conclusiones de los mismos.

### 3. Resultados de participación y aceptabilidad del Curso Internacional

En la tabla 3 se muestra la evolución del número de alumnos del curso según su procedencia geográfica y actividad. Se aprecia como el número de alumnos españoles ha permanecido estable, a excepción del año 2010 en que se registró el número más bajo de matriculados. Respecto a los alumnos de Latinoamérica, el descenso observado en el año 2012 se debió a que en ese año, el curso no formó parte del Programa Iberoamericano de Formación Técnica Especializada (PIFTE) de la AECID.

| Tabla 3. Evolución de los alumnos según su procedencia geográfica y actividad |      |      |      |      |      |       |
|---|------|------|------|------|------|-------|
| Origen  | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | Total |
| <b>Administración</b>   |      |      |      |      |      |       |
| España  |      | 5    | 1    | 2    |      | 8     |
| Portugal y Latinoamérica  | 4    | 6    | 5    | 6    |      | 21    |
| Universidades y centros I+D   |      |      |      |      |      |       |
| España  | 1    | 1    | 1    |      |      | 3     |
| Portugal y Latinoamérica  | 12   | 13   | 15   | 15   |      | 55    |
| <b>Empresas cárnicas</b>  |      |      |      |      |      |       |
| España  | 14   | 10   | 13   | 18   | 16   | 71    |
| Portugal y Latinoamérica  | 11   | 4    |      | 7    | 2    | 24    |
| <b>Empresas de maquinaria, aditivos y auxiliares</b>                          |      |      |      |      |      |       |
| España  | 4    | 7    | 3    | 5    | 10   | 29    |
| Portugal y Latinoamérica  | 1    | 1    | 1    | 1    | 2    | 6     |
| <b>Otros</b>  |      |      |      |      |      |       |
| España  |      |      |      | 2    | 3    | 5     |
| Portugal y Latinoamérica  | 4    | 4    |      | 1    |      | 9     |
| <b>Total</b>  |      |      |      |      |      |       |
| España  | 23   | 27   | 18   | 27   | 29   | 124   |
| Portugal y Latinoamérica  | 28   | 24   | 21   | 30   | 4    | 109   |

El Curso Internacional en Tecnología en Productos Cárnicos ha acogido a profesionales de las áreas de dirección, investigación y desarrollo, producción, calidad y ventas vinculadas con la industria cárnica u otras relacionadas con éstas. Los alumnos procedentes de Latinoamérica han mostrado interés por todos los módulos, mientras que en el caso de los alumnos españoles, los módulos a los que mayoritariamente han asistido han sido los tres dedicados a las tecnologías de elaboración de productos cárnicos frescos, cocidos y curados, donde las aproximadamente 50 horas de prácticas han brindado a los alumnos una oportunidad única de adquirir habilidades en la fabricación de más de tres decenas de diferentes productos cárnicos en la planta piloto del IRTA-Monells. Después de las cárnicas, las empresas dedicadas a la fabricación y comercialización de aditivos han sido las empresas que más alumnos han aportado al curso.

La aceptabilidad del curso se ha evaluado mediante diferentes cuestionarios:

a) Cuestionario sobre profesores.

Al finalizar cada módulo, los alumnos puntuaron, con una escala de 0 a 5, los siguientes aspectos relacionados con la calidad de la formación aportada por cada profesor: calidad de la presentación, aplicabilidad de la materia y documentación. Los resultados de las 5 últimas ediciones oscilaron entre 4,5 y 4,7, es decir, una puntuación que en la escala clásica de 10 puntos se consideraría como sobresaliente.

b) Cuestionario sobre aspectos puntuales referentes a la organización.

En este cuestionario se incluían cuestiones relacionadas con aspectos logísticos, como el cumplimiento de horarios, trato por parte del personal, disponibilidad de profesores, etc. Este cuestionario se cumplimentaba el último día de asistencia al curso. Los resultados de las 5 últimas ediciones oscilaron entre 4,5 - 4,7 sobre un máximo de 5, del mismo nivel que el del bloque anterior de la encuesta.

c) Satisfacción global del curso.

El último día de asistencia al curso, se le pedía al alumno que evaluara el grado de satisfacción global entre 0 y 10. Los resultados de las 5 últimas ediciones estaban entre 8,5 y 9,5.

Resumiendo, los cuestionarios han revelado un alto grado de satisfacción por parte del alumnado, tanto en los contenidos como en su gestión. En ambos aspectos se ha aplicado el principio de mejora continua a lo que ha contribuido de manera importante las observaciones aportadas por el alumnado. Por otra parte, el curso ha supuesto un punto de encuentro idóneo para establecer relaciones profesionales perdurables entre las entidades y empresas de procedencia de alumnos y profesores.

## CAPÍTULO VIII

# Desarrollo de metodología y estrategias para garantizar la seguridad alimentaria en la industria cárnica

---

*Alicia Rodríguez, Mar Rodríguez, Victoria Bernáldez y Juan José Córdoba*

---

*Higiene y Seguridad Alimentaria. Facultad de Veterinaria (UEx). Avda. de la Universidad s/n. 10003 Cáceres*

---

*José Antonio Risquez*

---

*Cooperativa Ganadera del Valle de los Pedroches (COVAP). Calle Mayor, 56, 14400 Pozoblanco, Córdoba*

---

*Luis Polo*

---

*Mataderos Industriales Soler S.A. (Prolongo)/Frigoríficos Andaluces de Conservas de Carne S.A. (FACCSA), Plaza Prolongo 1-2.  
29580 Cártama Estación (Málaga)*

---

*M.<sup>a</sup> Concepción Cabeza*

---

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria (UCM).  
Ciudad Universitaria. 28040 Madrid*

---

*Rosa García*

---

*Centro de Investigación y Calidad Agroalimentaria del Valle de los Pedroches (CICAP). Pozoblanco, Córdoba*

### 1. Introducción

El consumo de carne y productos cárnicos sigue causando problemas de infecciones e intoxicaciones alimentarias debidas a la presencia de microorganismos patógenos. Así, en el último informe de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2013) sobre infecciones e intoxicaciones de origen alimentario, el consumo de carne y productos cárnicos de diferentes especies (vacuno, cerdo, pollo y otras especies) supone el 15,5% de los casos provocados por el consumo de alimentos.

Entre los microorganismos más preocupantes por su patogenicidad y carácter de psicrotrofos, sin duda, *Listeria monocytogenes*. Es bien sabido, además, que esta bacteria puede acantonarse y sobrevivir durante mucho tiempo en diferentes nichos ecológicos de los equipos (juntas, válvulas, recodos, soldaduras ásperas), recipientes, utensilios, paredes, tabiques y suelos, guantes y delantales de los manipuladores y superficies diversas, como las de trabajo que van a estar en contacto directo con los alimentos. A partir de esta fuente de contaminación, la bacteria puede acceder al alimento de forma directa, por contacto, o indirecta, suspendidas en aerosoles o gotitas de condensación. Además de *L. monocytogenes* en carne y productos cárnicos preocupan otros patógenos como *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp. y *Escherichia coli* O157:H7, a lo que hay que añadir el peligro en productos madurados derivado de la presencia de estafilococos productores de enterotoxinas y mohos productores de micotoxinas (Núñez y col., 1996; Lizaso y col., 1999; Portacarrero y col., 2002; Sosa y col., 2002).

La situación es, pues, preocupante. No obstante, en los procesos de elaboración se están aplicando acciones tendentes a reducir la contaminación de microorganismos patógenos fundamentadas, entre otras medidas, en la correcta aplicación de Buenas Prácticas Higiénicas y adecuados programas de limpieza y desinfección. Además, es necesario minimizar el desarrollo de los microorganismos patógenos durante los procesos de elaboración mediante la aplicación de medidas preventivas basadas en el almacenamiento en temperatura inferior al límite de crecimiento de estos patógenos, la reducción de la actividad de agua de los productos durante el proceso de elaboración y la utilización de envasado en atmósferas modificadas o de cultivos protectores, entre otras. Igualmente la utilización de métodos de eliminación de patógenos basados en la aplicación de modernas tecnologías como tratamientos con electrones acelerados o altas presiones pueden ser de una gran utilidad para conseguir carne y productos cárnicos libres de microorganismos patógenos.

Además hay que dotar a los sistemas de control de las industrias cárnicas basados como el APPCC de técnicas analíticas rápidas y sensibles de apoyo que permitan la detección de microorganismos patógenos en las diferentes fases del proceso de elaboración de los productos y en los productos finales, que puedan ser utilizadas tanto en la monitorización como en la verificación. Estas técnicas permitirían detectar contaminaciones de microorganismos patógenos en materias primas y productos en proceso, pudiendo de esta forma adoptarse soluciones rápidas (medidas correctoras) sobre el destino de estos productos en proceso.

Entre los métodos más prometedores está el de la reacción en cadena de la polimerasa. Esta metodología permite la detección de patógenos mediante la PCR convencional e incluso la cuantificación mediante la PCR en tiempo real. La utilización de la PCR como técnica rápida de detección de patógenos en alimentos no se ha explotado hasta el momento de una forma significativa debido a la falta de protocolos validados y de utilidad a la industria.

La industria cárnica necesita pues la transferencia de los resultados de investigación en forma de medidas preventivas eficaces en el control de microorganismos patógenos, modernas tecnologías de eliminación de patógenos y métodos de detección de patógenos precisos y realistas con el objetivo final de innovar en la garantía sanitaria de los productos que están elaborando.

En este trabajo se describen algunas estrategias conjuntas desarrolladas entre investigadores del proyecto CARNISENUSA e industrias cárnicas españolas con el objetivo de la transferencia de los resultados de investigación del proyecto al sector industrial.

## 2. Higienización de productos cárnicos por tecnologías no térmicas

La aplicación de las tecnologías encuadradas bajo el término de no térmicas afecta principalmente a los productos listos para su consumo (RTE) que se envasan en raciones individuales o familiares y se consumen directamente. La preparación de alimentos RTE conlleva una serie de manipulaciones (desde las manuales, como el loncheado de jamón a mano, hasta el loncheado con equipos sofisticados en que la intervención del operario es prácticamente nula). No obstante, aunque se guarden estrictas normas de buenas prácticas de fabricación, no es posible asegurar que los microorganismos del entorno, no alcancen los alimentos RTE durante su elaboración. De hecho, se ha observado que lonchas de jamón cocido y bacon tenían una incidencia mayor de *L. monocytogenes* que los mismos productos antes del loncheado, lo que indica una contaminación durante esta operación o la de reenvasado (Zhu y col 2005).

La posible multiplicación de *L. monocytogenes* en productos cárnicos con  $a_w < 0,92$  y la mera presencia de este microorganismo en productos con  $a_w > 0,92$  en aquellos países donde rige el criterio de "tolerancia cero" para esta bacteria, permite deducir que la higienización de productos cárnicos RTE conllevaría un beneficio sanitario y comercial. Esta acción apremia si se tiene en cuenta el notable incremento que se ha producido en la exportación de productos cárnicos emblemáticos, como el jamón curado. Como ejemplo, pueden citarse las exportaciones de ja-

món curado deshuesado (la gran mayoría como producto RTE) que pasaron de 1.023 Tm en 2011 a 16.280 Tm de Enero a Septiembre de 2012 (CONFECARNE – ANICE, 2013), es decir, el aumento fue espectacular, multiplicándose por un factor de 16 en el periodo mencionado.

Como en los productos RTE ya envasados no pueden aplicarse tratamientos térmicos pasteurizantes, es necesario recurrir a tecnologías no térmicas para su higienización. Entre ellas, las más adecuadas quizás sean los electrones acelerados (u otra modalidad de radiación ionizante), las altas presiones hidrostáticas (APH) y los pulsos de luz. En el capítulo VI de esta obra se discute la aptitud de cada una de estas tecnologías (Cambero y col., 2013). Baste decir aquí que los pulsos de luz están aún en estudio y son los electrones acelerados (E-beam) o las APH las que actualmente se pueden transferir a la industria. Una de las diferencias más destacada entre ambas tecnologías es la cinética de muerte (Figura 1, izquierda). La respuesta de la muerte de microorganismos frente a los E-beam se ajusta al curso de una reacción de primer orden y puede, por tanto, optimizarse su eficacia sin dificultad alguna. En cambio, la cinética de muerte por APH no rinde una línea recta al representar, a presión constante, el logaritmo del número de supervivientes en función del tiempo de presurización sino que típicamente son graficas bifásica con “colas” largas finales que, a veces, se hacen asintóticas al eje de abscisas (Figura 1, derecha). Por tanto, no se ajusta a una ecuación de primer grado y, en consecuencia, no se puede definir en términos de reducciones decimales y es necesario expresar la destrucción de microorganismos en otros términos, habitualmente en descenso, en términos logarítmicos, del número de ufc, lo que requiere estudios detallados para la optimización del proceso en diferentes productos. No obstante, las altas presiones ya se están aplicando, mientras que la higienización mediante E-beam requiere autorización de las autoridades competentes para su uso. En este libro se detallan ampliamente los estudios realizados con ambas tecnologías para la higienización de productos RTE (Cambero y col., 2013). Adicionalmente, merece la pena mencionar que a propuesta de la industria FACCSA-PROLONGO se realizaron investigaciones para conocer la eficacia de los E-beam con el fin de aumentar la vida útil de lomo fresco y adobado refrigerados. Los resultados han quedado recogidos en dos artículos (García Márquez y col, 2013 a, b). pudiéndose decir que es un método eficaz para prolongar la vida útil de los productos mencionados.

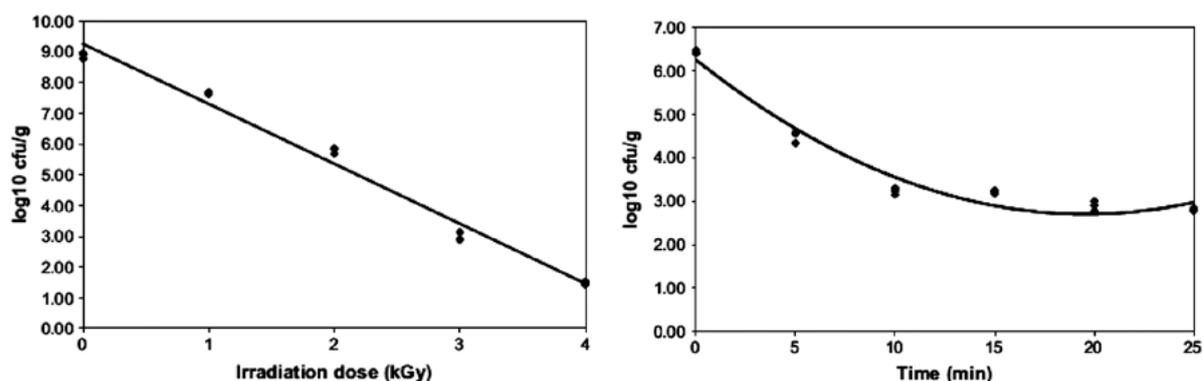


Figura 1. Cinética de muerte típica de *L. monocytogenes* frente a tratamientos con E-beam (izquierda) y altas presiones hidrostáticas (derecha).

### 3. Combinación de estrategias basadas en la utilización de cultivos protectores de mohos no toxigénicos y de técnicas de control de la implantación de estos mohos en los productos cárnicos

Durante el proceso de elaboración de los productos cárnicos madurados, las condiciones de temperatura y humedad relativa que se alcanzan favorecen el desarrollo de una abundante población de mohos entre los cuales pueden encontrarse algunas cepas productoras de micro-

toxinas. En los productos cárnicos madurados se han aislado con frecuencia mohos productores de ocratoxina A (OTA) (Iacumin y col., 2009; Rodríguez y col., 2012a), micotoxina clasificada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) en el grupo 2B como sustancia potencialmente carcinogénica para el ser humano (IARC, 1993). Además se ha demostrado que la presencia de estos mohos supone un peligro de acumulación de OTA en dichos productos (Rodríguez y col., 2012a; 2012b), con el consiguiente riesgo sanitario para la salud del consumidor. Además se ha demostrado en jamón curado que la presencia de mohos productores de aflatoxinas puede conducir también a la acumulación de alguna de estas micotoxinas (Rodríguez y col., 2012a).

Para evitar la formación de OTA y aflatoxinas en este tipo de productos, se requieren estrategias específicas para reducir e incluso eliminar la incidencia de los mohos productores de estas micotoxinas durante el procesado. Entre estas estrategias, están las de biocontrol basada en la utilización de cultivos protectores de mohos no toxigénicos que inhiban el desarrollo de los mohos productores de micotoxinas. La utilización de estos cultivos protectores además de favorecer las características sensoriales del producto podría evitar el desarrollo en dichos productos cárnicos de una población de mohos no controlada y heterogénea entre la cual podrían encontrarse mohos productores de aflatoxinas y OTA (Ludemann y col., 2010). En este sentido, se han utilizado cepas no toxigénicas de las especies *Penicillium nalgiovense* y *Penicillium chrysogenum* como cultivos protectores en determinados productos cárnicos madurados (Paggianni y Papamichael, 2007; Castellari y col., 2010). Sin embargo su utilización no es habitual en la elaboración de la mayoría de los productos cárnicos madurados. Entre las posibles causas del bajo índice de utilización de los cultivos protectores de mohos no toxigénicos está el hecho de que no está totalmente probada su efecto inhibitorio sobre las cepas toxigénicas, especialmente a nivel industrial, y la dificultad para poder cuantificar el grado de implantación de los cultivos protectores en los productos durante la maduración, utilizando los métodos tradicionales de cultivo en placa. Sin embargo, los avances obtenidos en el desarrollo de métodos de PCR en tiempo real (qPCR) para cuantificar mohos toxigénicos y mohos no toxigénicos utilizados como cultivos protectores, podrían ser una alternativa eficaz para cuantificar en la industria de forma precisa, sencilla y rápida, la implantación del cultivo protector y su eficiencia en el control de los mohos toxigénicos (Rodríguez y col. 2011a, 2011b, 2012a, 2012b, 2012c, 2012d, 2012e, 2012f, 2012g y 2012h). Las industrias Cárnicas COVAP y FACCSA-PROLONGO han participado en el desarrollo y aplicación a nivel industrial en sus instalaciones de cultivos protectores de mohos no toxigénicos y en el control de su implantación mediante técnicas modernas (qPCR).

#### 4. Estrategia de biocontrol de mohos toxigénicos en jamón curado mediante el uso de un cultivo protector de *P. chrysogenum*

La mayoría de las cepas de *P. chrysogenum* que se han encontrado en el jamón curado a lo largo del proceso de maduración no son toxigénicas (Núñez y col. 1996). Además se ha demostrado que dichas cepas favorecen el desarrollo del sabor y el aroma en el jamón curado (Martín y col., 2004, 2006). Incluso algunas de estas cepas no toxigénicas producen compuestos antifúngicos que actúan inhibiendo el desarrollo de mohos toxigénicos. Este es el caso de la cepa RP42 de *P. chrysogenum* seleccionada por el grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, que ha demostrado tener una gran actividad antifúngica (Rodríguez-Martín y col., 2010), por lo que puede ser de gran interés su utilidad como cultivo protector en el control de mohos productores de las micotoxinas más preocupantes en jamón curado como son OTA y aflatoxinas.

Como proyecto de transferencia a la industria se ha evaluado el potencial de la cepa RP42C en el control de mohos productores de OTA y aflatoxinas en jamón curado a nivel industrial. Además se ha valorado la eficacia de un método de qPCR desarrollado para comprobar la implantación a lo largo del procesado de elaboración de jamón curado del cultivo protector.

#### 4.1. Control de mohos productores de aflatoxinas

El efecto protector del cultivo protector de *P. chrysogenum* RP42C se evaluó primero en condiciones controladas en lonchas de jamón curado donde se comprobó la implantación de *P. chrysogenum* RP42C sobre el crecimiento de la cepa de *Aspergillus flavus* CBS 573.65 productora de aflatoxinas. Para ello, se inocularon por separado y conjuntamente ambas cepas a una concentración de  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup> en dichas lonchas. A continuación, se incubaron durante 20 días, en condiciones de temperatura y humedad relativa similares a las del proceso de maduración de jamón curado (Figura 2).



**Figura 2.** Lonchas de jamón curado una vez depositado el inóculo en recipientes previamente esterilizados. En el fondo del recipiente se introdujo una solución salina sobresaturada de cloruro potásico ( $a_w = 0,84$ ) para controlar con el recipiente cerrado la humedad relativa ambiental

Con el objetivo de evaluar la implantación en las lonchas de jamón de *P. chrysogenum* RP42C de forma sensible y rápida, se desarrolló un protocolo de qPCR múltiple que permitiera detectar simultáneamente al moho utilizado como cultivo protector (*P. chrysogenum* RP42C) y al moho toxigénico (*A. flavus* CBS 573.65). Para ello se procedió en primer lugar al diseño de cebadores y sondas (F-Pc/R-Pc y P-Pc) utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, USA) a partir de la secuencia del gen *pgafp* que codifica para la proteína antifúngica PgAFP (Rodríguez-Martín y col., 2010) para amplificar la cepa de *P. chrysogenum* RP42C (Bernaldez y col., 2013b) (Tabla 1).

También se ensayaron las parejas de cebadores F-omt/R-omt y las sondas de hidrólisis OMTprobe (Rodríguez y col., 2012f), para la amplificación de mohos productores de aflatoxinas. Finalmente, se utilizó un control interno de amplificación (IAC) no competitivo cuyos cebadores y sondas (TubF1/TubR1 y Tubprobe) están diseñados a partir del gen de la  $\beta$ -tubulina para cuantificar la presencia de población fúngica (Rodríguez y col., 2012c). A continuación, se optimizó el protocolo de qPCR triple basado en la metodología TaqMan, para la detección y cuantificación simultánea del cultivo protector y de mohos productores de aflatoxinas con un IAC no competitivo.

**Tabla 1.** Secuencia de nucleótidos de los cebadores y sondas utilizadas para los ensayos de qPCR para detectar y cuantificar el gen *pgafp* de *P. chrysogenum* productor de péptidos antifúngicos. Se especifica también el tamaño del producto de qPCR esperado

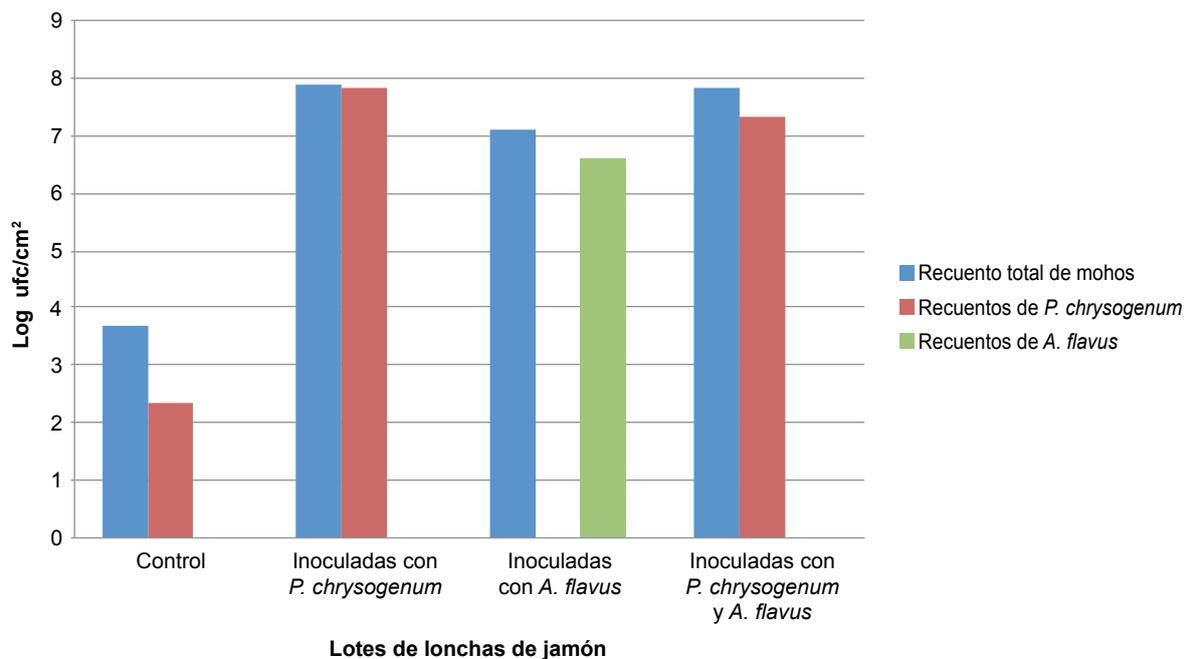
| Nombre del cebador / sonda | Secuencia de nucleótidos (5'-3') | Tamaño del producto (pb) | Posición dentro del gen <sup>a</sup> |
|----------------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| FPc                        | CAGATCACCAGCATTGCCA              | 73                       | 4                                    |
| RPc                        | CTCGGGCATCAAGATCGTCC             |                          | 75                                   |
| PPc                        | [FAM]-CATCGCGAGGGAGTC-[TAMRA]    |                          | 60                                   |

<sup>a</sup> posición en relación con la secuencia del gen *pgafp* de *P. chrysogenum* RP42C (Rodríguez-Martín y col., 2010; Bernaldez y col., 2013b)

El método de qPCR demostró ser muy específico dado que sólo hubo amplificación de los cebadores específicos cuando se ensayaron las cepas productoras de aflatoxinas o la cepa de *P. chrysogenum* RP42C, observándose amplificación siempre por parte del IAC. En la determinación de la sensibilidad a partir de las lonchas de jamón curado inoculadas artificial-

mente, las curvas estándar mostraron pendientes de -3,16; -3,08 y -3,27 cuando se amplificó *P. chrysogenum* RP42C, mohos productores de aflatoxinas y el IAC no competitivo, respectivamente. Por tanto, el método mostró valores de eficiencia en el rango óptimo descrito por Fredlund y col. (2008) en métodos de qPCR utilizados en la cuantificación de mohos. El método mostró una alta sensibilidad dado que el límite de detección es de  $10^2$  ufc/cm<sup>2</sup> para la cepa productora de péptidos antifúngicos y  $10^3$  ufc/cm<sup>2</sup> para la cepa productora de aflatoxinas (Bernáldez y col., 2013b). El desarrollo del cultivo protector y de la cepa toxigénica de *A. flavus* en las lonchas de jamón se evaluó también mediante el recuento en placas de Agar Extracto de Malta para comparar con los resultados obtenidos mediante el método de qPCR múltiple desarrollado.

Al evaluar el efecto de la cepa productora de péptidos antifúngicos *P. chrysogenum* RP42C frente a la cepa de *A. flavus* CBS 573.65 productora de aflatoxinas en lonchas de jamón inoculadas artificialmente, se observó un mayor crecimiento de la cepa protectora frente a la cepa productora de aflatoxinas (Figura 3), cuando ambas cepas fueron inoculadas conjuntamente (Bernáldez y col., 2013b). Estos resultados confirman el efecto protector de la cepa *P. chrysogenum* RP42C frente a mohos productores de aflatoxinas.



**Figura 3.** Recuento en ufc/cm<sup>2</sup> de las lonchas inoculadas con *P. chrysogenum* RP42C frente a *A. flavus* CBS 573.65 mediante el método qPCR múltiple desarrollado (Bernáldez y col., 2013b).

Finalmente, el efecto del cultivo protector frente a mohos productores de aflatoxinas se ensayó a nivel industrial en jamón curado. Para ello, se utilizó un lote de 5000 jamones que estaban siguiendo su proceso de elaboración en la industria (final de post-salado). La mitad de estos jamones se inocularon con el cultivo protector de *P. chrysogenum* RP42C y la otra mitad de los jamones no se inoculó usándose como lote control. Ambos lotes se maduraron en las mismas condiciones siguiendo un procesado habitual de maduración de jamón de cerdo ibérico. Para controlar la implantación del cultivo protector se tomaron muestras de 25 jamones a los 9 meses de maduración de un área de 25 cm<sup>2</sup> y 1 cm de profundidad utilizando una plantilla metálica estéril, esta porción de muestra incluía parte de los músculos *Semi-membranoso* y *Gracilis*. El micelio superficial de las muestras se recuperó en su totalidad con una cuchilla de acero estéril y se usó para la determinación del recuento de mohos en placa

(ufc/cm<sup>2</sup>) y la parte sin micelio se utilizó para la extracción de micotoxinas y la posterior cuantificación mediante HPLC-MS.

En el muestreo realizado a los nueve meses se observó crecimiento fúngico superficial detectándose el cultivo protector en niveles próximos a 10<sup>5</sup> ufc/cm<sup>2</sup> en los jamones inoculados. En los jamones control no inoculados también se detectó *P. chrysogenum* RP42C aunque en niveles inferiores a los jamones inoculados. Probablemente este hecho se deba a una contaminación a partir del aire de la cámara de maduración, dado que los jamones control y los inoculados con el cultivo protector se maduraron en la misma cámara. No se detectaron mohos productores de aflatoxinas ni producción de aflatoxinas en ninguno de los jamones inoculados y controles analizados. El cultivo protector controla el desarrollo de mohos productores de aflatoxinas evitando la acumulación de estas micotoxinas. Incluso la presencia del cultivo protector en los jamones controles como consecuencia de contaminación puede ser suficiente para inhibir a los mohos productores de aflatoxinas.

#### 4.2. Control de mohos productores de OTA

En los jamones inoculados con el cultivo protector *P. chrysogenum* RP42C a nivel industrial anteriormente indicado se evaluó también el efecto de esta cepa sobre los mohos productores de OTA. El muestreo se realizó como se indica en el apartado anterior: el micelio superficial de las muestras se recuperó en su totalidad con una cuchilla de acero estéril y se usó para la determinación del recuento de mohos en placa (ufc/g) y la parte sin micelio se utilizó para determinar OTA mediante HPLC-MS. La cuantificación de la implantación de *P. chrysogenum* RP42C se realizó mediante una qPCR basada en la metodología SYBR Green utilizando los cebadores diseñados a partir de la secuencia del gen *pgAFP* que codifica para la proteína antifúngica PgAFP (Rodríguez-Martín y col., 2010) descritos en el apartado anterior. Para la cuantificación de la presencia de mohos productores de OTA se utilizó la técnica de qPCR diseñada por Rodríguez y col. (2011b), y para comprobar la presencia de ADN fúngico (control positivo) se utilizó el ensayo de qPCR diseñado a partir del gen de la *β-tubulina* basado en la metodología SYBR Green tal y como describen Rodríguez y col. (2012b).

En los jamones inoculados con el cultivo protector tras 9 meses de maduración se detectaron mohos productores de OTA aunque en niveles bajos siempre inferiores al considerado como de riesgo de acumulación de OTA (Rodríguez y col., 2012b). De hecho en ninguno de los jamones inoculados con la cepa RP42C se detectó OTA. Sin embargo, en el lote control no inoculado los niveles de mohos productores de OTA alcanzaron el nivel de 10<sup>5</sup> ufc/cm<sup>2</sup>, si bien en general no superaron este límite considerado como de riesgo por la posible acumulación de OTA, probablemente por la presencia de la cepa RP42C que llegó a estos jamones a través de contaminación de la cámara. Este hecho probablemente influyó para que sólo en 5 de los jamones control muestreados se detectara OTA, mientras que en ninguno de los jamones inoculados se detectó esta micotoxina. La presencia de *P. chrysogenum* controla a los mohos productores de OTA, incluso en los jamones control no inoculados la presencia por contaminación de *P. chrysogenum* limita a los mohos productores de OTA hasta prácticamente inhibir la producción de esta micotoxina. Por tanto, la inoculación del cultivo protector permite controlar de forma eficaz y sencilla el posible riesgo sanitario derivado de la presencia de OTA en jamón curado.

### 5. Estrategia de biocontrol de mohos toxigénicos en embutidos crudos-curados mediante cultivo protector de *P. nalgiovense*

Como proyecto de transferencia a la industria se pretendió evaluar a nivel industrial el potencial de la cepa comercial de *P. nalgiovense* TEXEL® PN1 sobre el control de mohos productores de OTA en embutidos crudos-curados y en la posible acumulación de esta micotoxina durante la maduración.

### 5.1. Evaluación del control de mohos productores de OTA mediante *P. nalgiovensis* en una matriz cárnica madurada (lonchas de salchichón)

Se evaluó el efecto de la cepa comercial de *P. nalgiovensis* sobre el crecimiento de un moho productor de OTA y su posterior producción de la toxina en una matriz cárnica madurada. Para ello, en primer lugar, se inocularon por separado y de forma conjunta ambas cepas a una concentración de  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup> en lonchas de salchichón con una superficie de 25 cm<sup>2</sup> y un peso aproximado de 5 g como sistema modelo de un producto cárnico madurado. Estas lonchas inoculadas se introdujeron en recipientes estériles donde se mantuvo la humedad relativa constante mediante una disolución saturada de sulfato potásico ( $a_w = 0,94$ ). A continuación, se incubaron hasta un máximo de 20 días en condiciones controladas de humedad relativa, esterilidad y temperatura. También se analizaron controles negativos a partir de lonchas de salchichón sin inocular e incubados y tratados de la misma forma que las lonchas inoculadas. Se tomaron muestras a los 10 y 20 días. En estas muestras se determinó el recuento de ambos tipos mohos en medios de cultivo Agar Extracto de Malta y la implantación del cultivo protector mediante un método de qPCR diseñado a partir de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal de *P. nalgiovensis*. La cuantificación del moho productor de OTA se realizó mediante el método de qPCR previamente diseñado por Rodríguez y col. (2011b) y la producción de OTA mediante la técnica cromatográfica de HPLC-MS.

Las lonchas de salchichón inoculadas individualmente con *P. nalgiovensis* TEXEL ® PN1 o *P. verrucosum* Pc4 productor de OTA mostraron a los 20 días de incubación recuentos mediante qPCR superiores a  $\log 7$  ufc/cm<sup>2</sup> (Bernáldez y col., 2013a). No hubo diferencias significativas entre los anteriores recuentos por qPCR y los encontrados tras su cultivo en Agar Extracto de Malta. Se deduce de estos resultados que el cultivo protector de *P. nalgiovensis* TEXEL ® PN1 y la cepa toxigénica se desarrollan adecuadamente en las lonchas de salchichón cuando son inoculadas individualmente. Sin embargo cuando las lonchas fueron inoculadas conjuntamente con estas dos cepas de mohos, los niveles de *P. verrucosum* no superaron el nivel de  $\log 2,5$  ufc/cm<sup>2</sup> mientras que *P. nalgiovensis* alcanzó recuentos de hasta  $\log 4,5$  ufc/cm<sup>2</sup> después de 20 días de incubación, observándose que el efecto protector del cultivo protector era mayor cuanto mayor era el tiempo de incubación (Figura 4). Es evidente que las condiciones de maduración ensayadas, favorecen el desarrollo del cultivo protector, frente a la cepa productora de OTA, lo que adquiere una extraor-

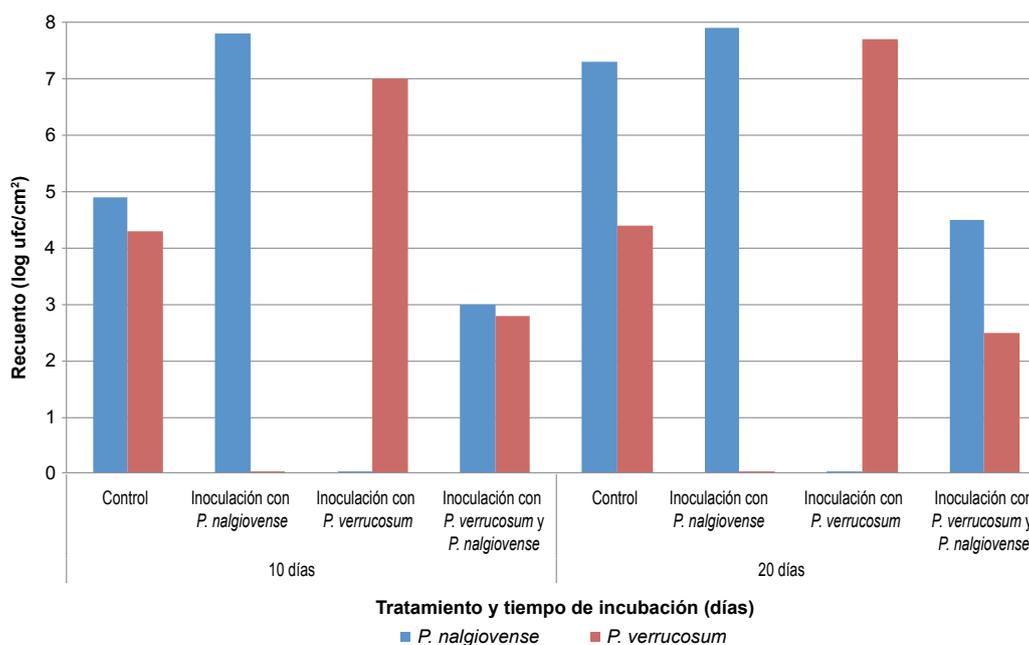


Figura 4. Recuento en ufc/cm<sup>2</sup> de las lonchas de salchichón inoculadas con *P. nalgiovensis* TEXEL ® PN1 frente a *P. verrucosum* Pc4 mediante los métodos de qPCR para la cuantificación de *P. nalgiovensis* a partir de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal y de mohos productores de OTA (Rodríguez y col., 2011b).

dinaria relevancia para demostrar la utilidad de este cultivo protector de *P. nalgiovense* TEXEL® PN1 en el control de mohos productores de OTA. Además, el desarrollo del cultivo protector mantiene a la cepa productora de OTA en niveles inferiores a los considerados como de riesgo mínimo de producción y acumulación de OTA (Rodríguez y col., 2012b).

Cuando se analizó la producción de OTA en las lonchas inoculadas se observa acumulación de esta micotoxina en niveles superiores a 2 µg/Kg en las lonchas donde se inoculó sólo *P. verrucosum*. Sin embargo no se detectó OTA en las lonchas de salchichón donde *P. nalgiovense* y *P. verrucosum* fueron inoculadas conjuntamente con el cultivo protector. Estos resultados confirman la necesidad de la utilización de *P. nalgiovense* para el control de mohos productores de OTA en productos cárnicos madurados y muy especialmente para evitar la acumulación de OTA en los productos cárnicos (Bernáldez y col., 2013a).

### 5.2. Evaluación del control de mohos productores de OTA mediante *P. nalgiovense* en salchichón tipo “fuet”

Se evaluó además la eficacia del cultivo protector *P. nalgiovense* TEXEL® PN1 para controlar los mohos productores de OTA en salchichón tipo “fuet” inoculados con una cepa de *P. verrucosum* Pc4 productora de OTA aislada de productos cárnicos (Rodríguez y col., 2011b). Para ello, se utilizaron 20 salchichones tipo fuet elaborados en la industria y divididos en 4 lotes de cinco piezas (lote 1: muestras sin inocular “lote control”, lote 2: muestras inoculadas con *P. nalgiovense*, lote 3: muestras inoculadas con *P. verrucosum* y lote 4: muestras inoculadas conjuntamente con *P. nalgiovense* y *P. verrucosum* productor de OTA). Los lotes 2, 3 y 4 fueron inoculados superficialmente con niveles de  $6,6 \cdot 10^6$  ufc/cm<sup>2</sup> esporas de cada una de ambas cepas correspondientes a cada lote. Todos lotes fueron madurados durante 15 días en las condiciones de maduración de los fuets proporcionadas por la empresa en una cámara de maduración en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura. Se tomaron muestras al finalizar los 15 días de maduración de los salchichones tipo “fuet”, en donde se observó un importante crecimiento de mohos en la superficie de los mismos (Figura 5). En estas muestras al igual que en las lonchas de salchichón se determinó la carga fúngica total mediante recuento en placa y se evaluó la implantación del cultivo protector y la presencia del mohos productores de OTA mediante dos métodos de qPCR así como la producción de OTA en el interior de los salchichones tipo “fuet” analizados.

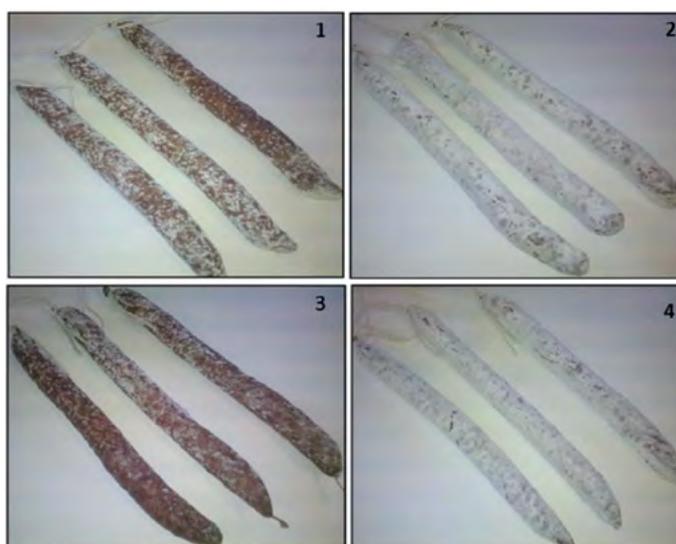


Figura 5. Imágenes tomadas a los 15 días de incubación en las que se muestran los fuets control (sin inoculación) (1), los fuets inoculados con *P. nalgiovense* (2), los fuets inoculados con *P. verrucosum* (3), y finalmente los inoculados con la mezcla formada por *P. nalgiovense* y *P. verrucosum* (4).

Los fuets inoculados exclusivamente con *P. nalgiovensis* TEXEL® PN1 mostraron recuentos por qPCR superiores a  $\log 7$  ufc/cm<sup>2</sup> (Figura 6). Sin embargo, cuando los fuets fueron inoculados sólo con *P. verrucosum* Pc4 se alcanzaron niveles de  $\log 4,5$  ufc/cm<sup>2</sup>. Cuando ambas cepas se inocularon conjuntamente *P. nalgiovensis* superó el valor de  $\log 7$  ufc/cm<sup>2</sup>, mientras *P. verrucosum* se mantuvo en recuentos de  $\log 4,4$  ufc/cm<sup>2</sup>. Es de destacar que los fuets control no inoculados con *P. nalgiovensis* mostraron niveles elevados de cultivo protector (superiores a  $\log 6$  ufc/cm<sup>2</sup> en el lote control) y algo inferiores ( $\log 4,5$  ufc/cm<sup>2</sup>) en el lote inoculado sólo con *P. verrucosum* (Figura 6).

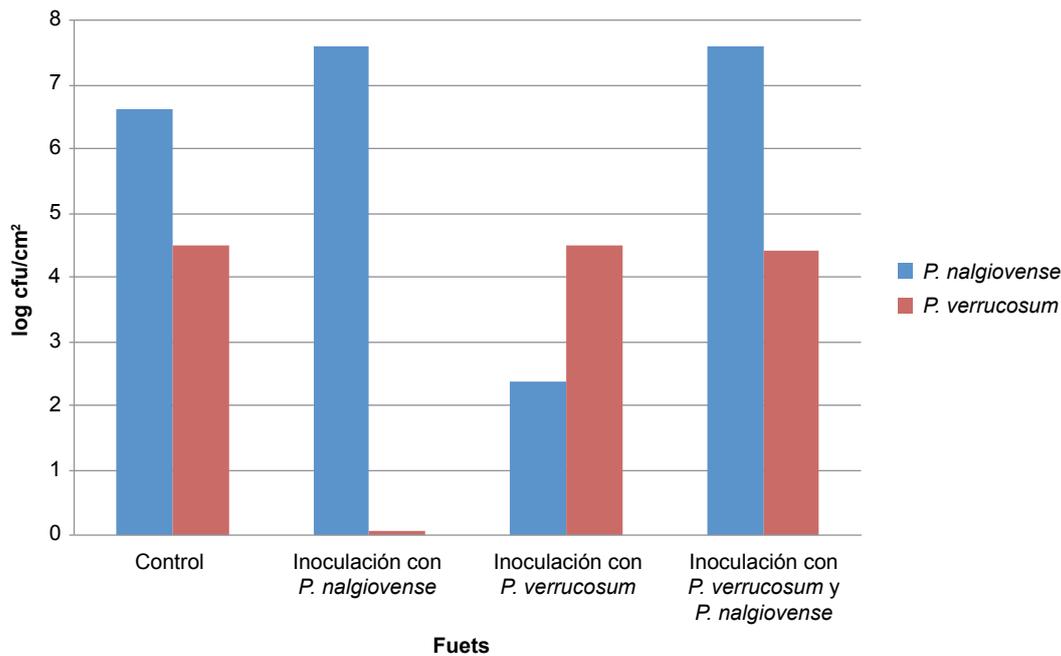


Figura 6. Recuentos de mohos mediante qPCR en los fuets inoculados con el cultivo protector de *P. nalgiovensis* y con *P. verrucosum* madurados durante 15 días siguiendo un procesado industrial.

La presencia en niveles elevados de *P. nalgiovensis* en los fuets no inoculados con este moho como es el caso del lote inoculado sólo con *P. verrucosum* o el lote control, puede deberse a contaminación a través del aire de la cámara de maduración, dado que si bien las inoculaciones se hicieron en lugares diferentes, la maduración de todos los lotes, incluidos el control se hizo en la misma cámara de maduración. Este hecho fue ya observado en otros lotes de salchichones inoculados con la misma cepa de *P. nalgiovensis* utilizada en el presente trabajo y madurados en un mismo local de maduración (Bernáldez y col., 2013a). Además está demostrado que la microbiota presente en el medio ambiente es la principal fuente de contaminación superficial fúngica de los productos cárnicos (Asefa et al., 2010; Battilani et al., 2007; Mizakovà et al., 2002; Sørensen y col., 2008). De estos resultados puede deducirse que el nivel de *P. nalgiovensis* utilizado para la implantación de este moho en el lote inoculado es suficiente para contaminar el resto de lotes a través del aire en la cámara de maduración, más aún si tenemos en cuenta que en ninguno de los lotes de fuets analizados, ni siquiera en el inoculado sólo con *P. verrucosum*, hubo acumulación de OTA. Este hecho es muy destacable si tenemos en cuenta que en las lonchas de salchichón inoculadas sólo con *P. verrucosum* y en las que no hubo ningún desarrollo de *P. nalgiovensis*, si hubo acumulación de OTA. Además, está demostrada la acumulación de OTA en embutidos crudos-curados cuando hay desarrollo en superficie de cepas productoras de OTA de *P. verrucosum*, *P. nordicum* y *Aspergillus ochraceus* (Cantoni y col., 2007; Iacumin y col., 2009; Pietri y col., 2006). Por tanto, parece que la presencia del cultivo protector de *P. nalgiovensis*

limita el desarrollo de *P. verrucosum* productor de OTA por debajo de los niveles que supone un riesgo de acumulación de OTA (Rodríguez y col., 2012b), evitando que *P. verrucosum* produzca esta micotoxina. En este trabajo queda demostrada también la facilidad de implantación y desarrollo de *P. nalgiovense* en los embutidos durante la maduración, muy por encima de otros mohos contaminantes, lo que hace que sea muy eficaz su utilización como cultivo protector para evitar la presencia de mohos toxigénicos.

## 6. Conclusiones

En relación con la higienización de productos cárnicos RTE, puede concluirse que la aplicación de E-beam y APH son métodos muy eficaces para higienizar productos cárnicos RTE. Son tecnologías “limpias” (no generan residuos radiactivos) y relativamente baratas. La elección de un método u otro depende de cuestiones industriales teniendo en cuenta dos premisas: los E-beam requieren de autorización por la autoridad competente y las APH no trabajan en flujo continuo. Otras diferencias entre ambas tecnologías son de menor consideración. Por otra parte, el trabajo realizado ha permitido desarrollar estrategias de control de patógenos con industrias cárnicas españolas líderes en el sector cárnico e innovadoras en el control de patógenos y que han estado vinculadas al desarrollo del proyecto CARNISENUSA. Ha quedado demostrado que la simple utilización de cultivos protectores de mohos no toxigénicos controla de forma eficaz el posible la acumulación de micotoxinas en productos cárnicos. Además se han desarrollado herramientas sensibles y rápidas de control de la implantación de cultivos protectores basadas en la metodología qPCR. La aplicación de estas estrategias en estas industrias como consecuencia del desarrollo del proyecto CARNISENUSA supone un extraordinario avance en la innovación en el objetivo prioritario de garantizar la seguridad alimentaria de los productos que elaboran.

## 7. Agradecimientos

La investigación que recoge este capítulo ha sido llevada a cabo en el marco del Proyecto Consolider-Ingenio 2010 CARNISENUSA CSD2007-00016, en colaboración con las Industrias Cárnicas COVAP (Córdoba) y Mataderos Industriales Soler S.A. (Prolongo)/Frigoríficos Andaluces de Conservas de Carne S.A. (FACCSA, Málaga) y con el Centro de Investigación y Calidad Agroalimentaria del Valle de los Pedroches (CICAP, Córdoba). Los autores muestran también su agradecimiento a Ricardo Martín Rodríguez de la Empresa Mataderos Industriales Soler S.A. (Prolongo)/Frigoríficos Andaluces de Conservas de Carne S.A. (FACCSA) por su colaboración y asistencia técnica en el desarrollo del trabajo en la industria.

## 8. Bibliografía

- Asefa, D.T., Kure C.F., Gjerde, R.O., Omer, M.K., Langsrud, S., Nesbakken, T., Skaar I. 2010 Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 131-135.
- Battilani, P., Pietri, V.A., Giorni, P., Formenti, S., Bertuzzi, T., Virgili, R., Kozakiewicz Z. 2007 *Penicillium* populations in dry-cured ham manufacturing plants. *Journal of Food Protection*, 70, 975-980.
- Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Rodríguez, M., Cordero, M., Polo, L., Rodríguez, A. 2013a. Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage “salchichón”. *Food Control*, 32, 69-76.
- Bernáldez, V., Rodríguez, A., Martín, A., Lozano, D., Córdoba, J.J. 2013b. Development of a multiplex qPCR method for simultaneous quantification in dry-cured ham of an antifungal-peptide *P. chrysogenum* strain used as protective culture and aflatoxin-producing moulds. *Food Control*. Aceptado.
- Camero, M.I., García de Fernando, G.D., Medina, M. 2013. Uso de tecnologías emergentes para garantizar la seguridad alimentaria de carne y productos derivados. Capítulo VI de este libro.
- Cantoni, C., Comi, G., Chiesa, L., Iacumin, L. 2007. Muffe e Ocratossina A negli insaccati crudi stagionati. *Industrie Alimentari*, 46, 10-12.

- Castellari, C., Quadrelli, A.M., Laich, F. 2010 Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 149-155.
- EDSA, 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *The EFSA Journal* 11, 3129.
- Fredlund, E., Gidlund, A., Olsen, M., Börjesson, T., Spliid, N.H.H., Simonsson, M. 2008. Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. *Journal of Microbiological Methods* 73, 33-40.
- García-Márquez, I., Cambero, M.I., Ordóñez, J.A., Cabeza, M.C. 2012a. Shelf-life extension and sanitation of fresh pork loin by E-beam treatment. *Journal of Food Protection* 75, 2179-2189.
- García-Márquez, I., Ordóñez, J.A., Cambero, M.I., Cabeza, M.C. 2012b. Use of E-beam for shelf-life extension and sanitizing of marinated pork loin. *International Journal of Microbiology* 2012:962846 doi: 10.1155/2012/962846.
- Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlic, S., Comi, G. 2009. Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiology*, 26, 65-70.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) 1993. Ochratoxin A. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monograph on the evolution of carcinogenic risks to humans*, 56, 489-521.
- Lizaso, G., Chasco, J., Beriain, M. J. 1999. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. *Food Microbiology*, 16, 219-228.
- Ludemann, V., Greco, M., Rodríguez, M.P., Basílico, J.C., Pardo, A. 2010 Conidial production by *Penicillium nalgioense* for use as starter cultures in dry fermented sausage by solid state fermentation. *LWT Food Science and Technology*, 43, 315-318.
- Martín, A., Jurado, M., Rodríguez, M., Núñez, F., Córdoba, J.J. 2004. Characterization of molds from dry-cured meat products and their metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis and random amplified polymorphic DNA PCR. *Journal of Food Protection*, 67, 2234-2239.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Aranda, E., Córdoba, M.G., Asensio, M.A. 2006. Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 8-18.
- Mizakovà, A., Pipovà, M., Turek, P. 2002 The occurrence of moulds in fermented raw meat products. *Czech Journal of Food Sciences*, 3, 89-94.
- Núñez, F., Rodríguez, M. M., Bermúdez, E., Córdoba, J. J., Asensio, M. A. 1996. Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology*, 32, 185-197.
- Papagianni, M., Papamichael, E.M. 2007 Modeling growth, substrate consumption and product formation of *Penicillium nalgioense* grown on meat simulation medium in submerged batch culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 225-231.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Gualla, A., Piva, G. 2006 Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscles and in pork products from northern Italy *Italian Journal of Food Science*, 18, 99-106.
- Portocarrero, S.M., Newman, M., Mikel, B. 2002. *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of country-cured hams manufactured under different processing procedures. *Meat Science*, 62, 267-273.
- Rodríguez, A., Córdoba J.J., Werning, M.L., Andrade, M.J., Rodríguez, M. 2012c. Duplex real-time PCR method with internal amplification control for quantification of verrucosidin producing molds in dry-ripened foods. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 85-91.
- Rodríguez, A., Córdoba J.J. Gordillo, R., Córdoba, M.G., Rodríguez, M. 2012h. Development of two quantitative real-time PCR methods based on SYBR Green and TaqMan to quantify sterigmatocystin-producing molds in food. *Food Analytical Methods*, 5, 1514-1525.
- Rodríguez, A., Luque, M.I., Andrade, M.J., Rodríguez, M., Asensio, M.A., Córdoba J.J. 2011a. Development of real-time PCR methods to quantify patulin-producing molds in food products. *Food Microbiology*, 28, 1190-1199.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Córdoba J.J. 2012e. Development of a multiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 155, 10-18.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Justensen, A.F., Córdoba, J.J. 2011b. Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 226-235.

- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Justesen, A.F., Córdoba J.J. 2012d. A comparative study of DNA extraction methods to be used in real-time PCR based quantification of ochratoxin A-producing molds in food products. *Food Control*, 25, 666-672.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Martín, A., Córdoba J.J. 2012f Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods. *Food Microbiology*, 31, 89-99.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Delgado, J., Córdoba, J.J. 2012a. Presence of ochratoxin A on the surface of dry-cured Iberian ham after initial fungal growth in the drying stage. *Meat Science*, 92, 728-734.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Núñez, F., Córdoba, J.J. 2012b. Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. *Food Control*, 27, 118-126.
- Rodríguez, A., Werning, M.L., Rodríguez, M., Bermúdez, E., Córdoba J.J. 2012g. Quantitative real-time PCR method with internal amplification control to quantify cyclopiazonic acid-producing molds in foods. *Food Microbiology*, 32, 397-405.
- Rodríguez-Martín, A. Acosta, R., Liddell, S., Núñez, F., Benito, M.J. Asensio, M. A. 2010. Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides*, 31, 541-547.
- Sørensen, L.M., Mogensen, J., Nielsen, K.F. 2010. Simultaneous determination of ochratoxin A, mycophenolic acid and fumonisin B2 in meat products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 1535-1542.
- Sosa, M. J., Córdoba, J. J., Díaz, C., Rodríguez, M., Bermúdez, E., Asensio, M. A., Núñez, 2002. Production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* isolated from dry-cured ham on a meat extract-based substrate. *Journal of Food Protection*, 65, 988-992.
- Zhu, M.J., Du, M., Cordray, J., and Ahn, D.U. 2005. Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 34-42.



## CAPÍTULO IX

### Posters presentados en las Sesiones Plenarias



## SUBPROYECTO DETRAPAT. ACCION 5: DETECCION DE VIRUS ENTERICOS (HAV, NoV) EN PRODUCTOS CARNICOS



Alejandro Rodrigo Gil, Jose Enrique Carreres, David Tomás Fornés  
Dpto. de Bioensayos, ainia centro tecnológico. Parque Tecnológico de Valencia. Paterna, 46980, Valencia.  
e-mail: argil@ainia.es www.ainia.es

### Antecedentes

A lo largo de este proyecto se ha trabajado en la optimización de un protocolo de RT-PCR para la detección y cuantificación de los virus de la hepatitis A (HAV) y los genogrupos I y II de norovirus (NoV) para su análisis en distintos productos cárnicos. En etapas previas, se seleccionaron los genes dianas y oligonucleótidos, se optimizó la fase de extracción viral y de la RT-PCR. Finalmente, se realizó el protocolo de validación en distintos productos cárnicos y sobre los 2 virus de interés. Durante el 2011 se trabajó en algunas etapas del ensayo, así como en la estimación de la incidencia de estos virus en productos cárnicos.

### Metodología y plan de trabajo

#### Optimización del protocolo de extracción de ARN

Protocolo de extracción viral: se compara el método recomendado por el CEN frente a 2 métodos automatizados (Maxwell16, EZ1 Qiagen) en muestras inoculadas con mengovirus. Se analizan un total de 6 muestras.

#### Estudio comparativo del protocolo de extracción de mengovirus

Se compara el método de extracción térmica utilizado para la realización de la recta de calibración del mengo según el método CEN frente a la extracción con tiocianato de guanidino/silica utilizado para la extracción a partir de muestras reales.

#### Estudio de incidencia en productos cárnicos

Como estudio complementario al desarrollo y optimización del método de ensayo de virus entéricos, se realizó una estimación de la incidencia de dichos virus en productos cárnicos que se distribuyen de forma habitual en la comunidad valenciana. Se analizaron un total de 9 productos entre los que se incluyeron muestras de jamón cocido loncheado, chorizo loncheado y salchichón loncheado.

De cada muestra se tomó un total de 25 g de producto y se analizaron por duplicado.

### Resultados

Al objeto de mejorar el procedimiento de ensayo y reducir la manipulación de las muestras se compararon 3 métodos de extracción de ARN viral a partir de diferentes muestras, con los siguientes resultados:

| Muestra   | Método extracción viral     | Resultados (mengovirus) |                         |
|-----------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|
|           |                             | Ct RT-PCR               | Eficiencia Extracción % |
| Muestra 1 | Método recomendado CEN      | 27.96                   | 3.95                    |
|           | Método automatizado EZ1     | 29.75                   | 1.35                    |
|           | Método automatizado Maxwell | 27.66                   | 8.00                    |
| Muestra 2 | Método recomendado CEN      | 26.89                   | 8.35                    |
|           | Método automatizado EZ1     | 27.64                   | 6.10                    |
|           | Método automatizado Maxwell | 26.31                   | 19.60                   |
| Muestra 3 | Método recomendado CEN      | 28.33                   | 5.45                    |
|           | Método automatizado EZ1     | 31.11                   | 1.00                    |
|           | Método automatizado Maxwell | 28.51                   | 8.20                    |
| Muestra 4 | Método recomendado CEN      | 27.98                   | 7.35                    |
|           | Método automatizado EZ1     | 30.77                   | 1.30                    |
|           | Método automatizado Maxwell | 28.37                   | 11.20                   |

En todos los casos, los mejores resultados se observan con el método del Maxwell16, según el procedimiento del CEN. Los 3 métodos se basan en el uso de isotiocianato de guanidino y sílica magnética, aunque varían en cuanto al volumen inicial de muestra analizada, volumen final de elución, y el proceso de limpieza de la muestra, lo que puede dar lugar a las diferencias observadas.

Respecto a la extracción del mengovirus en ausencia de matriz, el método que mostró peor eficiencia fue el de lisis térmica, método recomendado en el CEN. Los otros 3 métodos testados (uno manual y 2 automatizados) presentaron resultados muy parecidos entre ellos.

| Concentración Mengovirus | Extracción manual kit BioMerieux | Extracción EZ1 | Extracción Maxwell | Lisis térmica |
|--------------------------|----------------------------------|----------------|--------------------|---------------|
| ARN Directo              | 20.25                            | 20.33          | 19.92              | 23.10         |
| 1/10                     | 23.34                            | 23.46          | 23.00              | 26.21         |
| 1/100                    | 26.85                            | 26.89          | 26.61              | 29.64         |
| 1/1000                   | 30.15                            | 29.99          | 30.39              | 33.09         |

Finalmente, los análisis de incidencia sobre los productos indicados anteriormente, no han mostrado la presencia de ninguno de los 3 virus analizados (HAV y NoV GI y GII) con parámetros de calidad (eficiencia de extracción y eficiencia de amplificación) acordes a lo indicado en la norma CEN.

### Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se ha conseguido obtener un método analítico válido para el análisis de los virus de la hepatitis A y NoV aplicado a diferentes productos cárnicos utilizando la técnica de la RT-PCR a tiempo real. Los datos obtenidos indican la posibilidad de implementar en el método un protocolo automatizado de extracción del ARN viral que disminuya la manipulación del analista y obtenga el ARN en menor tiempo, así como extraer el mengovirus mediante el mismo método de extracción. Los estudios de incidencia no han mostrado la presencia de virus entéricos (HAV y NoV) en los productos cárnicos analizados.

### Referencias

prEN XXXXX-2:2011. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR – Part 2: Method for qualitative detection

prEN XXXXX-1:2011. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR – Part 1: Method for quantitative determination

**Introducción**

La caracterización de *L. monocytogenes* a nivel de cepa, aunque no incluida dentro del Reglamento (CE) 2073/2005 sobre criterios microbiológicos y por tanto no obligatoria, se considera crucial tanto para determinar los focos de contaminación en la industria alimentaria como para determinar el alimento causante del caso clínico. La tipificación de las cepas puede realizarse mediante métodos fenotípicos (que caracterizan productos de la expresión génica para la diferenciación de las cepas) o métodos genotípicos (basados en el análisis directo del ADN de las cepas). Entre los primeros destacan el serotipado, el MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*), la resistencia a antimicrobianos y el fagotipado. El principal inconveniente de estos métodos es su bajo poder discriminatorio. Los métodos genotípicos, en cambio, tienen un alto poder de discriminación para caracterizar las cepas y entre las múltiples técnicas disponibles destacan el PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*, técnica de referencia para la tipificación de cepas de *L. monocytogenes*), las técnicas de PCR como Rep-PCR (amplificación de elementos repetitivos), RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA) y AFLP (amplified fragment length polymorphism) y la tipificación mediante secuenciación como el MLST (*multilocus sequence typing*).

**Objetivos**

1. Tipificar diversas cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de productos y/o equipamiento de fábrica de diferentes industrias cárnicas mediante *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) y serotipado.
2. Evaluar la utilidad de las técnicas utilizadas como herramientas para la identificación del foco de contaminación de *Listeria monocytogenes* en industrias cárnicas.

**Metodología**

> 81 cepas de *Listeria monocytogenes*



1. Serotipado

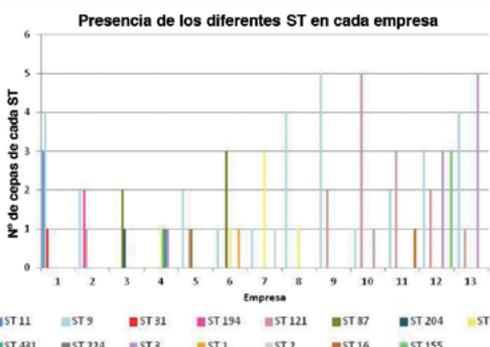
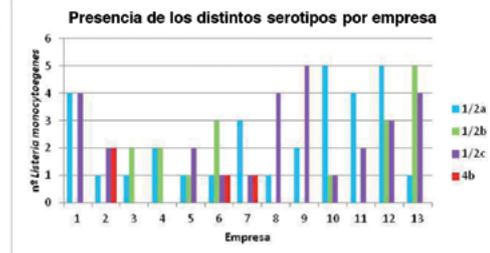
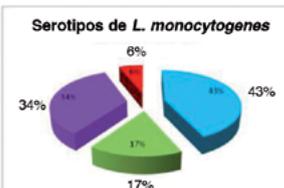
- > 13 empresas españolas de productos cárnicos listos para el consumo
  - > 28 aislados de equipamiento de fábrica.
  - > 53 aislados de productos cárnicos LPC producidos en las fábricas

1.a. PCR multiplex (Doumith et al. 2004)

1.b. Reacciones antígeno-anticuerpo (kit de serotipado Denka Seiken, Tokyo, Japón).

2. MLST (Ragon et al. 2008) / <http://www.pasteur.fr/mist/Lmono.html>

**Resultados y Conclusiones**



- Los serotipos 1/2a y 1/2c de *L. monocytogenes* fueron los predominantes en las industrias de productos cárnicos listos para el consumo estudiadas. En cambio, el serotipo 4b (el más asociado a brotes de listeriosis) presentó una baja incidencia en estos tipos de industrias y productos.
- Los genotipos ST9 y ST121 de *L. monocytogenes* fueron los predominantes en las industrias estudiadas indicando su capacidad de adaptación y supervivencia en el equipamiento de la fábrica y en los productos LPC evaluados.
- El genotipado mediante MLST de las cepas de *L. monocytogenes* evidenció diferentes fuentes de contaminación en cada una de las diferentes industrias cárnicas evaluadas y constató la contaminación cruzada entre equipamiento y producto final en la mayoría de las fábricas.
- La técnica de MLST fue mucho más discriminante que el serotipado para la diferenciación de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de Industrias cárnicas.

**Referencias**

Doumith M., Buchrieser C., Giaslet P., Jacquet C y Martin J. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. Clin. Microbiol. 42(8): 3819-3822.  
 Ragon M, Wirth T, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A, Brisse S (2008). A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. Plos Pathogens 4:e1000146

### SUBPROYECTO 2 (DETRAPAT)

Incidencia, prevalencia y detección de patógenos por técnicas rápidas en la industria cárnica y productos cárnicos RTE.

**Acción 4. Desarrollo de métodos de PCR convencional y en tiempo real para detectar *E. coli* O157:H7 y microorganismos toxigénicos en productos cárnicos.**

Alicia Rodríguez, Rubén Gordillo, Juan José Córdoba, Miguel Ángel Asensio, Elena Bermúdez, Félix Núñez, M<sup>a</sup> Jesús Andrade y Mar Rodríguez.



### CUANTIFICACIÓN DE *E. coli* O157:H7 VIABLE EN PRODUCTOS CÁRNICOS RTE MEDIANTE RT-qPCR MÚLTIPLE

**OBJETIVO:** Optimizar un método de RT-qPCR basado en la metodología TaqMan para la cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7 viable en productos cárnicos RTE.

#### METODOLOGÍA:

1. Inoculación de productos cárnicos con *E. coli* O157:H7 en un rango de  $\sim 10^6$  ufc/g a 1 ufc/g
2. Enriquecimiento a 37°C durante 0, 2 y 4 h en CVBB
3. Concentración con Dynabeads anti-*E. coli* O157:H7
4. Extracción ARN con kit MasterPure RNA Purification
5. Síntesis ADNc con kit PrimeScript RT Reagent
6. RT-qPCR múltiple con las condiciones optimizadas

**CONCLUSIONES:** El método de RT-qPCR múltiple desarrollado, con y sin enriquecimiento previo, para la detección de células viables de *E. coli* O157:H7 presenta una gran especificidad y sensibilidad y podría ser de gran utilidad en la cuantificación de este microorganismo en productos cárnicos RTE.

#### RESULTADOS:

Tabla 1. Límite de detección de la RT-qPCR a partir de productos cárnicos inoculados con *E. coli* O157:H7 después de 0, 2 y 4 horas de enriquecimiento a 37 °C (el experimento se realizó por triplicado).

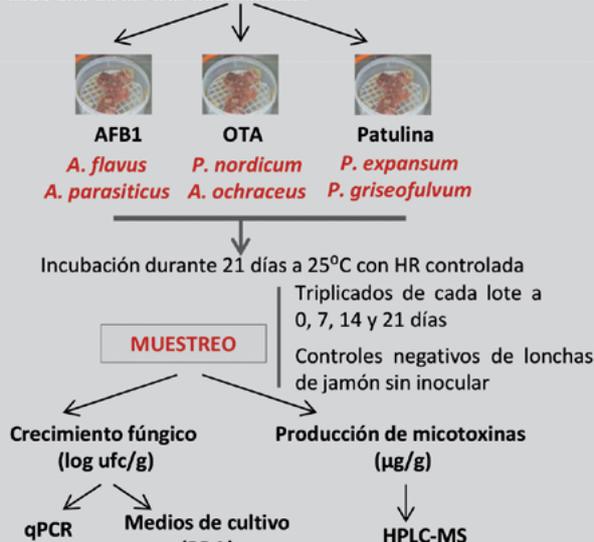
| Productos cárnicos RTE | Límite de detección (ufc/g $\pm$ DS) |                |   |
|------------------------|--------------------------------------|----------------|---|
|                        | Enriquecimiento (horas)              |                |   |
|                        | 0                                    | 2              | 4 |
| Jamón curado           | 22 $\pm$ 0,80                        | 2,2 $\pm$ 0,08 | 1 |
| Lomo curado            | 6,2 $\pm$ 0,01                       | 1              | 1 |
| Salami                 | 21 $\pm$ 2,40                        | 2,1 $\pm$ 0,06 | 1 |
| Salchichón             | 3,1 $\pm$ 0,04                       | 1              | 1 |
| Chorizo                | 6,7 $\pm$ 0,05                       | 1              | 1 |
| Pechuga pavo           | 5,8 $\pm$ 0,07                       | 1              | 1 |
| Jamón cocido           | 6,7 $\pm$ 0,01                       | 1              | 1 |
| Chopped                | 82 $\pm$ 0,90                        | 8,2 $\pm$ 0,19 | 1 |
| Mortadela              | 5,1 $\pm$ 0,03                       | 1              | 1 |
| Bacon                  | 1,8 $\pm$ 0,14                       | 1              | 1 |

### APLICACIÓN DE MÉTODOS DE qPCR PARA CUANTIFICAR MOHOS PRODUCTORES DE AFLATOXINA B1, OCRATOXINA A Y PATULINA EN JAMÓN CURADO

**OBJETIVO:** Estudiar la validez de las técnicas de qPCR desarrolladas para la detección y confirmación de mohos productores de aflatoxina B1 (AFB1), ocratoxina A (OTA) y patulina, para poder aplicarlas en los programas APPCC y prevenir la producción de dichas micotoxinas.

#### METODOLOGÍA:

Inoculación superficial de lonchas de jamón curado, por separado, con esporas (3 log/g) de mohos productores de cada una de las tres micotoxinas.



**CONCLUSIONES:** Las técnicas de qPCR desarrolladas, permiten cuantificar los mohos productores de micotoxinas antes de que haya producción, por lo que pueden ser de gran utilidad para la monitorización de mohos toxigénicos en jamón curado.

**RESULTADOS:** Se obtuvo una alta correlación entre los recuentos obtenidos en placa (ufc) y la cuantificación mediante qPCR. En todos los casos la detección de mohos toxigénicos fue anterior a la producción de micotoxinas en las lonchas de jamón curado (Figura 1) (Rodríguez y col., 2011 y 2012).

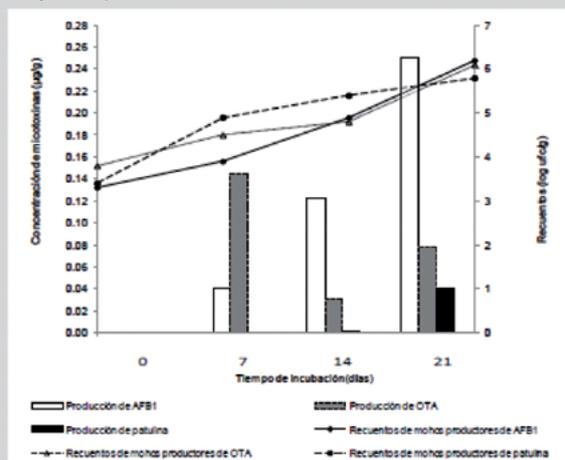


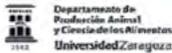
Figura 1. Comparación de la producción de aflatoxina B1, ocratoxina A y patulina con el recuento obtenido por qPCR (log ufc/g) de mohos productores de las tres micotoxinas inoculados en lonchas de jamón curado durante 21 días de incubación a 25 °C.

#### REFERENCIAS:

Rodríguez y col., BioMicroWorld, pp. 262 (2011).  
 Rodríguez y col., Food Control, 27, 118-126 (2012).

Valencia, 13-14 de Septiembre de 2012

## Resistencia a los antibióticos de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* aisladas de productos cárnicos cocidos LPC



Ruesca, N., Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C. y Yangüela, J.

Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad Veterinaria. Universidad Zaragoza. Miguel Servet, 177  
50009 Zaragoza. E-mail: jyangu@unizar.es

### Objetivos

Estudiar la sensibilidad de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* aisladas de productos cárnicos cocidos LPC a diferentes antibióticos utilizados en medicina humana y veterinaria. Además observar si existen diferencias en el perfil de sensibilidad a los antibióticos entre las cepas de las dos especies de *Listeria* estudiadas.

### Material y métodos

**Método difusión en disco (CA-SFM, Recommendations 2010)**  
**Cepas estudiadas** (aisladas en productos cárnicos cocidos LPC)

|             | <i>L. monocytogenes</i><br>(26 cepas) | <i>L. innocua</i><br>(25 cepas) |
|-------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Jamón cerdo | 16                                    | 9                               |
| Mortadela   | -                                     | -                               |
| Chóped      | -                                     | 4                               |
| Jamón pavo  | 4                                     | 2                               |
| Salchichas  | -                                     | 3                               |
| Otros       | 6                                     | 7                               |

**Control:**

*Escherichia coli* ATCC® 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212

**Antibióticos:**

|                             |     |       |                            |     |       |
|-----------------------------|-----|-------|----------------------------|-----|-------|
| Amoxicilina/ác. clavulánico | AMC | 30 µg | Meropenem                  | MEM | 10 µg |
| Ampicilina                  | AMP | 10 µg | Moxifloxacino              | MXF | 5 µg  |
| Ciprofloxacino              | CIP | 5 µg  | Oxacilina                  | OX  | 1 µg  |
| Clindamicina                | DA  | 2 µg  | Penicilina G               | P   | 10 µg |
| Claritromicina              | CLR | 15 µg | Rifampicina                | RD  | 30 µg |
| Cloranfenicol               | C   | 30 µg | Sulfametoxazol/trimetoprim | SXT | 25 µg |
| Gentamicina                 | CN  | 10 µg | Teicoplanina               | TEC | 30 µg |
| Imipenem                    | IPM | 10 µg | Tetraciclina               | TE  | 30 µg |
| Levofloxacino               | LEV | 5 µg  | Tigeciclina                | TGC | 15 µg |
| Línezolid                   | LZD | 30 µg | Vancomicina                | VA  | 30 µg |

Además para *L. innocua*: estreptomicina (S; 10 µg), eritromicina (E; 15 µg), minociclina (MH; 30 µg), sulfametoxazol (RL; 25 µg) y trimetoprim (W; 5 µg).

**Método Epsilon test**

**Cepas estudiadas:** cepas con lectura dudosa en el método difusión en disco.

21 cepas de *L. innocua*

**Antibióticos:** 3 ciprofloxacino (CIP; 32-0,002 µg/ml), 6 penicilina G (P; 32-0,002 µg/ml) y 12 tetraciclina (TE; 256-0,015 µg/ml).

Se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI)

### Resultados

**Método Epsilon-test**

*L. innocua*

| Antibiótico        | CMI (µg/ml) |       |       |       |       |       |       |      |     |   |   |
|--------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-----|---|---|
|                    | 0,002       | 0,004 | 0,008 | 0,016 | 0,032 | 0,064 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 |
| Ciprofloxacino (3) |             |       |       |       |       |       |       |      | 3   | 1 |   |
| Penicilina G (6)   |             |       |       |       |       |       |       | 1    | 4   | 2 | 1 |
| Tetraciclina (12)  |             |       |       |       |       |       |       |      |     |   | 1 |

I Sensible  
II Resistente

**Método difusión en disco y E-test**

| Antibióticos                  | <i>L. monocytogenes</i><br>(26 cepas) |   |      | <i>L. innocua</i><br>(25 cepas) |    |     |
|-------------------------------|---------------------------------------|---|------|---------------------------------|----|-----|
|                               | S                                     | I | R    | S                               | I  | R   |
| Amoxicilina-ácido clavulánico | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Ampicilina                    | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Ciprofloxacino                | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Claritromicina                | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Clindamicina                  | 80,8                                  |   | 19,2 | 20                              |    | 80  |
| Cloranfenicol                 | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Eritromicina                  |                                       |   |      | 100                             |    |     |
| Estreptomicina                |                                       |   |      | 100                             |    |     |
| Gentamicina                   | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Imipenem                      | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Levofloxacino                 | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Línezolid                     | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Meropenem                     | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Minociclina                   |                                       |   |      | 100                             |    |     |
| Moxifloxacino                 | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Oxacilina                     |                                       |   | 100  |                                 |    | 100 |
| Penicilina G                  | 100                                   |   |      | 76                              | 24 |     |
| Rifampicina                   | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Sulfametoxazol                |                                       |   |      | 100                             |    |     |
| Sulfametoxazol-trimetoprim    | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Teicoplanina                  | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Tetraciclina                  | 100                                   |   |      | 52                              |    | 48  |
| Tigeciclina                   | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |
| Trimetoprim                   |                                       |   |      | 100                             |    |     |
| Vancomicina                   | 100                                   |   |      | 100                             |    |     |

### Conclusiones

*L. monocytogenes* ha presentado un 19,2% (5 cepas) resistentes a la clindamicina, mientras que *L. innocua* ha presentado al mismo antibiótico un 80% (20 cepas) y un 48% (12 cepas) resistentes a la tetraciclina. Se comprueba también, una sensibilidad disminuida a la penicilina G (6 cepas intermedias). Como era de esperar el 100% de las especies de *Listeria* fueron resistentes a la oxacilina. Todas las cepas ensayadas presentan buena sensibilidad a los antibióticos de elección de la listeriosis así como a los que se usan como alternativa o segunda elección.

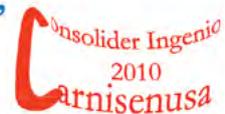
# Recuento y detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos LPC adquiridos en hipermercados, supermercados y charcuterías

1



Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C. y Yangüela, J.

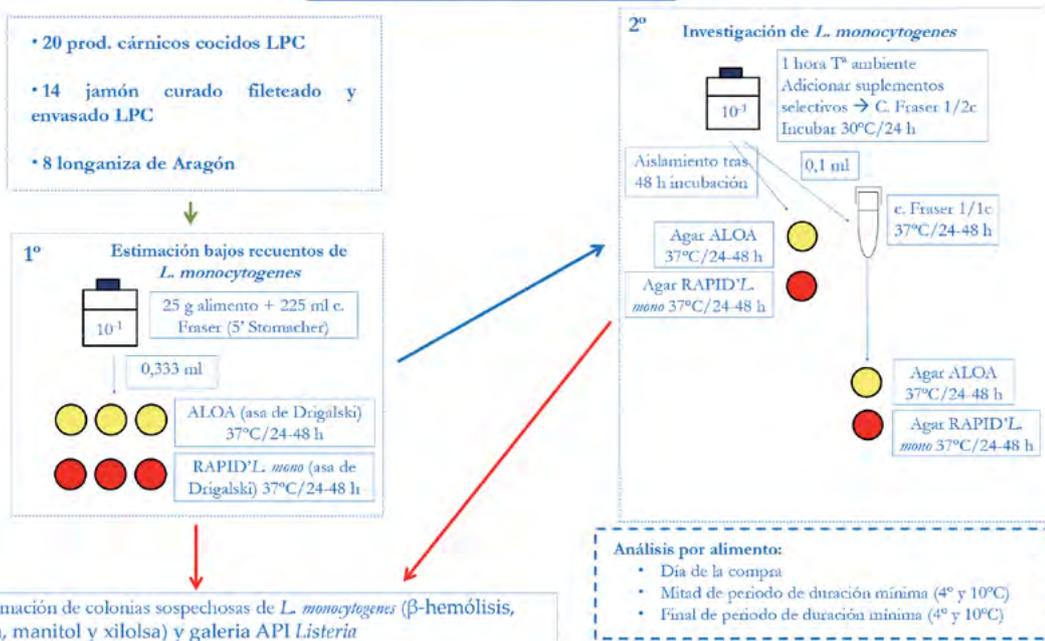
Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad Veterinaria. Universidad Zaragoza  
Miguel Servet, 177 50009 Zaragoza. E-mail: jyangu@unizar.es



## OBJETIVOS

Detección y cuantificación de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos LPC el día de la compra y a mitad y final del periodo de duración mínima almacenados a 4° y 10°C.

## MATERIAL Y MÉTODOS



## RESULTADOS

### Recuento de *L. monocytogenes*

Muestra que han presentado recuento de *L. monocytogenes*

| Alimento      | Nº   | Día visita | MPDM   |      | FPDM |                     |
|---------------|------|------------|--------|------|------|---------------------|
|               |      |            | 4°C    | 10°C | 4°C  | 10°C                |
| Prod. cocidos | 1    |            | 1,0x10 | <10  | <10  | 1,0x10              |
|               | 2    |            | <10    | <10  | <10  | 9,7x10 <sup>3</sup> |
| Jamón curado  | 1-14 |            | <10    | <10  | <10  | <10                 |
| Longaniza     | 1    |            | 1,0x10 | <10  | <10  | <10                 |
| Aragón        | 2    |            | 3,0x10 | <10  | <10  | <10                 |

MPDM: mitad periodo de duración mínima.  
FPDM: final periodo de duración mínima.

### Investigación de *Listeria* spp.

Muestra positivas a la presencia de *L. monocytogenes*/25 g

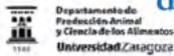
| Producto Cárnico | Nº | Día visita | MPDM  |      | FPDM |      |
|------------------|----|------------|-------|------|------|------|
|                  |    |            | 4°C   | 10°C | 4°C  | 10°C |
| Prod. Cocido     | 20 |            | 5%    | 0%   | 20   | 0%   |
| Jamón curado     | 14 |            | 21,4% | 7,1% | 14   | 0%   |
| Longaniza Aragón | 8  |            | 2     | 3    | 8    | 3    |

## CONCLUSIONES

Se ha obtenido recuento de *L. monocytogenes* en 5 análisis, 3 de ellos el día de la compra y dos a final del periodo de duración mínima en productos cocidos, superando uno de ellos el límite de 100 ufc/g. En la detección de la especie patógena destaca la mayor presencia en las muestras de longaniza de Aragón a lo largo de todo el periodo de duración mínima. En el caso del jamón curado, la presencia de *L. monocytogenes* disminuye conforme avanza el periodo de duración mínima, mientras que en los productos cocidos sólo se detecta el día de la compra y al final del periodo de duración mínima a ambas temperaturas.

# Antibiótico resistencias en cepas de *Listeria* spp. aisladas de productos cárnicos y de entornos de producción

2



Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos Universidad Zaragoza

Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C. y Yangüela, J.  
 Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad Veterinaria. Universidad Zaragoza  
 Miguel Servet, 177 50009 Zaragoza. E-mail: jyangu@unizar.es



## Objetivos

Estudiar la sensibilidad de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* aisladas de alimentos y zonas de producción de los mismos a diferentes antibióticos utilizados en medicina humana y veterinaria. Además observar si existen diferencias en el perfil de sensibilidad a los antibióticos entre las cepas de las dos especies de *Listeria* estudiadas. Finalmente, determinar, mediante el estudio bibliográfico, si la sensibilidad antimicrobiana de la especie patógena, *L. monocytogenes*, es diferente a las cepas aisladas en humanos.

## Material y métodos

Método difusión en disco (CA-SFM, Recommendations 2010)

**Cepas estudiadas** (aisladas en industrias de Salamanca, Cáceres, Badajoz y Huelva y de productos cárnicos LPC adquiridos en establecimientos)

|               |                           | <i>L. monocytogenes</i><br>(131 cepas) | <i>L. innocua</i><br>(85 cepas) |
|---------------|---------------------------|--|---------------------------------|
| Prod. cárnico | Cocido                    | 26                                     | 13                              |
|               | Crudo curado              | 49                                     | 45                              |
|               | Madurado estruct. íntegra | 7                                      | 4                               |
| Supf.         | Acero                     | 41                                     | 23                              |
|               | Polietileno               | 8                                      | -                               |

### Control:

*Escherichia coli* ATCC® 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212

### Antibióticos:

|                             |     |       |                            |     |       |
|-----------------------------|-----|-------|----------------------------|-----|-------|
| Amoxicilina/ác. clavulánico | AMC | 30 µg | Meropenem                  | MEM | 10 µg |
| Ampicilina                  | AMP | 10 µg | Moxifloxacino              | MXF | 5 µg  |
| Ciprofloxacino              | CIP | 5 µg  | Oxacilina                  | OX  | 1 µg  |
| Clindamicina                | DA  | 2 µg  | Penicilina G               | P   | 10 µg |
| Claritromicina              | CLR | 15 µg | Rifampicina                | RD  | 30 µg |
| Cloranfenicol               | C   | 30 µg | Sulfametoxazol/trimetoprim | SXT | 25 µg |
| Gentamicina                 | CN  | 10 µg | Teicoplanina               | TEC | 30 µg |
| Imipenem                    | IPM | 10 µg | Tetraciclina               | TE  | 30 µg |
| Levofloxacino               | LEV | 5 µg  | Tigeciclina                | TGC | 15 µg |
| Linezolid                   | LZD | 30 µg | Vancomicina                | VA  | 30 µg |

Además para *L. innocua*: estreptomina (S; 10 µg), entromicina (E; 15 µg), minociclina (MH; 30 µg), sulfametoxazol (RL; 25 µg) y trimetoprim (W; 5 µg).

### Método Epsilon test

**Cepas estudiadas:** cepas con lectura dudosa en el método difusión en disco.

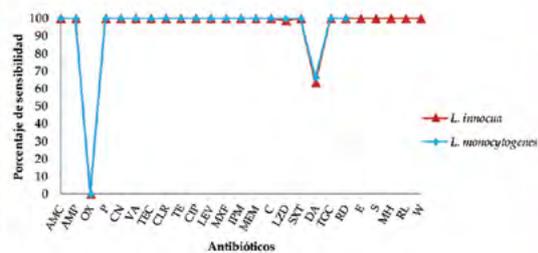
1 cepa de *L. innocua*

**Antibióticos:** linezolid (LZD; 256-0,015 µg/ml).

Se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI)

## Resultados

### Método difusión en disco



### Método Epsilon-test

*L. innocua*

| Antibiótico (n° cepas) | CMI (µg/ml) |
|------------------------|-------------|
| 0.002                  |             |
| 0.004                  |             |
| 0.008                  |             |
| 0.016                  |             |
| 0.032                  |             |
| 0.064                  |             |
| 0.125                  |             |
| 0.25                   |             |
| 0.5                    |             |
| 1                      | 1           |
| 2                      | 1           |
| 4                      | 1           |
| 8                      | 1           |
| 16                     | 1           |
| 32                     | 1           |
| 64                     | 1           |
| 128                    | 1           |
| 256                    | 1           |

La totalidad de las cepas de *L. monocytogenes* y de *L. innocua* fueron resistentes a la oxacilina. Frente a la clindamicina la resistencia fue menor (33,6% para *L. monocytogenes* y 36,5% para *L. innocua*). Una cepa de *L. innocua* que había resultado resistente al linezolid mediante el método de difusión en disco, finalmente es sensible a dicho antibiótico al estudiar su CMI con el Epsilon-test.

## Conclusiones

*Listeria monocytogenes* es objeto de una atención especial en salud pública ya que presenta tasas elevadas de mortalidad en los grupos poblacionales de riesgo. No obstante, las cepas ensayadas aisladas de productos cárnicos LPC y de ambiente de producción presentan buena sensibilidad a los antibióticos de elección (ampicilina y gentamicina) de la listeriosis así como a los que se usan como alternativa o segunda elección (trimetoprim/sulfametoxazol).

# Evaluación de la recuperación de 15 cepas de *Listeria monocytogenes* en superficies de acero inoxidable

3

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos Universidad Zaragoza

Consolider Ingenio 2010 Carnisenusa

Iguácel, L., Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C. y Yangüela, J.  
Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad Veterinaria. Universidad Zaragoza  
Miguel Servet, 177 50009 Zaragoza. E-mail: jyangu@umizar.es

## OBJETIVO

Puesta a punto y aplicación de las técnicas de muestreo ambiental de esponja de celulosa, mini-rodillo de fibra 100% lana tejida e hisopo de algodón, en el control microbiológico de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable y de polietileno de alto peso molecular.

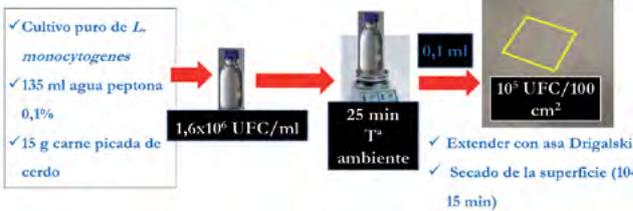
## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Cepas de *L. monocytogenes*

| Nº cepa | Muestra                            | Superficie  | Tipo de alimento            |
|---------|------------------------------------|-------------|-----------------------------|
| 1       | Mesa para apartar la carne         | PAPM        |                             |
| 2       | Mesa descortezar                   | PAPM        |                             |
| 3       | Cinta entrada jamón (Línea limpia) | PVC         |                             |
| 4       | Cuchilla fileteadora               | Acero inox. |                             |
| 5       | Cuchillo manipulador               | Acero inox. |                             |
| 6       | Mesa deshuesado                    | Acero inox. |                             |
| 7       | Salchichón ibérico                 |             | Crudos-curados              |
| 8       | Chorizo sin envasar                |             | Crudos-curados              |
| 9       | Chistorra                          |             | Crudos-curados              |
| 10      | Tuas jamón curado                  |             | Madurados est. nus. íntegra |
| 11      | Cinta lomo ibérico de bellota      |             | Madurados est. nus. íntegra |
| 12      | Morzo cocido                       |             | Cocidos                     |
| 13      | Cabeza de cerdo                    |             | Cocidos                     |
| 14      | Morcilla ibérica                   |             | Cocidos                     |
| 15      | Humana CECT 935                    |             |                             |

PAPM: Polietileno de alto peso molecular.  
PVC: Cloruro de polivinilo.

### 2. Suspensión bacteriana



### 3. Superficies estudiadas

- ✓ Mesa de acero inoxidable
- ✓ Tabla de corte de polietileno de alto peso molecular

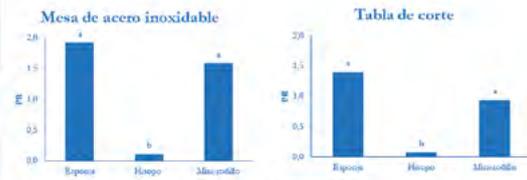
### 4. Métodos de toma de muestras estudiados

- ✓ Esponja de celulosa
- ✓ Mini-rodillo de fibra 100% lana tejida
- ✓ Hisopo de algodón

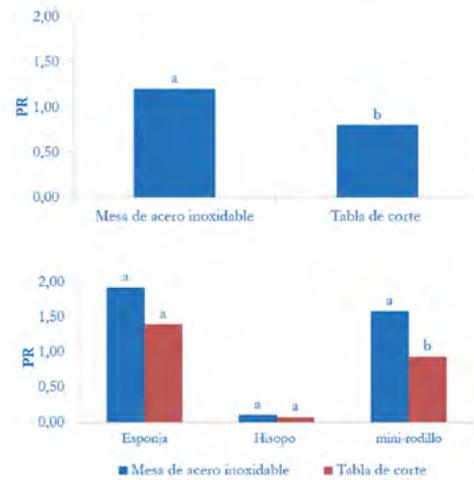
### 5. Homogeneización, siembra y recuento



## RESULTADOS



Las muestras con diferente letra presentan diferencias estadísticas PR: porcentaje de recuperación.



### Media de los PR de los tres procedimientos para cada cepa y superficie

| MESA ACERO INOXIDABLE |      | TABLA DE CORTE |      |
|-----------------------|------|----------------|------|
| nº cepa               | PR   | nº cepa        | PR   |
| 4                     | 3,58 | 4              | 2,16 |
| 3                     | 2,42 | 1              | 1,33 |
| 2                     | 1,77 | 2              | 1,17 |
| 13                    | 1,73 | 3              | 0,96 |
| 11                    | 1,58 | 7              | 0,85 |
| 10                    | 1,49 | 8              | 0,84 |
| 8                     | 1,28 | 9              | 0,75 |
| 1                     | 0,98 | 11             | 0,65 |
| 9                     | 0,87 | 5              | 0,62 |
| 12                    | 0,82 | 12             | 0,60 |
| 5                     | 0,56 | 10             | 0,56 |
| 14                    | 0,39 | 13             | 0,50 |
| 6                     | 0,20 | 6              | 0,35 |
| 7                     | 0,15 | 14             | 0,33 |
| 15                    | 0,13 | 15             | 0,28 |

## CONCLUSIONES

- ✓ Los procedimientos de muestreo de la esponja de celulosa y del mini-rodillo de lana pueden utilizarse indistintamente para la recuperación de *Listeria monocytogenes* de superficies de acero inoxidable o de superficies de polietileno de alto peso molecular.
- ✓ Puede entrañar mayor dificultad la detección de *Listeria monocytogenes* en superficies de corte de polietileno de alto peso molecular que en superficies de acero inoxidable, ya que nuestros resultados muestran porcentajes de recuperación de 0,8% para la primera y de 1,2% para la segunda con diferencias significativas.



Departamento de  
Producción Animal  
y Ciencia de los Alimentos  
Universidad Zaragoza

## Control bacteriológico de la higiene de los procesos en un matadero de Aragón

4



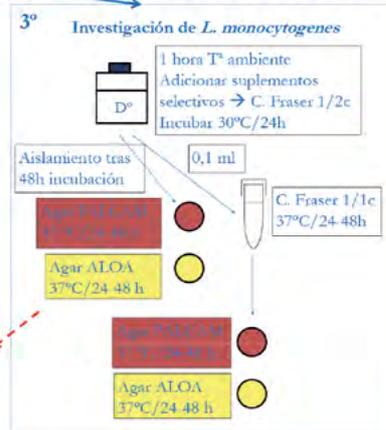
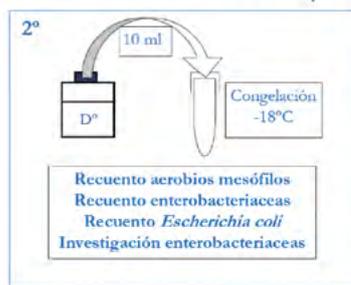
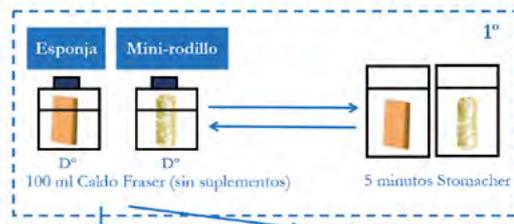
Iguácel, L., Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C. y Yangüela, J.  
Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad Veterinaria. Universidad Zaragoza  
Miguel Servet, 177 50009 Zaragoza. E-mail: jyangu@unizar.es

### OBJETIVO

Realizar control microbiológico ambiental de las líneas de faenado de ovino, porcino, vacuno y sala de tripería de un matadero de Aragón mediante las metodologías de esponja de celulosa y mini-rodillo de fibra 100% lana tejida-velour.

### MATERIAL Y MÉTODOS

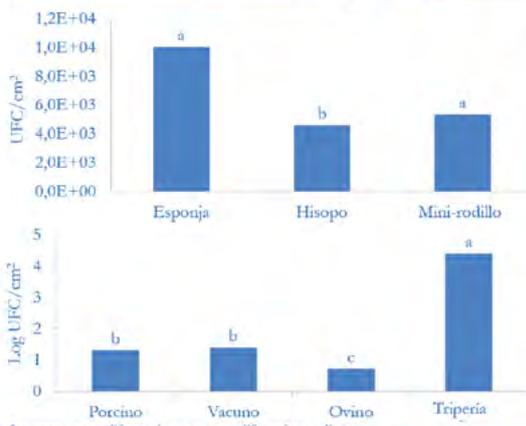
| Zona     | Material         | Nº muestras | total |
|----------|------------------|-------------|-------|
| Ovino    | Acero inoxidable | 19          | 19    |
| Porcino  | Acero inoxidable | 19          | 19    |
| Vacuno   | Acero inoxidable | 8           | 19    |
|          | PAPM             | 5           |       |
| Tripería | PVC              | 6           | 20    |
|          | Acero inoxidable | 16          |       |
| Total    | PAPM             | 4           | 77    |



4º Preconfirmación de colonias sospechosas de *L. monocytogenes* ( $\beta$ -hemólisis, ramnosa, manitol y xilolsa) y galería API Listeria

### RESULTADOS

#### Recuento de aerobios/cm<sup>2</sup>



Las muestras con diferente letra presentan diferencias estadísticas

#### Investigación de *L. monocytogenes*

#### Según Decisión 2001/471 (derogada)

| Rto. aerobios mesófilos   |             |                       |                         | Rto. enterobacterias   |             |                       |                         |
|---------------------------|-------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|-------------|-----------------------|-------------------------|
| <10,0 UFC/cm <sup>2</sup> |             |                       |                         | <1 UFC/cm <sup>2</sup> |             |                       |                         |
| Línea                     | Nº muestras | % muestras satisfact. | % muestras insatisfact. | Línea                  | Nº muestras | % muestras satisfact. | % muestras insatisfact. |
| Ovino                     | 19          | 94,8                  | 5,2                     | Ovino                  | 19          | 100                   | 0                       |
| Porcino                   | 19          | 52,6                  | 47,4                    | Porcino                | 19          | 100                   | 0                       |
| Vacuno                    | 19          | 36,8                  | 63,2                    | Vacuno                 | 19          | 94,7                  | 5,3                     |
| Tripería                  | 20          | 40,0                  | 60,0                    | Tripería               | 20          | 70,0                  | 30,0                    |
| Todas                     | 77          | 55,9                  | 44,1                    | Todas                  | 77          | 91                    | 9                       |

- Investigación *E. coli*:
  - ✓ 3 muestras positivas de sala de tripería
- Investigación *L. monocytogenes*:
  - ✓ No se detecta

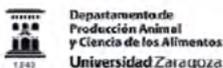
### CONCLUSIONES

A nivel de superficies en un matadero de Aragón (líneas de sacrificio y sala de tripería) la técnica de muestreo que proporciona mayores recuentos es la esponja de celulosa, seguida del mini-rodillo de lana y del hisopo de algodón. La localización que presenta recuentos más elevados de aerobios mesófilos es la sala de tripería seguida de las líneas de porcino y vacuno. Los recuentos más bajos se obtienen en la línea de ovino. Casi la tercera parte (6 muestras) de las muestras procedentes de la sala de tripería presentan recuentos de *Enterobacteriaceas*. El procedimiento del mini-rodillo de lana es el que consigue mayor número de recuentos, cuadruplicando a la esponja de celulosa y al del hisopo de algodón. No se detecta la presencia de *Listeria monocytogenes* ni de especies del género *Listeria* en 100 cm<sup>2</sup>. Si que se detecta la presencia de *Escherichia coli* en 1 cm<sup>2</sup> en tres muestras procedentes de la sala de tripería

# Listeria monocytogenes en productos cárnicos cocidos LPC

5

Ruesca, N., Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C. y Yangüela, J.  
 Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad Veterinaria. Universidad Zaragoza  
 Miguel Servet, 177 50009 Zaragoza. E-mail: jyangu@unizar.es

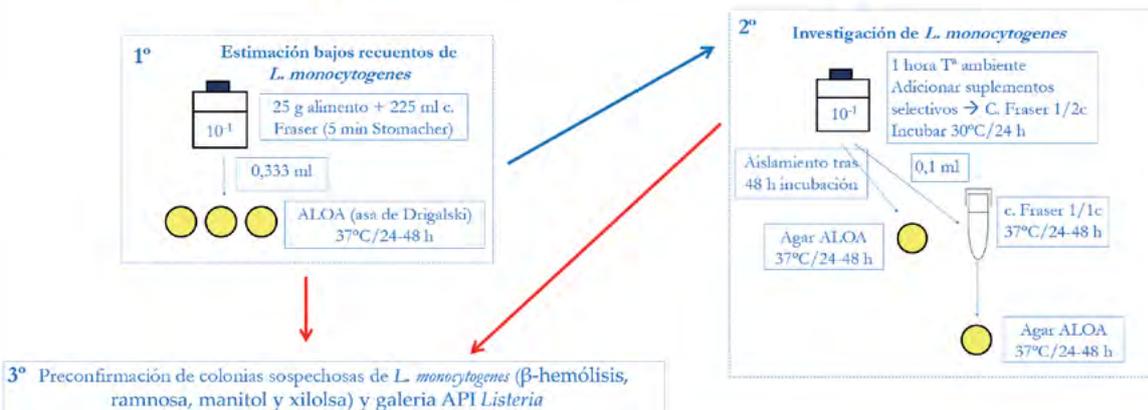


## OBJETIVOS

Detección y cuantificación de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos cocidos LPC el día de la compra y a mitad y final del periodo de duración mínima almacenados a 4° y 10°C.

## MATERIAL Y MÉTODOS

| Tipo producto  | Nº        |
|--|-----------|
| Paleta/Jamón cerdo   | 20        |
| Chòped   | 3         |
| Mortadela  | 4         |
| Jamón pavo   | 11        |
| Salchichas   | 6         |
| Otros (bull blanco, lomo sajonia, lacóu, cabeza jabalí, galantina, pate) | 7         |
| <b>Total</b>   | <b>51</b> |



- Análisis por alimento:**
- Día de la compra
  - Mitad de periodo de duración mínima (4° y 10°C)
  - Final de periodo de duración mínima (4° y 10°C)

## RESULTADOS

### Recuento de *L. monocytogenes*

| Tipo de alimento           | MPDM                |                     | FPDM                |                     |
|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                            | 4°C                 | 10°C                | 4°C                 | 10°C                |
| Finas lonchas cabeza cerdo | 2,9x10 <sup>2</sup> | 3,3x10 <sup>2</sup> | 1,0x10 <sup>2</sup> | 7,0x10 <sup>2</sup> |
| Jamón cocido extra I       | < 10                | < 10                | < 10                | 5,9x10 <sup>2</sup> |
| Jamón cocido extra II      | < 10                | 1,0x10 <sup>2</sup> | < 10                | 1,0x10              |

MPDM: mitad periodo de duración mínima.  
 FPDM: final periodo de duración mínima.

### Investigación de *Listeria* spp.

| Tipo de producto (nº muestras) | Día 0  | MPDM        |             | FPDM        |             |
|--------------------------------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                                |        | 4°C         | 10°C        | 4°C         | 10°C        |
| Paleta/Jamón cocido            | 10 (5) | 10 (15)     | 20 (10)     | 10 (15)     | 20 (20)     |
| Chòped                         | 0 (0)  | 0 (33,3)    | 0 (33,3)    | 0 (33,3)    | 0 (33,3)    |
| Mortadela                      | 0 (0)  | 0 (0)       | 0 (0)       | 0 (0)       | 0 (0)       |
| Pavo                           | 0 (0)  | 0 (18,2)    | 9,1 (0)     | 9,1 (0)     | 0 (0)       |
| Salchichas                     | 0 (0)  | 0 (16,7)    | 0 (0)       | 0 (33,3)    | 0 (16,7)    |
| Otros                          | 0 (0)  | 28,6 (28,6) | 28,6 (28,6) | 14,3 (14,3) | 14,3 (42,9) |

% muestra positivas a la presencia de *L. monocytogenes*/25 g y (*L. innocua*/25 g)

## CONCLUSIONES

Se ha obtenido recuento de *L. monocytogenes* en 7 análisis (2,7%), 3 a mitad y 4 al final del periodo de duración mínima, superando en 4 de ellos el límite de 100 ufc/g. Sólo en el día de la compra se detecta *L. monocytogenes* en el 10% de las muestras de jamón/paleta de cerdo, este porcentaje se mantendrá durante el periodo de duración mínima a 4°C y se duplicará a la temperatura de 10°C. La especie *L. innocua* sigue una tendencia parecida. En otros productos se comprueba la bacteria patógena en porcentajes del 29% a 4°C y 10°C en mitad del periodo de duración mínima, reduciéndose un 50% al final del periodo a ambas temperaturas. En las muestras de pavo loncheado la presentación de *L. monocytogenes* en 25 g fue irregular, no superando el 9%.



**Introducción**

La identificación del origen de los brotes alimentarios de *Listeria monocytogenes* es de vital importancia, dado la severidad de las infecciones y las trágicas consecuencias que pueden derivarse. Por su naturaleza clonal, para poder discriminar de forma precisa entre las diferentes cepas de *L. monocytogenes* se necesitan métodos de genotipado de alto poder discriminatorio. El método actual de referencia para el genotipado de *L. monocytogenes* es la electroforesis en campo pulsante (PFGE) que aunque presenta un alto poder de discriminación es una técnica muy laboriosa y algo subjetiva. Una prometedora alternativa al PFGE, de elevado poder discriminatorio, rápida, reproducible y de costo asequible es el MLVA (*multiple locus variable-number tandem-repeat analysis*). Los VNTRs son segmentos cortos de ADN que tienen un número hipervariable de copias, debido probablemente a un desemparejamiento por deslizamiento de cadenas (*slipped-strand mispairing*) que puede darse durante la replicación del ADN o a un posible mecanismo de recombinación. La diferencia en el número de copias en *loci* específicos puede utilizarse para determinar el grado de parentesco de las diferentes cepas.

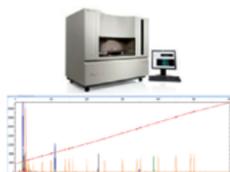
**Objetivos**

1. Estudio de la viabilidad de un sistema de electroforesis capilar (QIAxcel Advanced System, QIAGEN) como alternativa a los secuenciadores para el genotipado por MLVA de *L. monocytogenes*
2. Tipificar diversas cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de productos y/o equipamiento de fábrica de diferentes industrias cárnicas mediante MLVA.

**Metodología**

- 66 aislados de *Listeria monocytogenes* de productos cárnicos listos para el consumo (LPC, N=36) y de equipamiento de fábricas (N=28) de 13 empresas españolas
- Método de MLVA desarrollado por Sperry *et al.* (2008) que analiza 8 VNTR *loci*: Lm-2, Lm-3, Lm-8, Lm-10, Lm-11, Lm-15, Lm-23 y Lm-32. Se utilizaron 2 estrategias diferentes:
  - 2 Sistemas PCR-multiplex utilizando cebadores marcados por fluorescencia y análisis de los fragmentos mediante ABI3037xl DNA analyzer (Applied Biosystems)
  - 3 sistemas PCR-multiplex utilizando cebadores sin marcar y análisis de los fragmentos mediante QIAxcel Advanced System (QIAGEN).

| PCR-multiplex | Locus VNTR | Fuoróforo |
|---------------|------------|-----------|
| R1            | Lm-2       | VIC       |
|               | Lm-8       | NED       |
|               | Lm-10      | 6-FAM     |
|               | Lm-11      | 6-FAM     |
| R2            | Lm-3       | VIC       |
|               | Lm-15      | 6-FAM     |
|               | Lm-23      | NED       |
|               | Lm-32      | 6-FAM     |



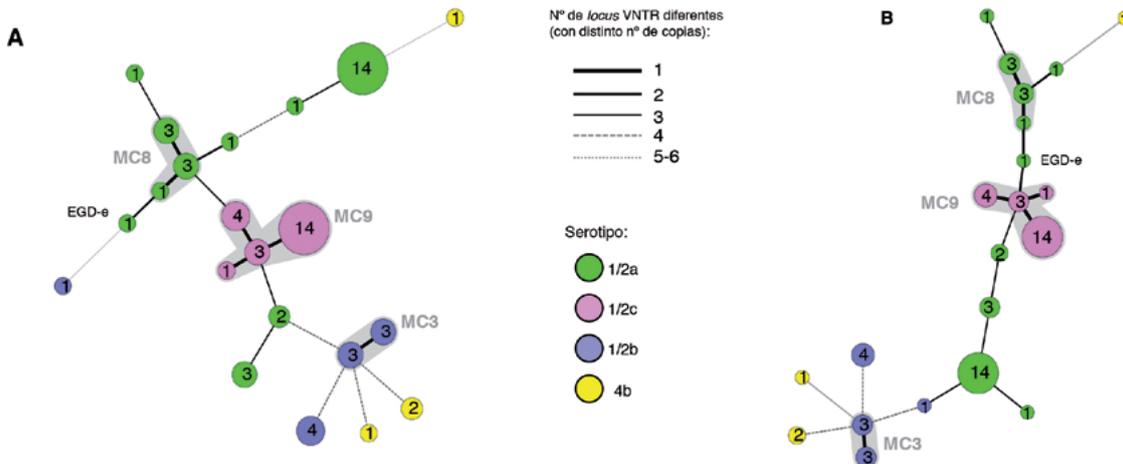
| PCR-multiplex | Locus VNTR |
|---------------|------------|
| PCR1          | Lm-2       |
|               | Lm-23      |
| PCR2          | Lm-3       |
|               | Lm-15      |
| PCR3          | Lm-8       |
|               | Lm-10      |
|               | Lm-11      |



- El cálculo del número de copias y el análisis filogenético de las cepas se realizó con el software Bionumerics v6.6 (Applied Maths).

**Resultados y Conclusiones**

Árbol de expansión mínima (*Minimum spanning tree*) de los 66 aislados de *L. monocytogenes* de industrias cárnicas y la cepa control EGD-e tipificados mediante MLVA utilizando el secuenciador ABI3037xl (Figura A) y el QIAxcel (Figura B) para el análisis de los fragmentos. Cada círculo representa un tipo MLVA diferente, y el tamaño de los mismos se relaciona con el nº de aislados de cada tipo (indicado en el interior del círculo). Las diferentes líneas de conexión indican el nº de *loci* VNTR diferentes que presentan los tipos MLVA conectados. Las sombras grises que engloban diferentes tipos MLVA indican que dichos genotipos pertenecen a un mismo complejo MLVA (tipos MLVA que sólo difieren en 1 *locus* VNTR). Los tres complejos MLVA obtenidos han sido designados como MC3, MC8 y MC9.



- El QIAxcel consiguió el mismo poder de discriminación que el secuenciador (Índice de Simpson: 90,32% en ambos casos) si bien el nº de copias obtenidos difirieron en algunos *loci* VNTR (Lm-2, Lm-15 y Lm-23) dependiendo de la técnica utilizada para el análisis de los fragmentos. La principal ventaja del QIAxcel radica en que permite realizar el análisis de forma más económica, aunque para la comparación interlaboratorio es preferible utilizar un secuenciador.
- La técnica de MLVA es un método ágil, sencillo y de coste relativamente bajo que permite el genotipado de *L. monocytogenes* con un elevado poder discriminatorio. Los aislados pueden caracterizarse en unidades discretas y de forma inequívoca por lo que representa una prometedora herramienta para la tipificación y control epidemiológico de *L. monocytogenes*.

**Referencias**

Volpe Sperry, K.E., Kathariou, S., Edwards, J.S., Wolf, L.A. 2008. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis as a tool for subtyping *Listeria monocytogenes* strains. J Clin Microbiol 46, 1435-1450.

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE VETERINARIA  
Higiene y Seguridad Alimentaria  
Avda. de la Universidad s/n  
10071-Cáceres

**DETRAPAT: Incidencia, prevalencia y detección de patógenos por técnicas rápidas en la industria cárnica y productos cárnicos RTE.**  
**Acción 4. Desarrollo de métodos de PCR convencional y en tiempo real para detectar *E. coli* O157:H7 y microorganismos toxigénicos en productos cárnicos.**



**DESARROLLO DE UN MÉTODO DE PCR EN TIEMPO REAL CON UN CONTROL INTERNO DE AMPLIFICACIÓN COMPETITIVO PARA CUANTIFICAR MOHOS PRODUCTORES DE OCRATOXINA A EN PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS**

Alicia Rodríguez<sup>1</sup>, Mar Rodríguez<sup>1</sup>, María G. Córdoba<sup>2</sup>, Tania Toscani<sup>3</sup>, Alberto Martín<sup>2</sup>, Victoria Bernaldez<sup>1</sup>, Juan J. Córdoba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Higiene y Seguridad Alimentaria. Facultad de Veterinaria. Cáceres; <sup>2</sup>Nutrición y Bromatología. Escuela de Ingeniería Agrarias. Badajoz; <sup>3</sup>Stazione sperimentale per l'industria delle conserve alimentari (Parma, Italia).

**INTRODUCCIÓN**

Durante el proceso de elaboración de los productos cárnicos madurados, las condiciones ecológicas que se alcanzan favorecen el desarrollo de una abundante población de mohos dentro de la cual pueden encontrarse algunas cepas productoras de micotoxinas. En los productos cárnicos madurados se han aislado con frecuencia mohos productores de ocratoxina A (OTA), micotoxina clasificada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer en el grupo 2B como sustancia potencialmente carcinogénica para el ser humano. Para prevenir la producción de esta micotoxina durante la maduración de los productos cárnicos madurados sería crucial la detección temprana de mohos ocratoxigénicos antes de la producción de la toxina. En trabajos previos ha quedado demostrado la utilidad de técnicas rápidas y sensibles como la PCR en tiempo real (qPCR) en la cuantificación de mohos productores de OTA en productos cárnicos madurados [1,2]. No obstante, los procedimientos desarrollados pueden ser optimizados mediante la introducción de un control interno de amplificación (IAC) que eviten falsos negativos, mejorando de esta forma la sensibilidad en la detección.

**OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo ha sido diseñar un protocolo de qPCR con un IAC para la cuantificación de mohos productores de OTA en productos cárnicos madurados.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

1. Diseño de dos cebadores (Fnpstr/Rnpstr) y una sonda (NPSprobe) a partir del gen *OTAnpsPN* [1].
2. Diseño del IAC competitivo siguiendo el procedimiento previamente descrito por Rodríguez y col. [2](Figura 1).
3. Optimización de las condiciones de la qPCR.
4. Estudios de especificidad y sensibilidad (relacionando el número de copias del gen frente a los valores de Ct) del método desarrollado.
5. Estudio de sensibilidad y cuantificación en productos cárnicos inoculados con esporas de mohos productores de OTA.

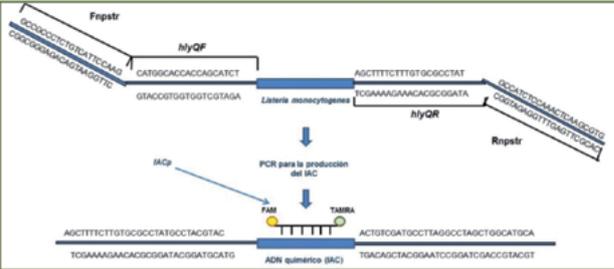


Figura 1. Ilustración del diseño de un IAC competitivo del método de qPCR desarrollado para cuantificar mohos productores de ocratoxina A en productos cárnicos madurados.

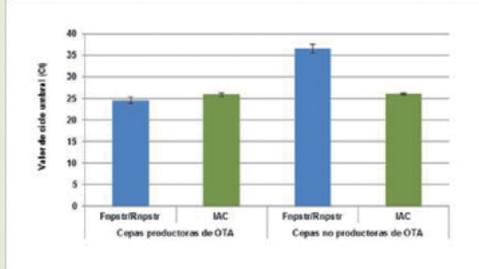


Figura 2. Valores medios de ciclo umbral obtenidos en el ensayo de especificidad del método de qPCR desarrollado por parte de las cepas de mohos de referencia productoras y no productoras de ocratoxina A.

| Categoría                   | Método        | Valor de ciclo umbral (Ct) medio |
|-----------------------------|---------------|----------------------------------|
| Cepas productoras de OTA    | Fnpstr/Rnpstr | ~25                              |
|                             | IAC           | ~26                              |
| Cepas no productoras de OTA | Fnpstr/Rnpstr | ~38                              |
|                             | IAC           | ~26                              |

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El método de qPCR desarrollado mostró una gran especificidad, ya que sólo las cepas productoras de OTA se amplificaron con los cebadores y sondas diseñadas para detectar el gen *OTAnpsPN*. Sin embargo, se observó amplificación del IAC en todas las cepas ensayadas (productoras y no productoras) (Figura 2). Las eficiencias de las curvas estándar que relacionaban el número de copias del gen *otanpsPN* y los valores de Ct oscilaron en todos los casos entre 80-110%. Además, su aplicación en productos cárnicos madurados fue óptima, con eficiencias dentro del anterior rango y con límites de detección entre 1-2 log ufc/g.

**CONCLUSIONES**

El método de qPCR diseñado puede ser considerado como una herramienta útil para la cuantificación de mohos productores de OTA en productos cárnicos madurados debido a su alta sensibilidad y especificidad. Su utilización combinada con la aplicación de medidas preventivas puede ser de gran utilidad para evitar la presencia de mohos productores de OTA en las industrias cárnicas y, consecuentemente, la acumulación de esta micotoxina en los productos que se están elaborando.

**BIBLIOGRAFÍA**

[1] Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.L., Justensen, A.F., & Córdoba, J.J. (2011). Int. J. Food Microbiol., 149, 226-235.  
 [2] Rodríguez, A., Werning, M.L., Rodríguez, M., Bermúdez, E., & Córdoba, J.J. (2012). Food Microbiol., 32, 397-405.

Monells, 9-10 de Septiembre de 2013



FACULTAD DE VETERINARIA

Higiene y Seguridad Alimentaria

Avda. de la Universidad s/n  
10003-Cáceres

## SUBPROYECTO 2 (DETRAPAT)

**Incidencia, prevalencia y detección de patógenos por técnicas rápidas en la industria cárnica y productos cárnicos RTE.**

**Acción 4. Desarrollo de métodos de PCR convencional y en tiempo real para detectar *E. coli* O157:H7 y microorganismos toxigénicos en productos cárnicos.**

Rubén Gordillo, Juan José Córdoba, Miguel Ángel Asensio, Elena Bermúdez, Félix Núñez, M<sup>a</sup> Jesús Andrade y Mar Rodríguez.



## DESARROLLO DE UN MÉTODO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ESTAFILOCOCOS ENTEROTOXIGÉNICOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS RTE

**INTRODUCCIÓN:** La industria cárnica necesita disponer de herramientas sensibles y rápidas que permitan la detección de peligros microbiológicos, como los estafilococos enterotoxigénicos, y que puedan ser incluidas en los sistemas APPCC. Los métodos tradicionales de aislamiento y detección de estafilococos en medios de cultivo conllevan un excesivo tiempo de análisis, además los métodos inmunológicos solo permiten la detección de las 5 enterotoxinas clásicas (A, B, C, D y E). Actualmente se conocen más de 20 enterotoxinas, El conocimiento de genes relacionados con las síntesis de algunas enterotoxinas ha permitido el diseño de procedimientos rápidos basados en la PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de estafilococos enterotoxigénicos, si bien los métodos desarrollados detectan sólo algunas de las enterotoxinas. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, es necesario diseñar métodos que permitan detectar todos los estafilococos productores de enterotoxinas con independencia de la especie a la que pertenezcan.

**OBJETIVO:** Desarrollar un método de qPCR basado en la metodología SYBR Green para la cuantificación de estafilococos productores de enterotoxinas en productos cárnicos RTE.

### METODOLOGÍA:

1. Inoculación de productos cárnicos con *S. aureus* en un rango de  $\sim 10^6$  ufc/g a 1 ufc/g
2. Enriquecimiento a 30°C durante 4, 6 y 8 h en Caldo con Sal y Manitol
3. Extracción ADN con kit *MasterPure DNA Purification* con algunas modificaciones
4. qPCR con los cebadores y las condiciones optimizadas (tabla 1)

Tabla 1. Condiciones de temperatura y tiempo de las reacciones de qPCR, basados en metodología SYBR Green, concentraciones de los cebadores y valores de las curvas de disociación (Tm)

| Concentraciones de cebadores ( $\mu$ M) | Tm (°C) | Condiciones de la reacción   |
|---|---------|--|
| SaU: 0,2                                | 76,8 y  | 95°C/8 min   |
| SeUni-r: 1,5                            | 78,6    | 50 ciclos: 95°C/10 s, 53°C/10 s, 72°C/25 s<br>Curva de disociación: 95°C/15 s, 60°C/1 min, 95°C/15 s |

Tabla 2. Límites de detección de la qPCR con *S. aureus* inoculado en diferentes productos cárnicos después de 4, 6 y 8 h de enriquecimiento a 30°C. Los datos están expresados en log ufc/g (el experimento se realizó por triplicado).

| Productos cárnicos RTE | Límite de detección (log ufc/g $\pm$ DS) |                |                | Eficiencia de la qPCR (% $\pm$ DS) |
|------------------------|--|----------------|----------------|------------------------------------|
|                        | 4 h                                      | 6 h            | 8 h            |                                    |
| Jamón curado           | 4,6 $\pm$ 0,05                           | 2,6 $\pm$ 0,05 | 1,6 $\pm$ 0,05 | 104,8 $\pm$ 3,10                   |
| Lomo curado            | 2,5 $\pm$ 0,25                           | 1,5 $\pm$ 0,25 | 0,5 $\pm$ 0,25 | 100,5 $\pm$ 1,57                   |
| Salchichón             | 2,4 $\pm$ 0,22                           | 1,4 $\pm$ 0,22 | 0,4 $\pm$ 0,22 | 92,2 $\pm$ 0,88                    |
| Chorizo                | 2,2 $\pm$ 0,4                            | 1,2 $\pm$ 0,4  | 0,2 $\pm$ 0,4  | 102,4 $\pm$ 2,38                   |
| Jamón cocido           | 2,3 $\pm$ 0,14                           | 1,3 $\pm$ 0,14 | 0,3 $\pm$ 0,14 | 101,3 $\pm$ 0,70                   |
| Mortadela              | 2,5 $\pm$ 0,25                           | 1,5 $\pm$ 0,25 | 0,5 $\pm$ 0,25 | 93,9 $\pm$ 1,73                    |

### CONCLUSIONES:

El método de qPCR desarrollado presenta una gran especificidad y sensibilidad y podría ser de gran utilidad en la cuantificación de este microorganismo en productos cárnicos RTE, por lo que podría utilizarse como herramienta en la verificación de los sistemas de control de seguridad alimentaria y en el APPCC.

### RESULTADOS:

El método de qPCR desarrollado mostró una gran sensibilidad, ya que en la mayoría de los alimentos se detectaron entre 2-4 log ufc/g con solo 4 h de enriquecimiento a 30°C, aunque se estableció como tiempo de incubación óptimo para la aplicación de esta metodología en todos los tipos de productos cárnicos el tiempo de 8 h de enriquecimiento, puesto que con este tiempo se consiguieron los límites de detección de *S. aureus* más bajos para todos los tipos de alimentos inoculados (Tabla 2). La solidez y robustez del método se confirmó con la realización de las curvas estándar para cada una de las matrices alimentarias, obteniéndose valores adecuados de eficiencias y de coeficientes de correlación ( $R^2$ ) (Tabla 2) estando todos ellos dentro de los óptimos establecidos.



Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos  
Universidad Zaragoza

## Validación de una técnica de PCR a tiempo real para la detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos listos para el consumo (LPC)



VI Reunión Plenaria del Proyecto Consolider-Carnisenusa  
Monells, 9 y 10 septiembre 2013

Gómez D., Ariño A., Carramiñana J.J., Rota C. y Yangüela J.  
Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad Veterinaria.  
Universidad Zaragoza. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza  
e-mail: jyangu@unizar.es

### 1. Objetivo

Detectar *Listeria monocytogenes* mediante PCR a tiempo real en muestras de productos cárnicos listos para el consumo (LPC) contaminados artificialmente y enriquecidos a 37°C durante 24 h

### 2. Extracción de ADN

Kit Dneasy Blood and Tissue (Qiagen)

### 3. Secuencia de primers (Traunsek y col., 2011)

| Oligonucleot.  | Secuencia                            | Amplión |
|----------------|--------------------------------------|---------|
| Forward primer | AAGAAGTNATTAGTTTTAAACAAATTTACTATAACG | 100 bp  |
| Reverse primer | AACTGCTCTTAGTNACAGCTTGC              |         |

### 4. PCR tiempo real y parámetros de termociclado

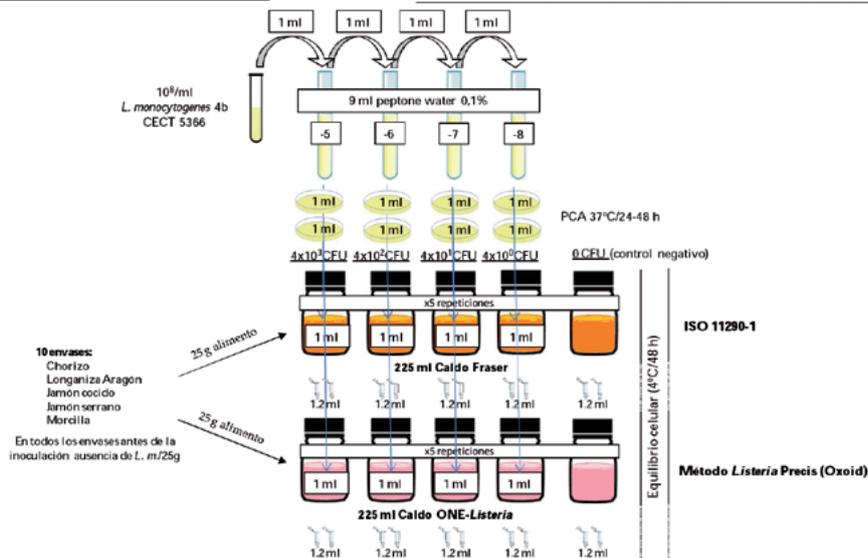
Amplificación del gen *hlyA* utilizando SYBR Green I en el termociclador Mini Opticon MJ Mini (BIORAD)

El volumen final de reacción es de 25 µl. Los parámetros de ciclado son 10 min a 95°C, 45 ciclos de 15s a 95°C y 1 min a 60°C. En todos los ensayos se realizaron dos repeticiones por duplicado

### 5. Cepas bacterianas (Especificidad)

| Microorganismo   | Número cepas | Resultado PCR tiempo real |
|--|--------------|---------------------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i>  | 19           | +                         |
| <i>Listeria innocua</i>  | 10           | -                         |
| <i>Listeria grayi</i>  | 2            | -                         |
| <i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>                              | 1            | -                         |
| <i>Listeria seeligeri</i>  | 1            | -                         |
| <i>Listeria welshimeri</i>   | 1            | -                         |
| <i>Listeria marthii</i>  | 1            | -                         |
| <i>Listeria rocourtia</i>  | 1            | -                         |
| <i>Brochothrix thermosphacta</i>   | 1            | -                         |
| <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>                               | 1            | -                         |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>                    | 1            | -                         |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>                         | 1            | -                         |
| <i>Bacillus cereus</i>   | 1            | -                         |
| <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>                             | 1            | -                         |
| <i>Citrobacter freundii</i>  | 1            | -                         |
| <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>                            | 1            | -                         |
| <i>Escherichia coli</i>  | 1            | -                         |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>                        | 1            | -                         |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> | 1            | -                         |
| <i>Shigella sonnei</i>   | 1            | -                         |
| <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>                            | 1            | -                         |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>  | 1            | -                         |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>  | 1            | -                         |
| <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>                   | 1            | -                         |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>                               | 1            | -                         |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>                      | 1            | -                         |
| <b>TOTAL</b>   | <b>54</b>    |                           |

### 6. Sensibilidad (Material y métodos y resultados)



| ISO             | Chorizo |        |      | Longaniza |        |      | Jamón serrano |        |      | Jamón cocido |        |      | Morcilla |        |      |
|-----------------|---------|--------|------|-----------|--------|------|---------------|--------|------|--------------|--------|------|----------|--------|------|
|                 | Precis  | Precis | qPCR | ISO       | Precis | qPCR | ISO           | Precis | qPCR | ISO          | Precis | qPCR | ISO      | Precis | qPCR |
| 10 <sup>3</sup> | 5+      | 5+     | 2+   | 5+        | 5+     | 2+   | 5+            | 5+     | 2+   | 5+           | 5+     | 2+   | 5+       | 5+     | 2+   |
| 10 <sup>2</sup> | 5+      | 5+     | 2+   | 5+        | 5+     | 2+   | 5+            | 5+     | 2+   | 5+           | 5+     | 2+   | 5+       | 5+     | 2+   |
| 10              | 5+      | 5+     | 2+   | 5+        | 5+     | 2+   | 5+            | 5+     | 2+   | 5+           | 5+     | 2+   | 5+       | 5+     | 2+   |
| 1               | 5+      | 5+     | 2+   | 5+        | 5+     | 2+   | 5+            | 5+     | 2+   | 5+           | 5+     | 2+   | 5+       | 5+     | 2+   |
| 0               | 5-      | 5-     | 2-   | 5-        | 5-     | 2-   | 5-            | 5-     | 2-   | 5-           | 5-     | 2-   | 5-       | 5-     | 2-   |



## Detección rápida de *Listeria monocytogenes* en muestras de jamón curado y longaniza de Aragón LPC combinando el cultivo de enriquecimiento y la PCR a tiempo real



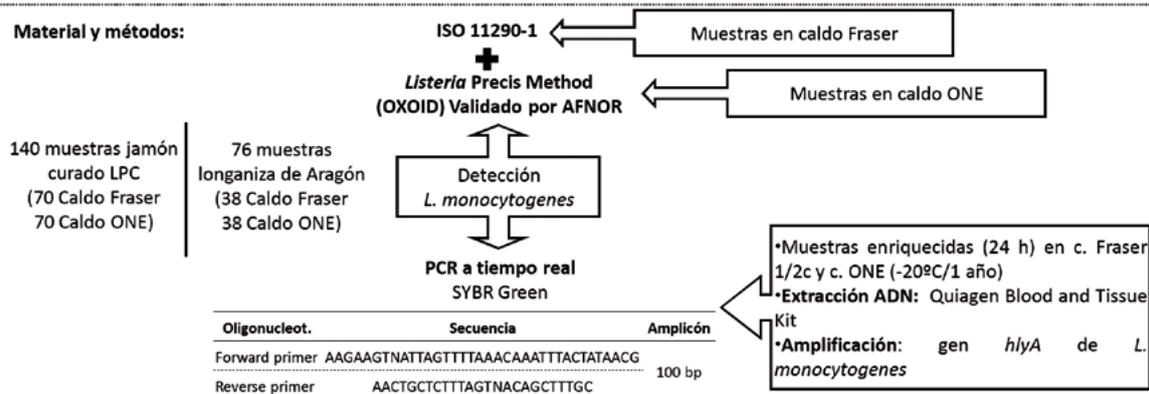
VI Reunión Plenaria del Proyecto Consolider-Carnisenusa  
Monells, 9 y 10 septiembre 2013

Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C. y Yangüela, J.  
Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos.  
Facultad Veterinaria. Universidad Zaragoza.  
Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza  
E-mail: jyangu@unizar.es

**Objetivo:**

Reducir el tiempo necesario para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras pre-enriquecidas de jamón curado fileteado y longaniza de Aragón LPC utilizando técnicas moleculares y comparar estos resultados con la microbiología convencional.

**Material y métodos:**



**Resultados:**

**Jamón curado**

**Muestras caldo Fraser**

|  |   |   |
|--|---|---|
| Muestras<br><b>70</b>                          | Positivos método referencia (R+)<br><b>1</b>    | Negativos método referencia (R-)<br><b>69</b>     |
| Positivos método alternativo (A+)<br><b>3</b>  | Coincidencia positivos (R+/A+) (PA)<br><b>0</b> | Desviación positiva (R-/A+) (PD)<br><b>3</b>      |
| Negativos método alternativo (A-)<br><b>67</b> | Desviación negativa (R+/A-) (ND)<br><b>1</b>    | Coincidencias negativas (R-/A-) (NA)<br><b>66</b> |

Eficacia relativa = **94,3%**  
Especificidad relativa = **95,7%**  
Sensibilidad relativa = **0,0%**

**Muestras caldo ONE**

|  |   |   |
|--|---|---|
| Muestras<br><b>70</b>                          | Positivos método referencia (R+)<br><b>2</b>    | Negativos método referencia (R-)<br><b>68</b>     |
| Positivos método alternativo (A+)<br><b>3</b>  | Coincidencia positivos (R+/A+) (PA)<br><b>2</b> | Desviación positiva (R-/A+) (PD)<br><b>1</b>      |
| Negativos método alternativo (A-)<br><b>67</b> | Desviación negativa (R+/A-) (ND)<br><b>0</b>    | Coincidencias negativas (R-/A-) (NA)<br><b>67</b> |

Eficacia relativa = **98,6%**  
Especificidad relativa = **98,7%**  
Sensibilidad relativa = **100,0%**

**Longaniza de Aragón**

**Muestras caldo Fraser**

|  |   |   |
|--|---|---|
| Muestras<br><b>38</b>                          | Positivos método referencia (R+)<br><b>9</b>    | Negativos método referencia (R-)<br><b>29</b>     |
| Positivos método alternativo (A+)<br><b>14</b> | Coincidencia positivos (R+/A+) (PA)<br><b>5</b> | Desviación positiva (R-/A+) (PD)<br><b>9</b>      |
| Negativos método alternativo (A-)<br><b>24</b> | Desviación negativa (R+/A-) (ND)<br><b>4</b>    | Coincidencias negativas (R-/A-) (NA)<br><b>20</b> |

Eficacia relativa = **65,8%**  
Especificidad relativa = **69,0%**  
Sensibilidad relativa = **55,6%**

**Muestras caldo ONE**

|  |  |   |
|--|--|---|
| Muestras<br><b>38</b>                          | Positivos método referencia (R+)<br><b>11</b>    | Negativos método referencia (R-)<br><b>27</b>     |
| Positivos método alternativo (A+)<br><b>18</b> | Coincidencia positivos (R+/A+) (PA)<br><b>10</b> | Desviación positiva (R-/A+) (PD)<br><b>8</b>      |
| Negativos método alternativo (A-)<br><b>20</b> | Desviación negativa (R+/A-) (ND)<br><b>1</b>     | Coincidencias negativas (R-/A-) (NA)<br><b>19</b> |

Eficacia relativa = **76,3%**  
Especificidad relativa = **70,4%**  
Sensibilidad relativa = **90,9%**

**Conclusiones:** Comparando la microbiología tradicional (ISO 11290-1 y *Listeria Precis Method*) con el método alternativo (PCR a tiempo real) se observa que las muestra pre-enriquecidas con ambos medios de cultivo presentan buena eficacia y especificidad relativas, siendo, además, la sensibilidad relativa del 100% en las muestras enriquecidas en caldo ONE. Sin embargo, hay que señalar que la sensibilidad relativa de las muestras enriquecidas en caldo Fraser ha sido 0%, debido a que no se ha obtenido ninguna muestra positiva coincidente con ambos métodos.

**Conclusiones:** Comparando la microbiología tradicional (ISO 11290-1 y *Listeria Precis Method*) con el método alternativo (PCR a tiempo real) se observa que las muestra pre-enriquecidas con caldo Fraser presentan unos porcentajes bajos de los tres parámetros de validación (<70%), siendo algo mayores la eficacia y especificidad relativas (>70%) de las muestras enriquecidas en caldo ONE y por encima del 90% la sensibilidad relativa.

## Detección rápida de *Listeria monocytogenes* en superficies en contacto directo con los alimentos combinando el cultivo de enriquecimiento y la PCR a tiempo real

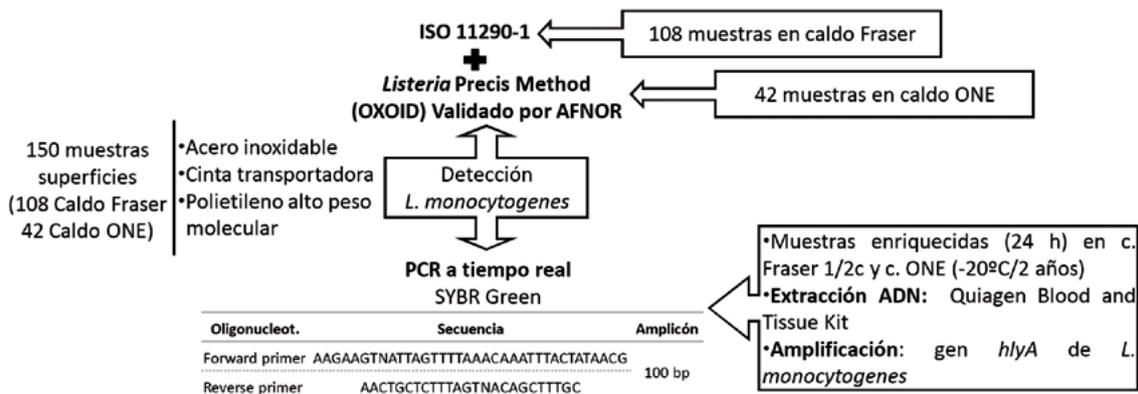
VI Reunión Plenaria del Proyecto  
Consolider-Carnisenusa  
Monells, 9 y 10 septiembre 2013

Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C. y Yangüela, J.  
Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos.  
Facultad Veterinaria. Universidad Zaragoza.  
Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza  
E-mail: jyangu@unizar.es

### Objetivo:

Reducir el tiempo necesario para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras pre-enriquecidas de superficies en contacto con los alimentos utilizando técnicas moleculares y comparar estos resultados con la microbiología convencional.

### Material y métodos:



### Resultados:

**Eficacia relativa (AC):** el grado de correspondencia entre la respuesta obtenida con el método de referencia y la obtenida con el método alternativo en muestras idénticas.  
 $AC = [(PA + NA) / N] \times 100$

**Especificidad relativa (SP):** Habilidad del método alternativo de no detectar *L. monocytogenes* cuando no es detectado por el método de referencia.  
 $SP = (NA / N_-) \times 100$

**Sensibilidad relativa (SE):** Habilidad del método alternativo de detectar *L. monocytogenes* cuando es detectada por el método de referencia.  
 $SE = (PA / N_+) \times 100$

Donde:

$N$  es el número total de muestras ( $NA + PA + PD + ND$ )

$N_-$  es el número total de resultados negativos con el método de referencia ( $NA + PD$ )

$N_+$  es el número total de resultados positivos con el método de referencia ( $PA + ND$ )

### Muestras caldo Fraser

| Muestras                          | Positivos método referencia (R+)    | Negativos método referencia (R-)     |
|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 108                               | 38                                  | 70                                   |
| Positivos método alternativo (A+) | Coincidencia positivos (R+/A+) (PA) | Desviación positiva (R-/A+) (PD)     |
| 53                                | 34                                  | 19                                   |
| Negativos método alternativo (A-) | Desviación negativa (R+/A-) (ND)    | Coincidencias negativas (R-/A-) (NA) |
| 55                                | 4                                   | 51                                   |

Eficacia relativa = 78,7%

Especificidad relativa = 72,9%

Sensibilidad relativa = 89,5%

### Muestras caldo ONE

| Muestras                          | Positivos método referencia (R+)    | Negativos método referencia (R-)     |
|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 42                                | 13                                  | 29                                   |
| Positivos método alternativo (A+) | Coincidencia positivos (R+/A+) (PA) | Desviación positiva (R-/A+) (PD)     |
| 23                                | 11                                  | 12                                   |
| Negativos método alternativo (A-) | Desviación negativa (R+/A-) (ND)    | Coincidencias negativas (R-/A-) (NA) |
| 19                                | 2                                   | 17                                   |

Eficacia relativa = 66,7%

Especificidad relativa = 58,6%

Sensibilidad relativa = 84,6%

**Conclusiones:** Comparando la microbiología tradicional (ISO 11290-1 y *Listeria Precip Method*) con el método alternativo (PCR a tiempo real) se observa que las muestra pre-enriquecidas con ambos medios de cultivo presentan buena sensibilidad relativa, siendo bajos los otros dos índices. Hay que destacar que se han detectado más positivos con PCR a tiempo real que con la microbiología convencional, presentando en ambos pre-enriquecimientos una baja desviación negativa.



**NUEVA ESTRATEGIA PARA LA REDUCCION DE GRASA Y MEJORA DEL CONTENIDO DE ACIDOS GRASOS EN SALCHICHAS FRESCAS DEL NORTE DE ÁFRICA (MERGUEZ)**



FUNCIOCA  
CSD2007-00016  
Valencia 2012

**Triki M., Herrero A. M., Jiménez-Colmenero F. and Ruiz-Capillas C.**

Departamento de Productos, Laboratorio de Carne y Productos Cárnicos, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), C/ José Antonio Novais 10, 28040 Madrid (Spain) e-mail:claudia@ictan.csic.es

**INTRODUCCION:**

La reformulación de productos cárnicos con un perfil lipídico mas saludables es un objetivo muy importante en todas las sociedades, incluidas las de los países del Magreb (Norte de Africa). Gel konjac (K) y su combinación con aceite de oliva (KO) podría emplearse como estrategia tecnológica para reemplazar grasa animal con el fin de reducir y/o mejorar su contenido lipídico en productos cárnicos.

**OBJECTIVO:**

El objetivo de este estudio es desarrollar salchichas frescas típicas del norte de África (Merguez) con un contenido lipídico mas saludable utilizando K y KO (con aceite de oliva) como sustitutos de grasa de vacuno.



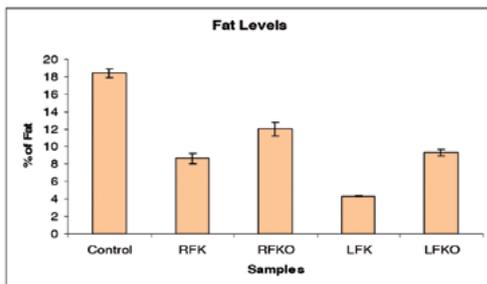
**Figura 1:** Salchicha fresca del Norte de Africa (Merguez). Control; RFK reducido contenido en grasa con gel de konjac.; RFKO, reducido contenido en grasa con konjac/aceite de oliva; LFK, bajo contenido en grasa con gel de konjac. LFKO bajo contenido en grasa con konjac/aceite de oliva.

**MATERIALES Y METODOS**

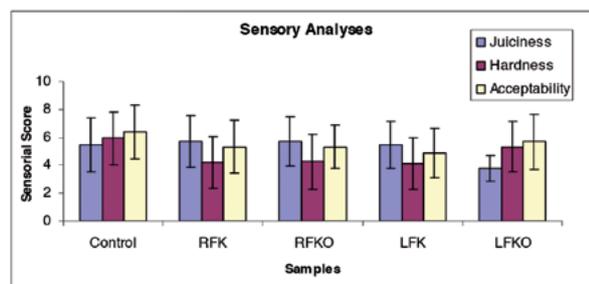
A partir de una formulación de merguez tradicional se han reformulado varios productos ensayando distintos niveles de grasa empleando como sustitutos de la grasa de vacuno gel de konjac (K) y el konjac con aceite (KO). Cinco formulaciones fueron preparadas: un producto control con grasa animal, uno con niveles de grasa reducidos (RFK) y uno con niveles bajos de grasa (LFK) sustituyendo la grasa animal con distintas cantidades de gel de konjac. Además, se reformularon dos productos similares a estos con reducido y bajo nivel de grasa, sustituyendo la grasa animal por KO (Figura 1). Se estudió la composición de los productos además de sus características tecnológicas y sensoriales.

**RESULTADOS**

Se apreció una reducción de grasa entre un 53 y un 76% en las formulaciones RFK y LFK respectivamente. En las muestras que contenían konjac con aceite la reducción de grasa fue menor un 34 y 49% en RFKO y LFKO respectivamente (Figura 2). Los resultados del análisis sensorial mostraron que todos los productos eran aceptados por los catadores (Figura 3).



**Figura 2:** Niveles de grasa en salchichas frescas del norte de Africa (Merguez):Control; RFK reducido contenido en grasa con gel de konjac.; RFKO, reducido contenido en grasa con konjac/aceite de oliva; LFK, bajo contenido en grasa con gel de konjac. LFKO bajo contenido en grasa con konjac/aceite de oliva.



**Figura 3:** Análisis Sensorial en salchichas frescas del norte de Africa (Merguez): Control; RFK reducido contenido en grasa con gel de konjac.; RFKO, reducido contenido en grasa con konjac/aceite de oliva; LFK, bajo contenido en grasa con gel de konjac. LFKO bajo contenido en grasa con konjac/aceite de oliva.

**CONCLUSION**

Se evidencia que el proceso de reformulación con gel de konjac y konjac con aceite de oliva, es viable tecnológicamente y sensorialmente, presentándose como una nueva posibilidad para la mejorar aspectos cuantitativos y cualitativos de la presencia de grasa en salchichas frescas tipo merguez. Esta es una nueva estrategia de procesado para el desarrollo de productos cárnicos potencialmente funcionales.

**AGRADECIMIENTOS:** AGL2008-04892-CO3-01, AGL2010- 19515-ALI, Consolider Ingenio 2010 (CSD2007-00016). Fellowship AECID-MAE to support to Mr. M. Triki.



## ESPECTROSCOPIA RAMAN EN EL ESTUDIO DE PROCESOS DE ESTABILIZACIÓN DE ACEITE DE OLIVA

<sup>1</sup>Herrero, A. M., <sup>2</sup>Carmona, P., <sup>1</sup>Jiménez-Colmenero, F., <sup>1</sup>Ruíz-Capillas, C.

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, (ICTAN-CSIC), c/ Jose Antonio Novais, 10, 28040 Madrid, España.

<sup>2</sup>Instituto de Estructura de la Materia (CSIC), c/ Serrano 121, 28006 Madrid, España.

### INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de productos cárnicos más saludables uno de los aspectos más relevantes se refiere a procesos de reformulación encaminados a sustituir la grasa animal por otra de origen vegetal y/o marino más acorde con las recomendaciones de salud. Con este propósito, se han empleado diversos procedimientos para incorporar aceites vegetales en productos cárnicos tales como su adición directa, incorporación micro-encapsulado, adición previa emulsificación, formando parte de ingredientes vegetales (nuez), etc. (1-5). Sin embargo, es evidente la conveniencia de estudiar nuevas alternativas capaces de ampliar estas opciones de incorporación sin menoscabo de los atributos de calidad del nuevo elaborado cárnico. En este sentido, sería interesante evaluar las posibilidades de otros procedimientos de incorporación de aceite vegetal en base a su estabilización mediante mezclas de ingredientes no proteicos (inulina, dextrina, alginato, etc.).

Una posibilidad para mejorar estos procesos de incorporación pasa por una mejor comprensión de la relación entre la estructura de sus componentes y las características tecnológicas. El empleo de la espectroscopía Raman (FT-Raman) puede ser una novedosa aproximación para entender esta interrelación. Esta técnica espectroscópica presenta distintas ventajas; se trata de un método directo, la cantidad de muestra necesaria es mínima, y permite obtener, simultáneamente, información estructural sobre los distintos componentes empleados (lípidos, polisacáridos, agua, etc.) (6).

### OBJETIVOS

Estudiar mediante FT-Raman los cambios estructurales que acontecen en el proceso de inmovilización de aceite de oliva en base a su estabilización mediante mezclas de ingredientes no proteicos (inulina, dextrina, alginato, etc.) y establecer su posible relación con las propiedades tecnológicas de las matrices formuladas. Tales conocimientos ayudarían a mejorar el empleo de estos procedimientos para reemplazar grasa animal en la elaboración de productos cárnicos más saludables.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo dos procesos de inmovilización de aceite de oliva (55%) uno empleando como sistema estabilizador una combinación de inulina y alginato (OIA) y otro una combinación de dextrina y alginato (ODA) (Fig. 1). Se realizaron análisis de textura [análisis del perfil de textura (TPA)] y de espectroscopía Raman (FT-Raman).

### RESULTADOS

El proceso de estabilización de aceite de oliva en base a la utilización de la combinación de inulina y alginato originó matrices (OIA) con mayor ( $P < 0,05$ ) dureza, masticabilidad y adhesividad (Fig. 2). El análisis de espectroscopía FT-Raman reveló diferencias en el perfil espectral de las bandas de tensión  $\nu_{CH}$  comprendidas en la región  $2800-3050\text{ cm}^{-1}$  debido al proceso de estabilización del aceite (Fig. 3). La medida del área de estas bandas mostró diferencias significativas entre el aceite de oliva aislado (O) y las matrices OIA y ODA (Fig. 3). Este comportamiento se ha atribuido a modificaciones estructurales en las cadenas hidrocarbonadas lipídicas como consecuencia de la estabilización del aceite. Estos cambios en la estructura lipídica son más significativos en el proceso de estabilización de aceite de oliva mediante combinaciones de inulina y alginato (OIA) (Fig. 3). Las diferencias en las características estructurales (Fig. 3) se pueden relacionar con los parámetros de textura de las diferentes matrices (Fig. 2).



Fig 1. Matrices de aceite de oliva estabilizado con una combinación de: inulina-alginato (OIA) y dextrina-alginato (ODA).

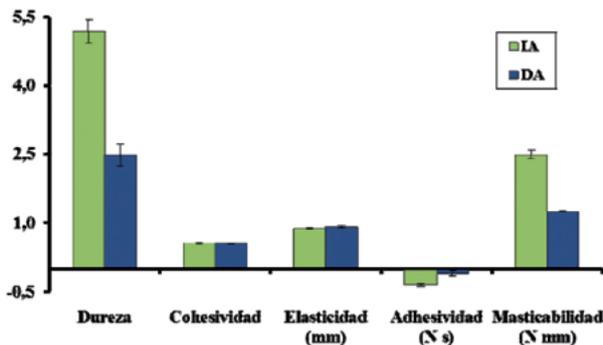


Fig 2. Parámetros del Análisis del Perfil de Textura (TPA) de las matrices de aceite de oliva estabilizadas con una combinación de inulina-alginato (OIA) y dextrina-alginato (ODA).

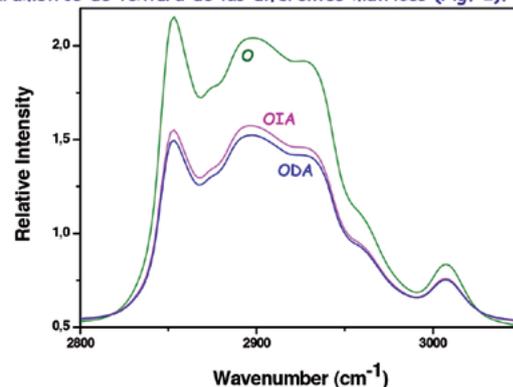


Fig 3. Espectros FT-Raman ( $2800-3050\text{ cm}^{-1}$ ) de aceite de oliva aislado (O) y de las matrices de aceite de oliva estabilizadas con una combinación de inulina-alginato (OIA) y dextrina-alginato (ODA).

### CONCLUSIONES

La estabilización de aceite de oliva mediante el empleo de ingredientes no proteicos, como inulina, dextrina y alginato, induce modificaciones estructurales en las cadenas hidrocarbonadas lipídicas. Los cambios en la estructura lipídica son de mayor relevancia cuando se emplea una combinación de inulina y alginato como sistema estabilizador. Estas características estructurales se manifiestan en unas propiedades texturales específicas.

**BIBLIOGRAFÍA:** (1). Jiménez-Colmenero F. (2007). Trends in Food Sci. Tech. 18, 567-578. (2). Jiménez-Colmenero, et al. (2010). Food Res. Int., 43, 2058-2076. (3). Herrero AM, et al. (2011). Food Hydrocolloid., 25, 12-18. (4). Cáceres E, et al. (2008). Meat Sci., 80, 183-193. (5). Valencia I, et al. (2008). Meat Sci., 80, 1046-1054. (6) Herrero AM. (2008). Food Chem. 107, 1642-1651.

Agradecimientos: AGL2010-19515-ALI, AGL2011-29644-C02-01, Consolider Ingenio 2010 (CSD2007-00016).





# Restructured meat enriched in glucomannan increases the pAMPK levels and ameliorates dyslipidemia in Fa/Fa rats



J. Benedí<sup>1</sup>, L. González-Torres<sup>2</sup>, M. Vázquez-Velasco<sup>2</sup>, S. Bastida<sup>2</sup>, F.J. Sánchez-Muniz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dep. Farmacología; <sup>2</sup>Dep. Nutrición y Bromatología I (Nutrición).  
Universidad Complutense Madrid, 28040, Spain

## Introduction

Zucker Fa/Fa rat is a commonly used model in Metabolic Syndrome (MS) studies. AMP-activated protein kinase (AMPK) has emerged as an important metabolic enzyme (Fig 1), and it has been suggested that this enzyme cascade plays a role in the regulation of a variety of metabolic processes in liver, by phosphorylating and modulating the activity of key, rate-limiting enzymes. Early studies identified AMPK as an important regulator of cholesterol synthesis and de novo lipogenesis in liver. Also, recent studies indicate that an AMPK play a role in linking MS. Glucomannan is a soluble fiber derived from *Amorphophallus konjac* and is commonly touted as an effective weight-loss supplement.

## Aim

Because glucomannan may have beneficial effects on dyslipidemia, which accelerates atherosclerosis in diabetes, we examined the effect of the consumption of a high saturated diet -containing a 15% of restructured meat enriched with glucomannan- on AMPK, Acetyl CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FAS) in the liver obese Zucker rats.

## Material and methods

24 growing Zucker Fa/Fa rats were fed with Control (C) diet (AIN-93M enriched with 15% of restructured pork), Glucomannan (G) diet (15% of glucomannan into same restructured meat) or the same diets with the addition of 2% cholesterol and 0.4% cholic acid (HC and HG diets). Cholesterolemia and triglyceridemia were measured in plasma by standard colorimetric kits. Hepatic enzymatic levels were determined by Western blot and their expression by qRT-PCR.

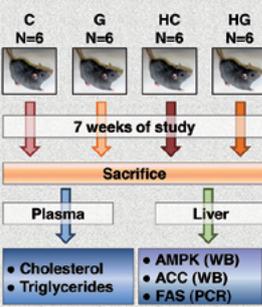
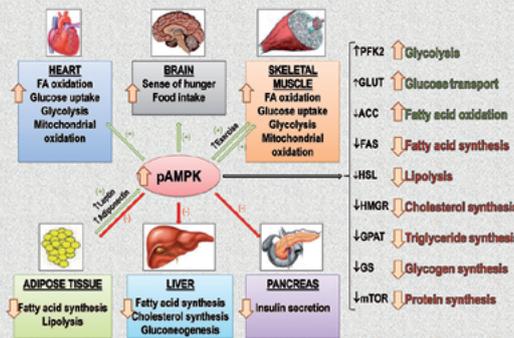
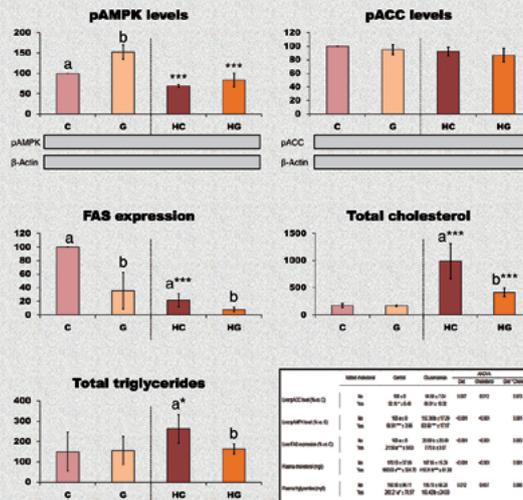


Fig 1. Summary of pAMPK effects



## Results



Hypercholesterolemic Control diet vs. Control led to severe hypercholesterolemia. This effect was reduced 50% by glucomannan addition (Hypercholesterolemic Glucomannan vs. Hypercholesterolemic Control;  $p < 0.01$ ). pAMPK was increased 52% in Glucomannan vs. Control ( $p < 0.001$ ) and 21% in Hypercholesterolemic Glucomannan vs. Hypercholesterolemic Control rats ( $p < 0.05$ ), while FAS-expression was reduced 64% ( $p < 0.05$ ). Cholesterol addition in diet reduced pAMPK (30%;  $p < 0.001$ ), pACC (8%;  $p < 0.05$ ) and FAS (75%;  $p < 0.001$ ). In non-cholesterol added groups, pAMPK and pACC were inversely related ( $r = -0.637$ ;  $p = 0.026$ ). This relationship was not significant in Hypercholesterolemic Glucomannan or Control diets.

"a" or "b" indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) while comparing C vs. G or HC vs. HG. \*, \*\* or \*\*\* indicate significant differences between a normocholesterolemic group and its hypercholesterolemic counterpart ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  or  $p < 0.001$ , respectively).

## Discussion

The inclusion of Konjac flour reduced the dietary efficiency ratio by decreasing macronutrient bioavailability, leading to an energetic unbalance (increased AMP/ATP ratio) which activates AMPK phosphorylation.

The activation of this enzyme has several effects on metabolism, as shown in fig. 1, being the most remarkable the reduction of FAS expression and the inactivation of ACC via phosphorylation.

In our study, an AMPK phosphorylation and the consequent reduction of FAS expression were observed. However, ACC was not significantly changed.

Several studies in rats fed a cholesterol rich diet indicate that a reduction in FAS expression is related to a decrease in triglycerides and cholesterol synthesis.

Soluble fiber also shows the property of blocking the cholesterol absorption and sequestering bile salts.

In our study, this effect is mainly observed in the hypercholesterolemic diets, where the inclusion of Konjac glucomannan in the potentially functional meat reduced drastically cholesterol and triglycerides levels.

## Conclusions

These findings suggest that the intake of 15% of glucomannan into a freeze-dried restructured pork consumption, with respect to the control group, ameliorates the hypercholesterolemia state in part through the suppression of FAS protein levels and increased AMPK phosphorylation.

The dyslipidemia improvement in the HG vs. HC rats suggests noticeable benefits in MS.

## Acknowledgements

The present study was supported by the Spanish projects AGL2011-29644-C02-02, Consolider-Ingenio 2010 project # CSD2007-00016, and the Mexican CONACYT grant to Laura González-Torres.

## EFFECTO DEL CONSUMO DE PRODUCTOS CÁRNICOS CON DIFERENTES CONTENIDOS GRASOS SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO EN SUJETOS CON HIPERCOLESTEROLEMIA

<sup>1</sup>Delgado-Pando, G., <sup>2</sup>Celada, P., <sup>2</sup>Sánchez-Muniz, F. J., <sup>1</sup>Jiménez-Colmenero, F., <sup>1</sup>Olmedilla-Alonso, B.

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición. ICTAN- CSIC.

<sup>2</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición). Facultad de Farmacia.UCM.



### INTRODUCCIÓN

La carne y los productos cárnicos son una importante fuente de nutrientes en la dieta. Sin embargo, se recomienda un consumo moderado por su contenido en ácidos grasos saturados y su asociación con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular.

**Objetivo:** evaluación del efecto del consumo de patés y de salchichas: a) reducidos en grasa, b) reformulados con una menor cantidad de AGS, pero mayor de poliinsaturados (n-3) y c) comerciales, sobre el perfil lipídico de sujetos con hipercolesterolemia.

### CONCLUSIONES

El consumo de salchichas y patés en los que se redujo su nivel de grasa, enriquecidos o no con n-3, disminuye los niveles de colesterol LDL y de LDL-oxidado, contribuyendo a reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular.

En comparación con los productos comerciales, el consumo de los productos reformulados ejerce un efecto beneficioso, siendo éste mayor en los productos bajos en grasa enriquecidos en n-3.

### MATERIAL Y MÉTODOS

- Sujetos**
- 21 sujetos con edad entre 18 y 62 años
  - Colesterol sérico > 220mg/dl
  - LDL-colesterol > 110 mg/dl
  - Sobrepeso u obesidad

**Criterios exclusión:** consumo de fármacos o alimentos para control colesterol, hipertensión u obesidad

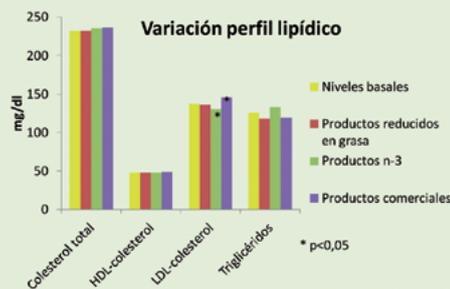
- Parámetros analizados**
- Colesterol sérico (total, HDL y LDL)
  - Triglicéridos
  - LDL oxidada
  - Tensión arterial



Determinaciones a días 0 y 28.

Productos cárnicos enriquecidos en n-3 mediante una mezcla de aceites de oliva (44,39%), linaza (37,87%) y pescado (17,74%), como sustitutos de la grasa animal

### RESULTADOS



- La LDL-oxidada aumentó (p<0,05) tras el consumo de los productos comerciales (Tabla 1)
- La tensión arterial no sufrió variación significativa durante el estudio (Tabla 1)

- Los niveles de colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos no se vieron afectados por el consumo de ninguno de los productos cárnicos
- Los niveles de colesterol LDL disminuyeron un 5,4% (p<0,05) tras el consumo de los productos cárnicos ricos en ácidos grasos omega-3 y aumentaron un 6,4% (p<0,05) después de consumir los productos comerciales

**Tabla 1.** Concentraciones basales y tras la ingesta de los diferentes productos.

|                          | Concentraciones basales | Productos reducidos grasa | Productos n-3 | Productos comerciales |
|--------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------|-----------------------|
| LDL-oxidada (U/l)        | 57,8                    | 56,6                      | 55,8          | 65,2*                 |
| Tensión Arterial (mm Hg) |                         |                           |               |                       |
| Sistólica                | 121,2                   | 119,5                     | 119,5         | 124,3                 |
| Diastólica               | 77,4                    | 75,4                      | 75,0          | 76,4                  |

\* p<0,05



## SUBPROYECTO FUNCIOCA: ACCIÓN 3

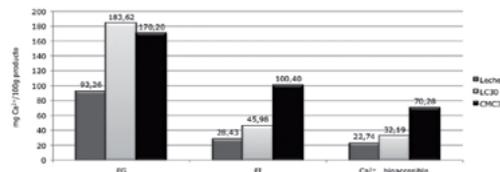
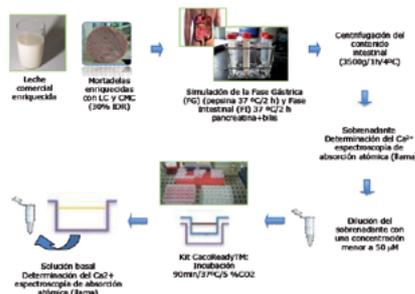
Gámez, M.C., Soto, A.M., Galán, I., García, M.L. y Selgas, M.D.  
 Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad Veterinaria. UCM  
 Santa-María, G., Herraiz, M.M., y Calvo, M.M.  
 Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN). CSIC.



### VIABILIDAD TECNOLÓGICA Y BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MATRICES CÁRNICAS

#### Bioaccesibilidad del calcio incorporado a productos cárnicos cocidos

Se elaboraron productos cárnicos cocidos enriquecidos con lactato cálcico (LC) y citrato-malato cálcico (CCM) en cantidades tales que 100 g de producto aportasen un 30% de ingesta diaria recomendada (IDR:1000 mg). Todos ellos, presentaron unas buenas características sensoriales y aceptabilidad general. Se determinó la bioaccesibilidad del calcio incorporado a estos productos cárnicos mediante un ensayo *in vitro* basado en la absorción intestinal utilizando cultivos de células Caco-2 (Caco-Ready TM). Como control se utilizó leche entera enriquecida en calcio.



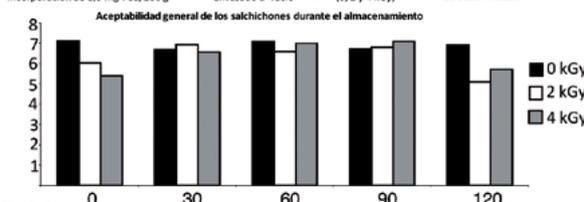
El calcio determinado en la fase intestinal (FI) fue de 45,98 y 100,4 mg/100 g en el caso de las muestras con LC y CMC respectivamente, es decir, el 25 y el 58% de la cantidad presente en la fase gástrica (FG). En la leche fue del 30%. Esta diferencia parece estar relacionada con el tipo de sal cálcica más que con la matriz cárnica; no se ha podido conocer cual es la sal de calcio adicionada a la leche comercial.

El porcentaje de predicción de bioaccesibilidad *in vivo* fue del 10 y del 22% en las muestras enriquecidas con LC y con CCM, respectivamente. Estos son muy próximos a los alcanzados en el control (19%).

**Conclusión:** El citrato malato cálcico se perfila como una sal adecuada para el enriquecimiento de productos cárnicos al presentar una bioaccesibilidad similar a la descrita para la leche y los productos lácteos. Con esta sal se podría ampliar la gama de alimentos enriquecidos en calcio y, de acuerdo con el Real Decreto 1924/2006, estos productos cárnicos podrían ser considerados como *fuentes de calcio*.

#### Conservación de productos cárnicos curados RTE adicionados de tomate desuerado en polvo (TGS)

Elaboración salchichones: Incorporación de 1,5 mg TGS/100g -> Llenado Emvasado a vacío -> Irradiación (0,2 y 4 kGy) -> Conservación a 4°C durante 4 meses



**Resultados:**  
 La microbiota total de los lotes control (sin irradiar) alcanzó valores de  $10^6$  ufc/g, los cuales se mantuvieron durante el almacenamiento. En los irradiados a 2 kGy se observó un descenso de 2 ciclos logarítmicos hasta el tercer mes, descendiendo uno más entre el tercero y el cuarto. La microbiota de los lotes irradiados a 4 kGy se mantuvo en tasas de  $10^3$  ufc/g durante todo el almacenamiento.  
 La concentración de licopeno de los lotes control fue de 1,2 mg/100g muestra. El proceso de irradiación produjo un descenso de los niveles de licopeno hasta un 7% en relación al contenido inicial (lotes sin irradiar). Sin embargo, dicha disminución no fue estadísticamente significativa. El tiempo de almacenamiento no influyó en la concentración del caroteno.  
 El color no se vio afectado ni por la irradiación ni el almacenamiento. Los valores de  $a^*$  y  $b^*$  fueron similares en todos los casos. Tampoco se observaron cambios significativos en la textura hasta los 60 días pero a partir de este momento, aumentaba fundamentalmente la dureza y bajaba la cohesión. En el cuarto mes, la aceptabilidad general del producto disminuyó en las muestras irradiadas aunque los valores alcanzados fueron ligeramente superiores a 5 (5.1-5.7), valores considerados ya en el límite de aceptabilidad organoléptica. Estos cambios de textura podrían provocar el rechazo por parte del consumidor.  
**Conclusión:**  
 Es posible elaborar un salchichón RTE enriquecido en licopeno mediante la adición de tomate desuerado en polvo. El producto es apto para el consumo hasta el cuarto mes de almacenamiento; el factor limitante son los cambios en la textura.

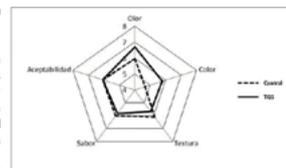
#### Elaboración de burger-meat enriquecido con licopeno

Un burger-meat es un preparado cárnico fresco compuesto por carne picada adicionada de cereales y hortalizas (máximo del 4%) así como especias y conservantes (sulfitos < 450 mg/kg) que pueden prolongar su vida útil por su actividad antimicrobiana y antioxidante (Real Decreto 142/2002).



Evaluación de las características tecnológicas, sensoriales y del contenido en licopeno del producto.

**Resultados:**  
 La incorporación de TGS modificó significativamente todos los parámetros de textura excepto la adhesividad. Las mayores diferencias se observaron en la dureza, mayor en el burger meat control y en los parámetros de gomosidad y masticabilidad. La hamburguesa con TGS mostró una menor cohesión y una menor elasticidad que el control. Este resultado se relacionó con el contenido en fibra del TGS que fue estimado en torno al 50%. El color mostró también matices rojos-anaranjados propios del poder colorante del licopeno.  
 En el análisis sensorial el color y el olor fueron mejor valorados en la hamburguesa enriquecida ( $p < 0.05$ ), sin embargo la textura estuvo mejor puntuada en el control, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas.  
 El sabor y la aceptabilidad general fueron buenos y muy parecidos en ambos lotes. En estos productos se extrajo una concentración muy baja de licopeno. Se piensa que alguno de los componentes de las especias, se cree que la harina, puede interferir en dicha extracción. En este momento se está trabajando para mejorar la extracción del licopeno en estos productos y, en consecuencia, su cuantificación. Así mismo se está estudiando la viabilidad tecnológica y sensorial a lo largo del almacenamiento en refrigeración.



**Agradecimientos:** Proyecto CONSOLIDER-Ingenio 2010 (CSD2007-00016). Grupo Santander-UCM nº 920276 (Ref GR35/10A). A Anvisa por la cesión de las mezcla de especias para el burger meat



**Universidad de Navarra**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
 Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología.

**ainia**  
 centro tecnológico



**V Reunión Plenaria del Proyecto Consolider-Carnisenusa.**

Valencia  
 13 y 14 de Septiembre de 2012

**CARNISENUSA: FUNCIOCA - PRODUCTOS CÁRNICOS FUNCIONALES**

**Mejora del perfil lipídico de productos cárnicos a través de la modificación de su fracción lipídica estabilizada con extractos naturales**

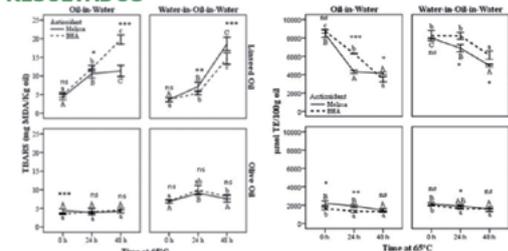
**Incorporación de compuestos bioactivos en emulsiones simples y dobles**

**OBJETIVOS**

Estudiar la estabilidad de emulsiones dobles ricas en AGInsaturados y compararla con la de emulsiones simples.

Valorar la eficacia de antioxidantes naturales vs artificiales en estos sistemas

**RESULTADOS**



**CONCLUSIONES**

Las emulsiones con aceite de oliva resultaron muy estables, independientemente del antioxidante empleado o de la modalidad de emulsión aplicada.

En las emulsiones O/W con aceite de lino, el extracto acuoso de Melisa fue más eficaz que el BHA. En las emulsiones W/O/W se observaron menos diferencias.

**Cárnicos cocidos con perfil lipídico modificado**

**OBJETIVO**

Desarrollo tecnológico de productos cocidos enriquecidos en omega-3 y reducidos en grasa.

**RESULTADOS**

Experimento 1- Reducción de grasa: Lote con 8% grasa y 134kcal/100g (Type 5).

Experimento 2- Modificación del perfil lipídico sobre el lote anterior (Types 5A-5D), incluyendo emulsiones de aceite de lino.

|                      | TYPE 5                   | TYPE 5-A (25%)           | TYPE 5-B (50%)           | TYPE 5-C (75%)           | TYPE 5-D (100%)          |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Fat content (g/100g) | 8.41 ± 0.13 <sup>a</sup> | 7.98 ± 0.02 <sup>a</sup> | 6.89 ± 0.02 <sup>a</sup> | 7.59 ± 0.29 <sup>a</sup> | 7.21 ± 0.09 <sup>a</sup> |
| Energy (kcal/100g)   | 134                      | 124                      | 123                      | 133                      | 125                      |

Table 5. Fatty acid composition of the five types of low fat Bologna-type sausages (g fatty acid/100 g product).

|               | TYPE 5             | TYPE 5A (25%)     | TYPE 5B (50%)     | TYPE 5C (75%)     | TYPE 5D (100%)    |
|---------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| SFA           | 2.94 <sup>a</sup>  | 2.52 <sup>a</sup> | 1.85 <sup>a</sup> | 1.68 <sup>a</sup> | 1.32 <sup>a</sup> |
| MUFA          | 3.87 <sup>a</sup>  | 3.37 <sup>a</sup> | 2.50 <sup>a</sup> | 2.41 <sup>a</sup> | 2.04 <sup>a</sup> |
| PUFA          | 1.49 <sup>a</sup>  | 1.99 <sup>a</sup> | 2.48 <sup>a</sup> | 3.45 <sup>a</sup> | 3.81 <sup>a</sup> |
| ω-3           | 0.10 <sup>a</sup>  | 0.66 <sup>a</sup> | 1.32 <sup>a</sup> | 2.26 <sup>a</sup> | 2.74 <sup>a</sup> |
| ω-6           | 1.38 <sup>a</sup>  | 1.33 <sup>a</sup> | 1.16 <sup>a</sup> | 1.19 <sup>a</sup> | 1.07 <sup>a</sup> |
| ω-6/ω-3       | 13.47 <sup>a</sup> | 2.00 <sup>a</sup> | 0.88 <sup>a</sup> | 0.52 <sup>a</sup> | 0.39 <sup>a</sup> |
| PUFA/SFA      | 0.51 <sup>a</sup>  | 0.79 <sup>a</sup> | 1.34 <sup>a</sup> | 2.06 <sup>a</sup> | 2.85 <sup>a</sup> |
| PUFA+MUFA/SFA | 1.82 <sup>a</sup>  | 2.13 <sup>a</sup> | 2.70 <sup>a</sup> | 3.50 <sup>a</sup> | 4.43 <sup>a</sup> |
| Trans         | 0.10 <sup>a</sup>  | 0.08 <sup>a</sup> | 0.05 <sup>a</sup> | 0.05 <sup>a</sup> | 0.03 <sup>a</sup> |

**CONCLUSIONES**

Se obtuvieron productos tipo mortadela susceptibles de incluir las siguientes declaraciones nutricionales: “reducidas en energía”, “bajas en grasa saturada” y “alto contenido en omega-3”.

No se detectaron problemas tecnológicos, de estabilidad, ni sensoriales.

**Nuevas fuentes lipídicas para la elaboración de cárnicos**

**OBJETIVO**

Valorar la estabilidad térmica de la fracción saponificable e insaponificable del aceite de aguacate como nueva fuente lipídica para la elaboración de productos cárnicos, y compararla con la del aceite de oliva.

**RESULTADOS**

El aceite de aguacate mostró una relación PUFA/SFA (0,61 a t=0) y una relación n-6/n-3 (14 a t=0) superiores al de oliva durante el calentamiento.

El contenido en fitosteroles totales también fue superior en el aceite de aguacate (339 mg/100g a t=0), frente al del aceite de oliva (228 mg/100g).

La estabilidad frente a la oxidación fue semejante en los dos aceites.

**CONCLUSIÓN**

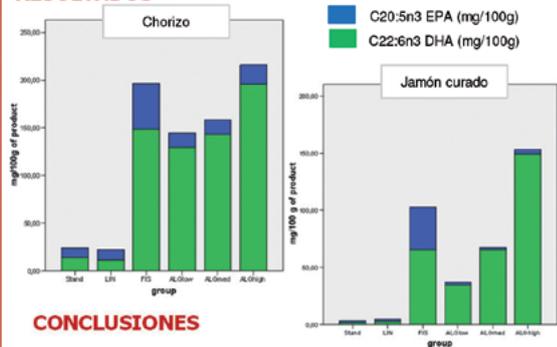
El aceite de aguacate podría ser una buena alternativa para incrementar el contenido en MUFA de formulaciones de productos cárnicos, resultando además estable frente al calentamiento.

**Modificación del perfil lipídico de productos cárnicos mediante intervención nutricional – Estudio en colaboración con Universidad de Gante (Bélgica)**

**OBJETIVO**

Evaluar la eficacia de la modificación de la dieta de cerdo ibérico mediante distintas fuentes de ácidos grasos insaturados en el cambio en la fracción lipídica de embutidos y jamones.

**RESULTADOS**



**CONCLUSIONES**

Las dietas que incorporaron microalgas o aceite de pescado incrementaron significativamente el contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en embutidos y jamones, y consiguieron relaciones n-6/n-3 más bajas que las dietas con aceite de soja.

Las dietas que incorporaron aceite de lino incrementaron el contenido en ácido linoléico, pero no se detectó un aumento significativo en el contenido en PUFA de cadena larga, por el bajo nivel de conversión de ácidos grasos logrado.

**DIFUSIÓN DE RESULTADOS**

Tesis Doctoral  
 \*MIKEL GARCÍA-ÍÑIGUEZ DE CRIJANO, "Design and development of functional meat products". Mención Europea. Directoras: I. Astiasarán y D. Ansoarena. Diciembre 2011.

Publicaciones  
 \* Encalada, MA, Hoyos, KM, Rehecho, S, Berastegi, I, García-Iñiguez de Criano, M, Ansoarena, D, Astiasarán, I, Navarro-Blasco, I, Casero, RY, Calvo, MI. Anti-proliferative effect of Melissa officinalis on Human Colon Cancer Cell Lines. *Plant Foods for Human Nutrition*. 65(4), 209-234 (2011).  
 \* Berastegi, I, Barriuso, Astiasarán, I, Ansoarena, D. Stability of avocado oil during heating: comparative study to olive oil. *Food Chemistry* 132 (1), 438-446, (2012).  
 \* Berastegi, M, García-Iñiguez de Criano, M, I. Calvo, R.Y, Casero, I, Navarro-Blasco, I, Astiasarán, D, Ansoarena (Enviada). Development of "low energy", "high ω-3 fatty acids" and "low saturated fat" Bologna-type sausages: nutritional profile and sensory properties.  
 \* Poyato, C., Navarro-Blasco, I, Astiasarán, I, Ansoarena, D. Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: effect of lipid composition and antioxidant potency. (Enviada).

Capítulo de libro  
 \*Ansoarena, D, Astiasarán, I. "Formulations for Fermented Sausages with Health Attributes". En *Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology*, Second Edition. PP. 626-636. Ed. Hui, Todd, Godsil, Chandra. Taylor and Francis Group (2012)

Comunicaciones a congreso  
 \* Diana Ansoarena, Itaskun Berastegi, Mikel García-Iñiguez de Criano, Sheyla Rehecho, Rita Yolanda Casero, Iñigo Navarro-Blasco, María Isabel Calvo, Iker Astiasarán. "Extractos naturales con capacidad antioxidante: aplicación en la elaboración de alimentos funcionales." 6º Congreso de la Sociedad Española de Fitoterapia. Comunicación oral. Pamplona, 20-21 Octubre 2011.  
 \* Campos, S.; Berastegi, I.; Poyato, C.; García-Iñiguez de Criano, M.; Astiasarán, I. & Ansoarena, D. "Effect of antioxidants on thermal stability of oil in water emulsions rich in unsaturated fatty acids". en Euro Food Lipid Congress: Oils, Fats and Lipids for a Healthy and Sustainable World. Rotterdam. 19-21 Septiembre, 2011.

Proyectos Fin de Máster  
 \* Cerdillera y Poyato Alado. "Comparative study of water Melissa extract and BHA: influence of model emulsion systems in lipid oxidation". Dirigido por: Iker Astiasarán y Diana Ansoarena. Máster Europeo en Alimentación, Nutrición y Metabolismo (E-MENU) Fecha: Septiembre 2011.  
 \* Blanca Barriuso Etxebarri. "Study of steel standards and phytoesterol oxidation products subjected to heat treatment". Dirigido por: Diana Ansoarena e Iker Astiasarán. Máster Europeo en Alimentación, Nutrición y Metabolismo (E-MENU) Fecha: Septiembre 2011.

**DATOS DE CONTACTO**

Grupo UNAV - Investigador Principal en la Universidad de Navarra: Dra. Iker Astiasarán Ancha (iastiasa@unav.es)  
 Dra. Diana Ansoarena Arleda (dansonra@unav.es)  
 Dr. Iñigo Navarro-Blasco (inavarro@unav.es)  
 Mikel García-Iñiguez de Criano (mgicriano@alumni.unav.es)  
 Itaskun Berastegi Zabala (berastegi@alumni.unav.es)  
 Cerdillera Poyato Alado (cpoyato@alumni.unav.es)  
 Grupo AINA  
 Dra. Blanca Viñedo (bviñedo@ainia.es)  
 Dra. Mª Tereza Navarro (mnavarro@ainia.es)

## SUBPROYECTO FUNCIOCA

### ACCIÓN 5. Optimización



**J. Bon, J.A. Carcel, G. Clemente, J. Rodríguez, A. Mulet**  
 Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios (ASPA). Departamento de Tecnología de Alimentos.  
 Universidad Politécnica de Valencia, Camí de Vera s/n, 46022 Valencia

#### OBJETIVO

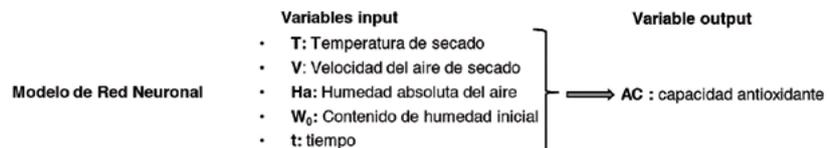
*Objetivo general de la acción 5:* Optimizar el diseño del producto cármico funcional y el proceso de elaboración, buscando los valores óptimos de los parámetros controlables.

#### ACTIVIDADES

##### Actividades realizadas:

##### OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE TOMILLO (THYMUS VULGARIS L.): "GESTIÓN DEL PROCESO DE SECADO"

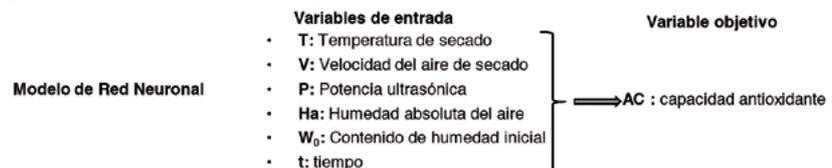
- **Condiciones de secado:**
  - T = 80, 70, 60, 50 y 40 °C
  - V = 1 y 2 m/s
- **Extracción del aceite esencial del tomillo seco mediante CO<sub>2</sub> supercrítico (SFE).**
  - T = 35°C
  - P = 350 bar
  - t = 1 h
  - V<sub>f</sub> = 6.5 mL/min
- **Desarrollo de modelos matemáticos** que describieran la evolución de la capacidad antioxidante de los extractos de tomillo en función de las condiciones de operación.



- **Optimización la capacidad antioxidante:** maximizar la capacidad antioxidante de los extractos de tomillo
  - Función objetivo: AC.
  - Variables decisorias: T, V y t.
  - Restricciones: Valores experimentales extremos de cada variable decisoria.
  - Método de optimización de programación cuadrática secuencial.

##### OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE TOMILLO (THYMUS VULGARIS L.): "GESTIÓN DEL PROCESO DE SECADO ASISTIDO POR ULTRASONIDOS DE POTENCIA"

- **Condiciones de secado:**
  - T = 70, 60, 50 y 40 °C
  - V = 1 y 2 m/s
  - P = 0, 15, 30 y 45 W
- **Extracción del aceite esencial del tomillo seco mediante CO<sub>2</sub> supercrítico (SFE).**
  - T = 35 °C
  - P = 350 bar
  - t = 1h
  - V<sub>f</sub> = 6.5 mL/min
- **Desarrollo de modelos matemáticos** que describiera la evolución de la capacidad antioxidante de los extractos de tomillo en función de las condiciones de operación.



- **Optimización la capacidad antioxidante:** maximizar la capacidad antioxidante de los extractos de tomillo
  - Función objetivo: AC.
  - Variables decisorias: T, V, P y t.
  - Restricciones: Valores experimentales extremos de cada variable decisoria.
  - Método de programación cuadrática secuencial.

##### Actividades previstas

- **Ampliar el estudio de optimización de la capacidad antioxidante de Tomillo, por medio de la gestión del proceso de secado intermitente.**



## EFFECTOS DE SALCHICHAS Y PATÉS FUNCIONALES EN LOS MARCADORES DE SENSIBILIDAD / RESISTENCIA A LA INSULINA DE SUJETOS CON RIESGO CARDIOVASCULAR



Celada, P<sup>2</sup>; Delgado-Pando, G. <sup>1</sup>; Jiménez-Colmenero, F. <sup>1</sup>; Olmedilla, B. <sup>1</sup>; Sánchez-Muniz, F.J. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC). Madrid

<sup>2</sup> Dpto de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. UCM. Madrid



### INTRODUCCIÓN

En el ICTAN-CSIC se han reformulado productos cárnicos modificando el contenido graso (cuali y cuantitativo) de salchichas y patés (ver en material y métodos) con objeto de ser alimentos funcionales para sujetos con factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV). El consumo regular de los productos con grasa modificada provocó una disminución de los niveles de LDL-colesterol y de LDL oxidada y por tanto el nivel de riesgo de ECV. Comparando los efectos de su consumo frente al de productos con contenido graso estándar, los productos enriquecidos en ácidos grasos n-3 provocaron una reducción del LDL-colesterol, del LDL-col. oxidado y de la relación LDL/HDL-col., en cambio, los productos con contenido graso reducido sólo mejoraron los niveles de oxidación del LDL-col. (Delgado-Pando et al., *Eur J Nutr.* 2013, DOI: 10.1007/s00394-013-0502-1). Los alimentos funcionales deben consumirse como parte de la dieta habitual y por ello, interesa conocer, además de su eficacia sobre los marcadores clínicos de riesgo de enfermedad para la que sean diseñados, los efectos sobre otros marcadores asociados con el riesgo de la enfermedad en estudio, como son el perímetro de cintura, la glucemia e insulinemia, en el contexto de la ECV.

### OBJETIVOS

Parámetros relacionados con el riesgo cardiovascular:  
1) glucemia, insulinemia, índices HOMA y QUICKI.  
2) perímetro cintura.

### SUJETOS

N= 22  
(18 hombres,  
4 mujeres)



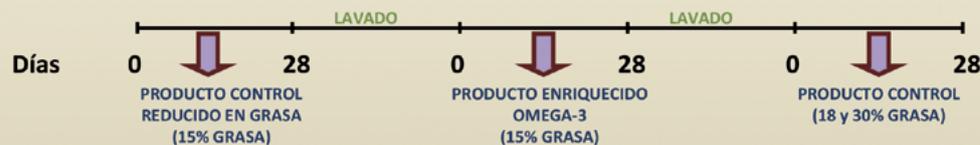
### MATERIAL Y MÉTODOS

Productos cárnicos con un contenido entre 2,5 – 3,7 g/100 g de ácidos grasos n-3. La reformulación se hizo mediante la incorporación de aceites vegetales (oliva y linaza) y de pescado a través de una emulsión de aceite en agua. Se desarrollaron tres productos: 1) reducido en grasa (15% grasa), 2) modificado enriquecido en n-3 (15% grasa) y c) control (18% grasa en salchichas y 30% grasa en patés)

Durante todo el periodo de intervención se recabó información nutricional y de hábitos alimentarios de los sujetos participantes.

### ESTUDIO DE INTERVENCIÓN

Cruzado, controlado y no aleatorizado. Determinaciones a día 0 y día 28.



### VARIABLES

**MARCADORES SENSIBILIDAD/RESISTENCIA INSULINA:** Insulina, glucosa/insulina, QUICKI, HOMA-S.  
**DATOS ANTROPOMÉTRICOS:** Perímetro cintura.

### RESULTADOS

Los índices HOMA-S y QUICKI durante el período consumiendo productos reducidos en grasa muestran diferencias ( $p < 0.07$ ) según el perímetro de cintura de los sujetos: en los de bajo perímetro el HOMA-S y QUICKI aumentan ( $p < 0.09$  y  $p < 0.05$ ). Los productos con grasa reducida y los enriquecidos con n-3 tienden a bajar la insulina y el HOMA-IR. El producto control aumenta la relación glucosa/insulina en los sujetos con mayor perímetro de cintura.  
**Conclusión preliminar:** la población con menor perímetro de cintura podría obtener un mayor beneficio, que los sujetos con mayor perímetro de cintura, con el consumo de productos bajos en grasa y/o enriquecidos con n-3 ya que ven mejorados algunos de los parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa.

**AGRADECIMIENTOS:** Estudio financiado por el proyecto Consolider-Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016). MCyT.



**VALORACIÓN NUTRICIONAL Y DE HÁBITOS DIETÉTICOS EN SUJETOS CON RIESGO CARDIOVASCULAR QUE INCLUYEN EN SU DIETA SALCHICHAS Y PATÉS FUNCIONALES**



Celada, P<sup>2</sup>; Delgado-Pando, G. <sup>1</sup>; Jiménez-Colmenero, F. <sup>1</sup>; Olmedilla, B. <sup>1</sup>; Sánchez-Muniz, F.J. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC). Madrid

<sup>2</sup>Dpto de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. UCM. Madrid



**INTRODUCCIÓN**

En el ICTAN-CSIC se han reformulado productos cárnicos modificando el contenido graso (cuali y cuantitativo) de salchichas y patés (ver en material y métodos) con objeto de ser alimentos funcionales para sujetos con factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV). El consumo regular de los productos con grasa modificada provocó una disminución de los niveles de LDL-colesterol y de LDL oxidada y por tanto el nivel de riesgo de ECV. Comparando los efectos de su consumo frente al de productos con contenido graso estándar, los productos enriquecidos en ácidos grasos n-3 provocaron una reducción del LDL-colesterol, del LDL-col. oxidado y de la relación LDL/HDL-col., en cambio, los productos con contenido graso reducido sólo mejoraron los niveles de oxidación del LDL-col. (Delgado-Pando et al., *Eur J Nutr.* 2013, DOI: 10.1007/s00394-013-0502-1). Los alimentos funcionales deben consumirse como parte de la dieta habitual y por ello, interesa saber en qué medida se modifica la ingesta de nutrientes de los sujetos "diana" al introducirlo en la dieta en cantidad suficiente para provocar el efecto para el cual se diseñaron.

**OBJETIVOS**

- 1) Perfil calórico, graso y contenido nutricional de la dieta.
- 2) Parámetros antropométricos.
- 3) Cambios en los hábitos alimentarios

**MATERIAL Y MÉTODOS**

Productos cárnicos con un contenido entre 2,5 – 3,7 g/100 g de ácidos grasos n-3. La reformulación se hizo mediante la incorporación de aceites vegetales (oliva y linaza) y de pescado a través de una emulsión de aceite en agua. Se desarrollaron tres productos: 1) reducido en grasa (15% grasa), 2) modificado enriquecido en n-3 (15% grasa) y c) control (18% grasa en salchichas y 30% grasa en patés)

**SUJETOS**



Tanto en las fases de intervención como en las de lavado se obtuvo información nutricional y de hábitos alimentarios de los sujetos mediante un formulario en el que registraron todos los alimentos y bebidas consumidos durante tres días, incluyendo un festivo (396 días registrados en total).

**ESTUDIO DE INTERVENCIÓN**

Cruzado, controlado y no aleatorizado. Determinaciones a día 0 y día 28.



**RESULTADOS**

El efecto del consumo de los tres tipos de productos cárnicos sobre parámetros dietéticos y antropométricos relacionados con el riesgo de ECV está actualmente en fase de análisis estadístico. Por el momento, están analizados datos del consumo de productos cárnicos con grasa reducida, los cuales inducen una mejora del Índice de Alimentación Saludable en más del 13% de los sujetos y una reducción de los valores del perímetro de cintura, la relación cintura/cadera y la bioimpedanciometría, así como una tendencia a la reducción de la grasa corporal y del pliegue tricóptico.

**AGRADECIMIENTOS:** Estudio financiado por el proyecto Consolider-Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016). MCyT.



## ESPECTROSCOPIA RAMAN EN LA REFORMULACIÓN DE MATRICES CÁRNICAS EMPLEANDO DIVERSOS SISTEMAS DE ESTABILIZACIÓN DE ACEITE

<sup>1</sup>Herrero, A. M., <sup>1</sup>Ruiz-Capillas, C., <sup>2</sup>Carmona, P., <sup>1</sup>Jiménez-Colmenero, F.

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, (ICTAN-CSIC), c/ Jose Antonio Novais, 10, 28040 Madrid, España. <sup>2</sup>Instituto de Estructura de la Materia (CSIC), c/ Serrano 121, 28006 Madrid, España.

### INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de productos cárnicos los procesos de reformulación encaminados a sustituir la grasa animal por otra de origen vegetal más acorde con las recomendaciones de salud, han adquirido una gran relevancia. Diversos procedimientos se han empleado para incorporar aceites vegetales en estos productos añadidos micro-encapsulados, en forma de emulsiones de aceite en agua, y recientemente estabilizados mediante geles de polisacáridos (1-5). Una estrategia para entender los cambios que origina la incorporación de estos sistemas a matrices cárnicas es conocer los cambios estructurales que tienen lugar y su relación con las modificaciones en propiedades tecnológicas, como la textura. El conocimiento de estos cambios ayudaría a optimizar el proceso de elaboración de este tipo de productos.

La espectroscopía Raman (FT-Raman) se ha mostrado como una herramienta con enorme potencial para proporcionar información acerca de la estructura secundaria y terciaria de proteínas de alimentos, en general, y de matrices cárnicas en particular (6). Recientemente, además, se ha utilizado esta técnica espectroscópica para proporcionar información estructural en el desarrollo de procesos de estabilización de aceite de oliva mediante geles de polisacáridos (7).

### OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue establecer las relaciones entre los cambios en la estructura proteica, mediante FT-Raman, y las modificaciones en propiedades texturales en matrices cárnicas reformuladas empleando diversos sistemas de estabilización de aceite basados en el empleo de geles de polisacáridos.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se ha abordado en dos fases. En primer lugar se ha llevado a cabo el desarrollo de varios sistemas de estabilización de aceite de oliva. Para tal fin se han estudiado diferentes combinaciones de aceite de oliva y polisacáridos (inulina, dextrina y alginato) (Fig. 1). En base a los resultados obtenidos, se han analizado los cambios estructurales y de textura que se originan en la reformulación de matrices cárnicas por el empleo de estos sistemas como sustitutos de grasa animal. Se elaboraron matrices cárnicas con grasa animal (MC-GA) y con una combinación de aceite de oliva, alginato e inulina (MC-AI) o alginato-dextrina (MC-AD) como sustitutos de grasa. Se realizaron análisis de composición, textura (TPA) y FT-Raman.

### RESULTADOS

Los sistemas de aceite de oliva estabilizados con geles de polisacáridos presentaron parámetros de textura (Fig. 2) y pérdidas por cocción (< 1,5 %), considerados óptimos para su utilización como sustitutos de grasa. El contenido en grasa de las matrices cárnicas reformuladas osciló entre 17-20%. En las matrices reformuladas (MC-AI y MC-AD) el nivel en aceite de oliva fue 13,5 g/100 g. La sustitución de grasa animal por los sistemas de aceite de oliva desarrollados originó un aumento ( $P < 0,05$ ) de la dureza y masticabilidad, más significativo en MC-AI (Tabla 1). El análisis de espectroscopía Raman (Fig. 3), principalmente del perfil espectral de la banda amida I, reveló un aumento de estructura en láminas  $\beta$  en MC-AD y MC-AI. Este enriquecimiento en láminas  $\beta$  fue más pronunciado ( $P < 0,05$ ) en MC-AI. Los resultados mostraron que existe una correlación significativa ( $R = 0,92$ ,  $P < 0,05$ ) entre el contenido en láminas  $\beta$  y la dureza de las matrices cárnicas.

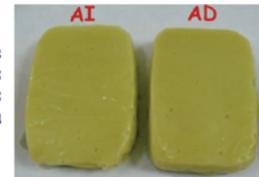


Fig. 1. Matrices de aceite de oliva elaboradas con una combinación de alginato-inulina (AI) y alginato-dextrina (AD).

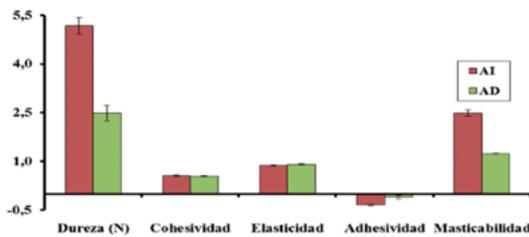


Fig. 2. Parámetros de textura (TPA) de los sistemas de estabilización de aceite de oliva elaborados con una combinación de alginato-inulina (AI) y alginato-dextrina (AD).

### CONCLUSIONES

La sustitución de grasa animal por sistemas de estabilización de aceite de oliva, como análogos de grasa, en matrices cárnicas induce modificaciones en la estructura proteica en términos de un aumento de estructura en láminas  $\beta$ . Los cambios son de mayor relevancia cuando la inulina forma parte del sistema de estabilización. Estas características estructurales parece que juegan un papel importante en algunas propiedades tecnológicas, como la textura. El conocimiento de la relación entre las características estructurales y tecnológicas podría ser útil para optimizar las condiciones de desarrollo y formulación de productos cárnicos más saludables en relación con un contenido lipídico óptimo.

Tabla 1. Parámetros de textura (TPA) de las matrices cárnicas formuladas con grasa animal (MC-GA) y sistemas de estabilización de aceite de oliva elaborados con una combinación de alginato-dextrina (MC-AD) o alginato-inulina (MC-AI) como sustitutos de grasa animal.

| Muestras | Dureza (N)                | Elasticidad (mm)         | Cohesividad (adimensional) | Masticabilidad (N×mm)     |
|----------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
| MC-GA    | 16,12 ± 0,22 <sup>c</sup> | 4,86 ± 0,31 <sup>a</sup> | 0,49 ± 0,04 <sup>a</sup>   | 39,43 ± 3,06 <sup>c</sup> |
| MC-AD    | 17,93 ± 0,48 <sup>b</sup> | 5,04 ± 0,42 <sup>a</sup> | 0,55 ± 0,03 <sup>a</sup>   | 48,56 ± 2,34 <sup>b</sup> |
| MC-AI    | 19,71 ± 0,33 <sup>a</sup> | 4,92 ± 0,23 <sup>a</sup> | 0,53 ± 0,09 <sup>a</sup>   | 53,40 ± 2,15 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup>Media ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

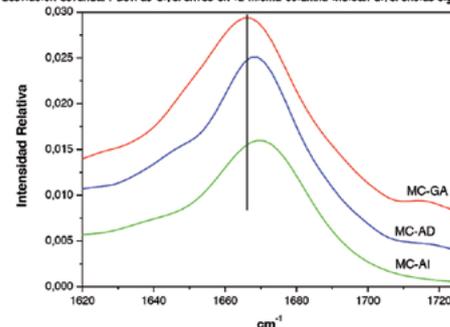


Fig. 3. Espectros FT-Raman (1620-1725  $\text{cm}^{-1}$ ) de las matrices cárnicas formuladas con grasa animal (MC-GA) y sistemas de estabilización de aceite de oliva elaborados con una combinación de alginato-dextrina (MC-AD) o alginato-inulina (MC-AI) como sustitutos de grasa animal.

BIBLIOGRAFÍA: (1). Jiménez-Colmenero F. (2007). Trends in Food Sci. Tech.18, 567-578. (2). Herrero AM, et al. (2011). Food Hydrocolloid., 25, 12-18. (3). Cáceres E, et al. (2008). Meat Sci., 80,183-193. (4). Valencia I, et al. (2008). Meat Sci., 80, 1046-1054. (5) Ruiz-Capillas, et al. (2013). Food Chem. (revisión). (6) Herrero AM. (2008). Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 48, 512-523. (7) Herrero AM., (2013). Food Hydrocolloid. (revisión)

Agradecimientos: Consolider Ingenio 2010:CARNISENUSA (CSD2007-00016), AGL2010-19515-ALI, AGL2011-29644-CO2-01,



INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN



CSD2007-00016  
FUNCIOCA

## ELABORACION DE SALCHICHAS (“ASIAN HOG DOG”) SIN NITRITOS ADICIONADOS



C. Ruiz-Capillas<sup>1</sup>, S.Tahmouzi<sup>2</sup>, M. Triki<sup>1</sup>, F. Jiménez-Colmenero<sup>1</sup>, A. M. Herrero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, (ICTAN-CSIC), c/José Antonio Novais,10, 28040 Madrid, España.

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources, Mollasani, Ahvaz, Iran.  
Email: claudia@ictan.csic.es

### INTRODUCCION:

Las salchichas tipo “hog dog” son productos muy populares en todo el mundo. En países asiáticos presentan algunas particularidades asociadas a su elaboración con carne de vacuno, elevada proporción de aceite, adición de diversos ingredientes y cantidades variables de nitritos. Estos últimos se emplean principalmente por su función antimicrobiana y capacidad antioxidante, así como contribuir al flavor y color de los productos. Sin embargo, los nitritos han sido asociados con problemas en la salud principalmente por su implicación en la formación de nitrosaminas, compuestos con actividad cancerígena y/o mutagénica. Con el fin de limitar este riesgo se ha tratado de reducir o eliminar su adición empleando distintas alternativas para ejercer sus funciones en los productos cárnicos. Entre las distintas estrategias, se ha propuesto la adición de ingredientes vegetales con elevados niveles de nitratos y nitritos (ej. apio), así como colorantes entre los que cabe destacar la cochinilla. Recientemente, se ha ensayado el annato (*Achiote*, *Bixa orellana* L.), que además tiene efecto antimicrobiano y antioxidante. De igual modo se han empleado diversos ingredientes como antioxidantes naturales y para contribuir al color.

### OBJETIVO:

En base a estas consideraciones se planteó un estudio encaminado a valorar el efecto que presentaban sobre las características del producto la aplicación de una estrategia global de sustitución de nitritos empleando distintos ingredientes [fibra de naranja (ODF), apio, lactato sódico, vitamina E, vitamina C, cochinilla y annato] con el propósito de dotar al sistema de adecuadas capacidades antioxidantes y antimicrobianas y de coloración.

### MATERIALES Y METODOS:

Se prepararon tres formulaciones de “Asian hot dog”: control (CN) con 120 mg/kg de nitrito sódico y otras dos formuladas sin nitrito adicionado y con distintos ingredientes (ODF, apio, lactato sódico, vitamina E, vitamina C), para reemplazarlo, diferenciándose entre ellos en el colorante empleado: cochinilla (RC) y annato (RA) (Tabla 1). Se llevaron a cabo análisis microbiológico, oxidación lipídica, nitrito residual, color y análisis sensorial.

| Muestra | Annato | Cochinilla | Nitrito |
|---------|--------|------------|---------|
| CN      | 0      | 0          | 0,012   |
| RC      | 0      | 0,05       | 0       |
| RA      | 0,025  | 0          | 0       |

Tabla 1: Preparación de distintas muestras de salchichas tipo Asian “hot dog”.

### RESULTADOS:

Los productos reformulados sin nitritos añadidos (RC y RA) contenían niveles de nitrito residual entre 23-24 mg/kg frente a los 88,7 mg/kg en los preparados con nitritos (CN). La muestra CN también mostró los valores más elevados de L\* y a\* (Figura 1). El producto con cochinilla exhibió los valores inferiores (P<0,05) de L\*. Sin embargo, presentó el mayor grado de aceptabilidad general frente al lote con annato (Tabla 2). Todos los lotes mostraron valores similares (P>0,05) a nivel del recuento microbiano y oxidación lipídica.

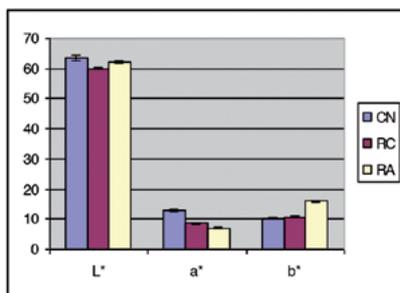


Figura 1: Parámetros de color en diferentes salchichas tipo Asian “hot dog”: Control (CN) con nitritos, con cochinilla (RC) y annato (RA).

| Muestras | Color                   | Jugosidad              | Firmeza                | Aceptabilidad general   |
|----------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| CN       | 7,51±2,37 <sup>b</sup>  | 7,36±1,85 <sup>a</sup> | 5,13±0,63 <sup>a</sup> | 7,15±1,53 <sup>b</sup>  |
| RC       | 4,71±2,34 <sup>ab</sup> | 5,82±1,96 <sup>a</sup> | 4,75±1,48 <sup>a</sup> | 4,85±1,67 <sup>ab</sup> |
| RA       | 4,02±2,21 <sup>a</sup>  | 5,27±1,61 <sup>a</sup> | 4,56±1,11 <sup>a</sup> | 4,46±1,80 <sup>a</sup>  |

Tabla 2: Análisis sensorial de diferentes salchichas tipo Asian hot dog: Control (CN) con nitritos, con cochinilla (RC) y annato (RA).

### CONCLUSIONES:

La estrategia más adecuada para elaborar salchichas tipo “Asian hot dog” sin nitrito adicionado se fundamenta en emplear cochinilla junto a ingredientes como fibra de naranja, vitamina E y C. Este producto reformulado presentó además adecuada estabilidad microbiana y oxidativa.

**Agradecimientos:** Estudio financiado por el proyecto Consolider-Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016), el AGL2010- 19515-ALI y AGL2011-29644-C02-0. La Universidad de Teherán ha financiado la beca de Mr. Saeed Tahmouzi en el ICTAN. AECID-MAE financió la beca de Mr. Mehdi Triki.



## OPTIMIZACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO DE SALCHICHAS TIPO FRANKFURT

**Salcedo-Sandoval, L; Cofrades, S; Ruiz-Capillas, C; Jiménez-Colmenero, F.**  
 Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición ICTAN-CSIC,  
 C/ José Antonio Novais, 10, 28040 Madrid (España)



### INTRODUCCIÓN

Las salchichas tipo frankfurt son productos elaborados muy populares, frecuentemente consumidos y que gozan de una amplia aceptación en algunos sectores de la población. Sin embargo, el consumo de estos productos puede tener efectos negativos para la salud por su contenido en grasa y su perfil lipídico. Las estrategias de reformulación se encuentran dentro de las propuestas más relevantes en el desarrollo de productos cárnicos con reducido contenido en grasa y mejor perfil lipídico. Diversos ingredientes no cárnicos (de origen vegetal y animal) se han empleado con este propósito. Geles de konjac se han utilizado en la reducción de grasa en productos cárnicos tipo gel/emulsión por sus propiedades tecnológicas y su capacidad de simular las características organolépticas de la grasa. La sustitución de grasa animal por una combinación de aceites de origen vegetal y/o marino estabilizados en distintos sistemas da lugar a productos con un mejor perfil lipídico.

### OBJETIVO

El objetivo del presente estudio fue investigar en salchichas tipo frankfurt:

- El efecto de la reducción del contenido en grasa de cerdo mediante el empleo de gel de konjac.
- La reducción del contenido de grasa y la mejora del perfil lipídico mediante la sustitución parcial de grasa de cerdo por una mezcla de aceites con alto contenido de AGMI y AGPI n-3 incorporado de tres formas distintas: gel de konjac con aceite, emulsión de aceite en agua y emulsión de aceite en agua más gel de konjac.

### MATERIALES Y MÉTODOS



Figura 1. Diseño del experimento y análisis realizados

### RESULTADOS

#### Composición

Los productos formulados presentan una humedad entre el 60-70 % y una proteína entre el 15-17 %. Se observaron diferencias significativas en el contenido de grasa entre la muestra control (18,88%) y las muestras modificadas (10,01-10,30%) [Tabla 1], resultados que están en consonancia con el diseño de las formulaciones.

Tabla 1. Composición (%) de los productos elaborados

| Muestra | Humedad             | Proteína           | Grasa              | Cenizas           |
|---------|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| F/C     | 59.54 <sup>a</sup>  | 15.34 <sup>a</sup> | 18.88 <sup>b</sup> | 3.17 <sup>a</sup> |
| F/K     | 67.70 <sup>b</sup>  | 16.20 <sup>b</sup> | 10.01 <sup>a</sup> | 3.33 <sup>c</sup> |
| F/KO    | 70.06 <sup>c</sup>  | 16.27 <sup>b</sup> | 10.30 <sup>a</sup> | 3.29 <sup>c</sup> |
| F/EO    | 68.37 <sup>c</sup>  | 17.04 <sup>c</sup> | 10.27 <sup>a</sup> | 3.23 <sup>b</sup> |
| F/EO+K  | 68.26 <sup>bc</sup> | 17.01 <sup>c</sup> | 10.26 <sup>a</sup> | 3.34 <sup>c</sup> |

F/C: Salchicha control con grasa de cerdo; F/K: salchicha con gel de konjac; F/KO: salchicha con gel de konjac y mezcla de aceites; F/EO: salchicha con emulsión de mezcla de aceites. F/EO+K: salchicha con emulsión de mezcla de aceites más gel de konjac. Letras distintas en la misma columna indica la existencia de diferencias significativas (P<0,05).

La reducción del contenido de grasa de los productos reformulados con respecto al control fue aproximadamente del 46%. De acuerdo con el Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo, si en un producto la reducción del contenido de un nutriente es de como mínimo el 30 %, en comparación con un producto similar, este podría llevar la alegación "Contenido reducido de grasa" [1].

### Perfil de ácidos grasos

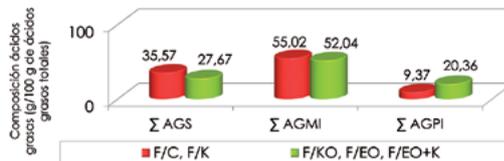


Figura 2. Composición en ácidos grasos de las distintas muestras. AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados.

En las formulaciones en las que la mezcla de aceites fue incorporada se consiguió una mejora del perfil lipídico, disminuyendo los niveles de AGS, y aumentando los de AGPI (Figura 2), de los cuales gran parte son AGPI n-3 (Figura 3).

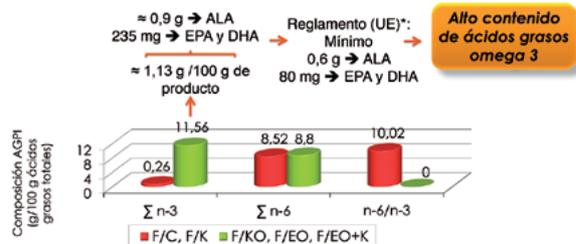


Figura 3. Contenido de AGPI: Σ n-3, Σ n-6 y relación n-6/n-3. ALA, ácido alfa linolénico; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico. \* Reglamento (UE) n° 116/2010 [2]

### CONCLUSIONES

En base a la estrategia de reformulación empleada en este estudio (reducción y mejora del perfil de ácidos grasos) se ha conseguido optimizar el perfil lipídico de salchichas tipo frankfurt. De acuerdo con el Reglamento (CE) n° 1924/2006 del Parlamento Europeo, los productos reformulados podrían llevar la alegación "Contenido reducido de grasa", y según el Reglamento (UE) n° 116/2010 de la Comisión Europea, las formulaciones en las que se mejoró el perfil lipídico podrían llevar la alegación "Alto contenido de ácidos grasos omega-3".

### REFERENCIAS

1. Reglamento (CE) n° 1924/2006 del Parlamento europeo y del Consejo, del 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.
2. Reglamento (UE) n° 116/2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales.

Agradecimientos: Esta investigación ha sido financiada por los proyectos AGL2008-04892-CO3-01 y Consolider-Ingenio 2010:CARNISEUSA (CSD2007-00016) del Ministerio de Ciencia y Tecnología y llevada a cabo mediante una ayuda predoctoral (JAE-pre) cofinanciada por el al Fondo Social Europeo (FSE).



## DESARROLLO DE UN PRODUCTO CÁRNICO FRESCO (SALCHICHAS TIPO MERGUEZ) CON MEJOR PERFIL LIPÍDICO Y NIVEL REDUCIDO DE SODIO

Triki, M., Herrero, A.M., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C.

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC).

C/ José Antonio Novais 10. 28040-Madrid

Email: claudia@ictan.csic.es



### INTRODUCCIÓN

Una de las principales tendencias que marca la evolución del consumo de derivados cárnicos hoy en día surge de la preocupación de los consumidores por la salud. De este modo se está incrementado el consumo de productos percibidos como más "saludables". El merguez es un tipo de salchicha fresca norteafricana formulada con carne de vacuno y/o cordero, ampliamente consumida en numerosos países, incluyendo varios europeos. Este tipo de salchicha fresca presenta algunas limitaciones para la salud relacionadas con su alto contenido en grasa animal (más del 20 %), ácidos grasos saturados (AGS) y contenido en sal (3,6 %). Como otros productos cárnicos, el merguez puede ser reformulado para mejorar su perfil lipídico y su contenido sódico. En este sentido, la reformulación de este producto cárnico fresco sería una buena iniciativa para la obtención de merguez más saludable.

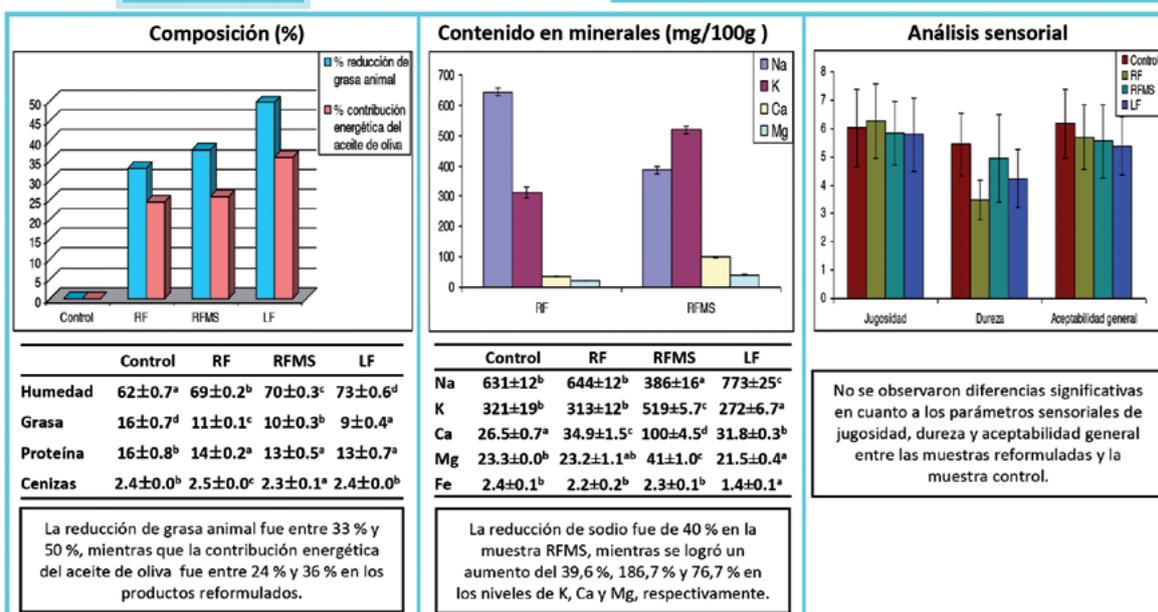
### OBJETIVO

Desarrollar un producto cárnico fresco (salchicha tipo merguez) potencialmente funcional en base a la mejora de su contenido lipídico y en sodio empleando en su formulación un gel de konjac con aceite de oliva y una combinación de sales que contiene KCl, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó carne y grasa de vacuno para la obtención de las diferentes muestras. Se elaboraron cuatro formulaciones, una muestra control con contenido normal de grasa animal y tres modificadas. Para los productos reformulados se preparó un gel de konjac en el que se incorporó un 20 % de aceite de oliva (OKM). Se elaboró una formulación (RF) con una sustitución parcial (75 %) y otra (LF) con sustitución total (100 %) de la grasa animal por el OKM. En la muestra RF se reemplazó además el 50 % del NaCl añadido por una mezcla de sales (MS) que contenía KCl, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub> (RFMS). Se evaluaron los parámetros siguientes: composición, contenido mineral y atributos sensoriales.

### RESULTADOS



### CONCLUSIONES

La sustitución total y parcial de la grasa animal por un gel de Konjac conteniendo aceite de oliva integrado en su matriz, y la sustitución parcial del NaCl por una mezcla de sales, ha dado lugar a salchichas frescas tipo merguez más saludables con una apreciación sensorial satisfactoria. Por lo tanto, esta estrategia se considera adecuada para la reformulación de este tipo de productos cárnicos.

**AGRADECIMIENTOS:** Estudio financiado por el proyecto Consolider-Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016) y el AGL2010- 19515-ALI y AGL2011-29644-C02-0. AECID-MAE financió la beca de M. Triki.



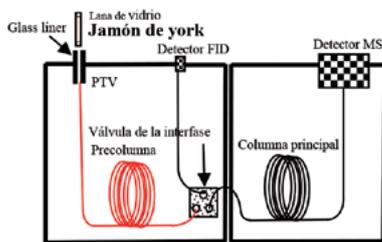
# SUBPROYECTO FUNCIOCA: ACCIÓN 3

Soto A.M., Gámez, M.C., Galán, I., García, M.L. y Selgas, M.D.  
 Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad Veterinaria. UCM  
 Herráiz M.M., Santa-María, G. y Calvo, M.M.  
 Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN). CSIC

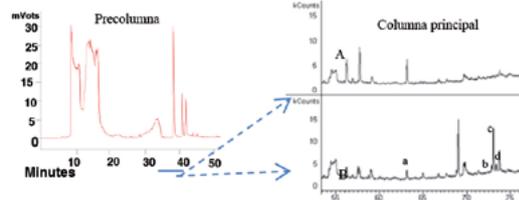


## DETECCIÓN DE COMPUESTOS INDICADORES DE IRRADIACIÓN EN PRODUCTOS CÁRNICOS UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES MULTIDIMENSIONAL

**OBJETIVO:** Mejorar los Métodos Oficiales de Análisis establecidos para detectar si un alimento, en este caso carne, ha sido o no irradiado. Se ha propuesto la introducción directa de la muestra a analizar en el PTV de un GC multidimensional (MDGC).



Introducción directa de jamón york en el PTV (glass liner) de un cromatógrafo de gases multidimensional.



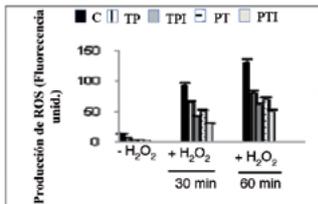
Cromatogramas obtenidos al introducir jamón york en el inyector de un MDGC. Los de color negro corresponden a lo obtenido al transferir el fluido entre los minutos 34 al 43 en la primera columna (cromatograma rojo) a la segunda de muestras sin irradiar (A) o irradiadas a 0,5 kGy (B). Los picos identificados fueron: a) 1-tetradeceno, b) n-pentadecano, c) 8-heptaceno y d) 1-hexadeceno.

- SE HA CONSEGUIDO:**
- 1- Identificar 3 alquenos que se forman durante la irradiación en las muestras irradiadas a 0,5 kGy.
  - 2- Evitar el paso de preparación de la muestra.
  - 3- No utilizar solventes.
  - 4- Acortar considerablemente el tiempo total de análisis.

## EFEECTO DE LA IRRADIACIÓN EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL LICOPENO

Se utilizaron cultivos de fibroblastos RAT-1 a los que se adicionó un extracto de piel de tomate sin irradiar (PT) y tratada con 4 kGy (PTI) así como tomate en polvo sin (TP) o irradiado con 4 kGy (TPI). Se determinó:

- Las especies reactivas de oxígeno (ROS) por fluorescencia en presencia o ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- La posible activación de la proteína quinasa por quinógenos.
- La activación del complejo proteico NF-κB en macrófagos THP-1 mediante EMSA (Electrophoretic Mobility-Shift Assay).
- La expresión de las proteínas Cox-2 y Nox-4, asociadas al estrés oxidativo.



Determinación de ROS por fluorescencia a partir de un cultivo de fibroblastos RAT-1 sin tomate (C), con tomate seco, con tomate el polvo sin (TP) o irradiado (TPI) y piel de tomate sin (PT) o irradiada (PTI) a 4 kGy. Efecto de la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 ó 60 min.

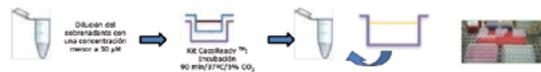
**CONCLUSIONES:**

- 1- Todas las pruebas realizadas mostraron disminución de las ROS al adicionar los productos del tomate. La disminución fue mayor cuando se añadía PT que tomate en polvo.
- 2- En todos los casos el descenso de las ROS fue mayor en los productos irradiados
- 3- El comportamiento distinto del TP y la PT sometidas o no a radiación puede deberse a que el contenido en licopeno de TP es mayor que la PT. La irradiación induce la isomerización del todo *trans* licopeno a formas *cis* y estas tienen mayor capacidad antioxidante.

## BIOACCESIBILIDAD DEL CALCIO A PARTIR DE DIFERENTES MATRICES CÁRNICAS

Se elaboraron productos cárnicos frescos y madurados enriquecidos con lactato cálcico (LC) y citrato-malato cálcico (CMC). Se ensayaron diferentes concentraciones buscando siempre un equilibrio entre el máximo aporte de calcio y la mejor calidad tecnológica y sensorial. En hamburguesas, los mejores resultados se obtuvieron con CMC en cantidades suficientes para que 100 g aportasen hasta un 40% de la IDR (1000 mg), y en los embutidos madurados, con CMC y LC al 30% de la IDR. Se determinó la bioaccesibilidad del calcio mediante un ensayo *in vitro* utilizando cultivos de células Caco-2 (Caco-Ready™). Como control se utilizó leche entera comercial enriquecida en calcio.

$$(\% BA = [Ca \text{ en cámara basal/Ca en producto}] \times 100)$$



Contenido en Ca (mg/100 g) en el producto enriquecido y en las fases gástrica e intestinal. Porcentaje de bioaccesibilidad

| Muestra           | Producto enriquecido | Fracción soluble |                 |         |              |
|-------------------|----------------------|------------------|-----------------|---------|--------------|
|                   |                      | Fase Gástrica    | Fase intestinal | % Papp  |              |
| Leche             | 122.60±14.76         | 92.26±9.48       | 28.43±0.29d     | 70-100% | 16.23- 23.19 |
| Hamburguesa CMC40 | 418.51±36.66         | 405.38±30.95     | 164.17±13.57a   | 70-100% | 25.06-35.80  |
| Madurado CMC30    | 301.43±34.28         | 104.60±14.60     | 29.00±2.10d     | 20-70%  | 2.00- 6.99   |
| Madurado LC30     | 311.52±33.94         | 108.60±10.00     | 29.00±5.30d     | 20-70%  | 2.46- 8.60   |

CMC: Citrato malato cálcico; LC: Lactato cálcico; Papp: porcentaje de permeabilidad aparente

La bioaccesibilidad del Ca a partir de hamburguesas fue próxima al 30%. Esto implica que una hamburguesa de 120 g aporta una cantidad de Ca similar a la de un vaso de leche (250 ml). En los embutidos madurados, los valores fueron más bajos, de lo que se deduce la importancia de la matriz cárnica en la bioaccesibilidad de este mineral. Por tanto, estas hamburguesas podrían ser consideradas *fuentes* de calcio de acuerdo con el Reglamento N° 1907/2006 del Parlamento Europeo.

**CARNISENUSA: FUNCIOCA - PRODUCTOS CÁRNICOS FUNCIONALES**

**Mejora del perfil lipídico de productos cárnicos a través de la modificación de su fracción lipídica estabilizada con extractos naturales**

**Reduction of sodium and increment of calcium and  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids in dry fermented sausages: effects on the mineral content, lipid profile and sensory quality**

- The aim of this study was to develop a new formulation of dry fermented sausages including linseed oil as a source of  $\omega$ -3 fatty acids and CaAs as a partial replacement for NaCl.
- Technological, nutritional and sensory evaluation of the resulting products has been carried out. The important role of both fat and salt in the technological and sensory viability of dry fermented sausages makes this simultaneous approach a challenging strategy that has not previously been assayed.

**Table 4. Fatty acid fractions and relations (g FA kg<sup>-1</sup> of product)**

|                          | Control       | 14gSalt       | 10gSalt       |
|--------------------------|---------------|---------------|---------------|
| SFA                      | 117.3 ± 0.05c | 101.1 ± 0.29b | 98.7 ± 0.55a  |
| MUFA                     | 150.3 ± 0.13c | 136.5 ± 0.10b | 129.2 ± 0.58a |
| PUFA                     | 58.4 ± 0.06a  | 72.1 ± 0.49b  | 74.2 ± 1.13c  |
| $\omega$ -3              | 3.2 ± 0.06a   | 21.9 ± 0.23b  | 24.7 ± 0.67c  |
| $\omega$ -6              | 55.1 ± 0.08c  | 50.2 ± 0.23b  | 4.95 ± 0.47a  |
| $\omega$ -6/ $\omega$ -3 | 16.99 ± 0.29b | 2.30 ± 0.02a  | 2.00 ± 0.04a  |
| PUFA/SFA                 | 0.50 ± 0.00a  | 0.71 ± 0.01b  | 0.75 ± 0.02c  |
| PUFA + MUFA/SFA          | 1.78 ± 0.00a  | 2.06 ± 0.01b  | 2.06 ± 0.02b  |
| trans                    | 3.3 ± 0.05c   | 2.5 ± 0.08b   | 2.4 ± 0.05a   |

Fatty acid fractions are expressed as g kg<sup>-1</sup> of product as mean ± standard deviation. For each parameter, different letters denote significant differences among types of formulations ( $P < 0.05$ ).

In conclusion, the strategy of combining a reduction in the salt content and a simultaneous modification in the lipid fraction of dry fermented sausages resulted in sensory viable products with lower sodium content, higher calcium content and a significant supply of omega-3 fatty acids.

**Table 2. Fat and mineral content (ash, sodium and calcium)**

|                                  | Control       | 14gSalt        | 10gSalt      |
|----------------------------------|---------------|----------------|--------------|
| Fat (g kg <sup>-1</sup> sausage) | 329.6 ± 12.0b | 312.5 ± 13.5ab | 304.8 ± 2.4a |
| Ash (g kg <sup>-1</sup> sausage) | 57.6 ± 0.3b   | 43.6 ± 7.0a    | 43.6 ± 2.4a  |
| Na (g kg <sup>-1</sup> sausage)  | 18.7 ± 0.2c   | 11.6 ± 0.3b    | 9.4 ± 0.7a   |
| Ca (g kg <sup>-1</sup> sausage)  | 0.87 ± 0.2a   | 4.00 ± 0.14b   | 5.26 ± 0.13c |

Results are expressed as mean ± standard deviation. Different letters within a row denote significant differences among formulations ( $P > 0.05$ ).

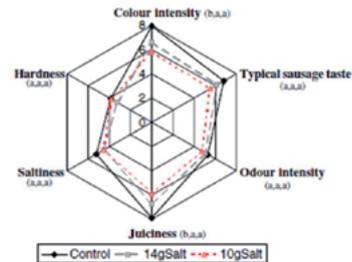
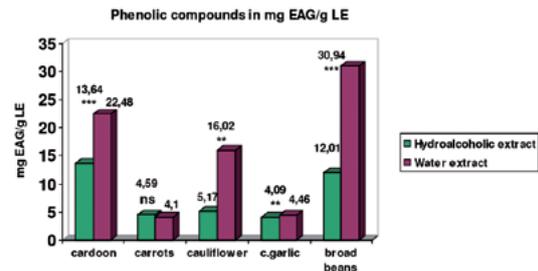


Figure 1. Sensory scores of a quantitative descriptive analysis for each one of the developed products. For each parameter, different letters denote significant difference among formulations: first letter = control, second letter = 14gSalt; third letter = 10gSalt ( $P < 0.05$ ).

**Characterization of plant extracts to be used as antioxidants in meat products**

- Water and hydroalcoholic lyophilized extracts from products of cardoon, broad beans, carrots, Chinese garlic and cauliflower were obtained.
- Characterization of their antioxidant activity was done by ABTS, DPPH and ORAC methods. Total phenolic content was also determined.
- Only extracts from broad beans reached high values in both types of extracts and might be worthy to be explored as potential source of antioxidants in meat products.



**DIFUSIÓN DE RESULTADOS**

- Publicaciones**
- Poyato, C. Navarro-Blasco, I. Calvo, M.I., Cawero, R.Y., Astiasarán, I. Ansoarena, D. Oxidative stability of OW and W/O/W emulsions: Effect of lipid composition and antioxidant polarity. *Food Research International*, 51, 132-140 (2013).
  - Barruso, B., Astiasarán, I., Ansoarena, D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *European Food Research and Technology*, 236 (1), 1-15 (2013).
  - Ansoarena, D., Barruso, B., Cardenia, V., Astiasarán, I., Lecher, G., Rodriguez-Estrada, M.T. Thermo-oxidation of cholesterol: effect of the unsaturation degree of the lipid matrix. In press.
- Capítulos de libro**
- Ansoarena, D., Astiasarán, I. "Enrichment of meat products with omega-3 fatty acids by methods other than modification of animal diet". En *Food enriched in omega-3*. Ed. Woodhead. (en prensa).
  - Ansoarena, D., Astiasarán, I. "Development of nutraceuticals containing marine algae oils". En *Functional Ingredients from algae for foods and nutraceuticals*. Ed. Woodhead. (en prensa).
- Comunicaciones a congresos**
- Poyato, C., Astiasarán, I., Ansoarena, D. "Estabilidad de emulsiones W/O/W reducidas en grasa como vehículo de compuestos bioactivos". ENTIDAD ORGANIZADORA: CESA. LUGAR: Ciudad Real (España). FECHA: 7-9 Noviembre 2012. Carácter: Nacional
  - Ansoarena, D. "Design and development of functional meat products". ENTIDAD ORGANIZADORA: Oxford Brookes University. LUGAR: Oxford (UK). FECHA: 15-14 Noviembre 2012.
- Tesis**
- Título: Dietary impact of functional foods: reformulation of meat products. Doctorando: Izaekun Berasategi. Universidad de Navarra. Facultad / Escuela: Facultad de Farmacia. Directoras: Iolai Astiasarán y Diana Ansoarena. Fecha prevista: Junio 2013.
- Proyectos Fin de Máster**
- Iraia Olibo Leona. "Antioxidant capacity of vegetable by-products". Dirigido por: Iolai Astiasarán y Diana Ansoarena. Trabajo de fin de Máster Europeo en Alimentación, Nutrición y Metabolismo (EMENU). Fecha: Septiembre 2012.

**DATOS DE CONTACTO**

Grupo UNAV - Investigador Principal en la Universidad de Navarra: **Dra. Iolai Astiasarán Anchia** (astiasa@unav.es)  
**Dra. Diana Ansoarena Artieda** (ansoarena@unav.es)  
**Dr. Iñigo Navarro Blasco** (inavarro@unav.es)  
 Mikel Garcia Itague de Chiteno (michelgarcia@alumni.unav.es)  
 Izaekun Berasategi Zabalza (iberasategi@alumni.unav.es)  
 Candelaria Poyato Alredo (cpoyato@alumni.unav.es)

Grupo AINIA  
**Dra. Blanca Viadel** (bviadel@ainia.es)  
**Dra. M<sup>te</sup> Teresa Navarro** (mnavarro@ainia.es)



## SUBPROYECTO NITRARED. ACCION 7: Análisis sensorial de jamón de corta y de larga curación con distintos niveles de nitratos y nitritos (IV parte)

María Lorente, María José Sánchez y Beatriz Villegas  
Consumolab (Laboratorio de Análisis Sensorial de ainia centro tecnológico). Parque Tecnológico de Valencia. Paterna, 46980, Valencia.  
e-mail: bvillegas@consumolab.es www.ainia.es

### material y métodos

#### muestras

|   |
|---|
| Tratamiento 5: Nivel elevado Nitratos (600 ppm iniciales)                       |
| Tratamiento 6: Nivel bajo Nitratos (150 ppm iniciales)                          |
| Tratamiento 7: Nivel elevado Nitratos y Nitritos (600 ppm iniciales)            |
| Tratamiento 8: Nivel bajo Nitratos y Nitritos (150 ppm iniciales)               |
| Tratamiento 9: Nivel elevado Nitratos y Nitritos (600 ppm ini) + ASC. (500 ppm) |

#### análisis sensorial

##### evaluación

los atributos del perfil previamente establecido fueron cuantificados individualmente por cada uno de los catadores en una escala lineal estructurada de 15 cm (0 ausencia del atributo-10 máxima intensidad del atributo). La evaluación fue realizada por duplicado, de acuerdo a un diseño balanceado de bloques completos.

#### análisis estadístico

##### funcionamiento del panel

- anova 3 factores (tratamiento, catador y réplica) con interacciones dobles fue realizado para verificar la adecuada capacidad discriminativa, reproducibilidad y concordancia del panel.
- anova 2 factores (tratamiento y réplica) fue realizado para verificar la adecuada capacidad discriminativa y reproducibilidad de cada catador.

##### diferencias entre lotes

anova 3 factores (tratamiento, catador y animal) e interacciones dobles fue realizado para determinar si los tratamientos son diferentes. Test de Duncan para identificar los tratamientos diferentes ( $\alpha \leq 0,05$ ).

Los valores de la tabla resaltados en naranja indican diferencias significativas en las características sensoriales debidas a la diferente concentración de agentes nitrificantes. Para el resto de características en que el tratamiento resultó significativo se observó una interacción significativa del tratamiento y el animal.

En general, tanto el jamón de corta como de larga curación presentaron pocas y pequeñas diferencias significativas en sus características sensoriales. En el caso del jamón de corta curación las pequeñas diferencias se observaron fundamentalmente en características de aspecto, mientras que para el de larga curación, las diferencias se observaron en características de olor, sabor y textura.

#### jamón corta curación: comparación tratamientos 5 y 7



Los perfiles sensoriales de jamón con alto nitrato y alto nitrato y nitrito fueron similares. El jamón con tratamiento de alta concentración de nitrato y nitrito presentó mayor intensidad de color y menor acortezamiento e intensidad de olor animal que el jamón con tratamiento de alta concentración de nitrato.

#### jamón larga curación: comparación tratamientos 7 y 8



Los perfiles sensoriales de jamón con bajo y alto nitrato y nitrito fueron similares. El jamón con tratamiento de alta concentración de nitrato y nitrito presentó mayor intensidad de olor añejo y sabor curado que el jamón de baja concentración de nitrato y nitrito.

Nota: se han elegido para ilustrar los resultados las dos comparaciones que más y/o mayores diferencias han presentado entre sus características sensoriales.

### resultados

Tabla 1. Valor F del tratamiento del ANOVA 3 factores (tratamiento, catador y animal) e interacciones dobles para cada pareja de tratamientos comparadas. (a) jamón corta curación; (b) jamón larga curación.

#### (a) jamón corta curación

| Atributo              | 5/6       | 5/7      | 6/8       | 7/8       | 7/9        |
|-----------------------|-----------|----------|-----------|-----------|------------|
| Intensidad de color   | 53.035*** | 16.042** | 0.099     | 1.855     | 10.802**   |
| Homogeneidad de color | 21.859*** | 1.925    | 28.291*** | 0.146     | 0.021      |
| Halo de nitrificación | 18.813*** | 0.186*   | 21.580*** | 0.354     | 3.962*     |
| Oxidación externa     | 14.496*** | 5.242**  | 0.522     | 7.388**   | 114.979*** |
| Acortezamiento        | 4.996*    | 8.537**  | 6.266*    | 8.775**   | 9.138**    |
| Int. Olor global      | 2.277     | 1.600    | 1.824     | 1.827     | 4.500*     |
| Olor curado           | 0.139     | 3.471    | 3.020     | 0.325     | 16.687***  |
| Olor frutal           | 0.004     | 1.714    | 3.496     | 1.562     | 0.112      |
| Olor floral           | 58.424*** | 1.107    | 0.007     | 0.053     | 1.503      |
| Olor rancio           | 2.842     | 0.248    | 5.565*    | 0.441     | 41.834***  |
| Olor animal           | 1.273     | 4.590*   | 16.839*** | 0.246     | 2.789      |
| Olor escatol          | 3.228     | 0.842    | 0.633     | 0.115     | 3.578      |
| Int. Sabor global     | 0.177     | 0.214    | 1.372     | 9.653**   | 2.718      |
| Sabor asado           | 2.169     | 0.532    | 1.577     | 10.577**  | 0.016      |
| Sabor dulce           | 0.355     | 0.583    | 0.095     | 1.185     | 0.093      |
| Sabor salado          | 0.559     | 2.670    | 10.690    | 0.014     | 13.348     |
| Sabor metálico        | 0.524     | 3.466    | 1.755     | 23.506*** | 2.053      |
| Sabor rancio          | 9.962**   | 3.172    | 1.432     | 2.145     | 45.226***  |
| Sabor animal          | 0.231     | 2.702    | 11.049*** | 4.578*    | 0.257      |
| Sensación picante     | 1.999     | 0.192    | 0.003     | 0.038     | 6.741*     |
| Dureza                | 11.716**  | 1.547    | 6.165*    | 0.297     | 0.795      |
| Pastosidad            | 2.315     | 6.233*   | 6.584*    | 3.750     | 0.078      |

#### (b) jamón larga curación

| Atributo              | 5/6       | 5/7       | 6/8        | 7/8       | 7/9       |
|-----------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| Intensidad de color   | 15.149*** | 0.080     | 11.599**   | 4.936*    | 14.383*** |
| Homogeneidad de color | 0.015     | 2.680     | 5.825*     | 30.356*** | 1.279     |
| Halo de nitrificación | 6.209*    | 72.966*** | 465.944*** | 27.021*** | 7.139**   |
| Oxidación externa     | 2.383     | 0.853     | 15.153***  | 30.567*** | 31.442*** |
| Acortezamiento        | 0.776     | 0.458     | 6.134*     | 65.831*** | 7.592**   |
| Int. Olor global      | 1.816     | 0.249     | 1.419      | 0.964     | 0.296     |
| Olor frutal           | 3.406     | 9.456**   | 0.031      | 0.005     | 0.085     |
| Olor añejo            | 0.003     | 17.623**  | 1.153      | 12.918**  | 0.968     |
| Olor animal           | 12.142**  | 3.185     | 0.319      | 1.630     | 0.005     |
| Olor rancio           | 4.897*    | 3.810     | 1.429      | 1.472     | 1.590     |
| Int. Sabor global     | 1.213     | 0.044     | 0.001      | 0.001     | 5.566*    |
| Sabor asado           | 1.587     | 9.063**   | 0.796      | 0.547     | 12.982**  |
| Sabor dulce           | 2.218     | 0.825     | 3.743      | 0.001     | 2.331     |
| Sabor curado          | 0.236     | 14.498*** | 1.759      | 16.417*** | 3.108     |
| Sabor metálico        | 3.701     | 19.469*** | 1.442      | 7.963*    | 3.420     |
| Sabor rancio          | 0.286     | 0.036     | 4.761*     | 13.553*** | 1.436     |
| Sensación picante     | 0.004     | 0.224     | 0.711      | 0.977     | 0.579     |
| Dureza                | 0.004     | 0.551     | 0.347      | 24.585*** | 14.092**  |
| Pastosidad            | 1.053     | 15.961*** | 0.545      | 6.801*    | 10.646**  |

\*significativo (p<0.05); \*\*significativo (p<0.01); \*\*\*significativo (p<0.001).

### conclusiones:

En general, las reducciones aplicadas en la concentración tanto de nitratos como de nitratos y nitritos o la adición de ascorbato en jamón de corta y de larga curación aportaron pequeñas diferencias solamente en algunas de las características sensoriales en las comparaciones estudiadas. Las pequeñas diferencias se observaron fundamentalmente en características de aspecto en jamón de corta curación, mientras que para el jamón de larga curación las diferencias se observaron en características de olor, sabor y textura.



CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS

## Evolución de los nitrosopigmentos durante la maduración de chorizos con diferentes niveles de sales nitrificantes



NITRARED  
Acción 3.1

Carballo, J. y Andrade, S.  
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) (CSIC)  
José Antonio Novais s/n, 28040, Madrid

### INTRODUCCION Y OBJETIVO

Los nitratos y nitritos se incorporan a los productos cárnicos con fines higiénico-sanitarios (inhibición de microorganismos) y tecnológicos (desarrollo del color, aroma, sabor, etc.), sin embargo sus niveles de utilización se están cuestionando al dar lugar a la formación de nitrosaminas, sustancias carcinogénicas.

El objetivo de este trabajo es estudiar la evolución del proceso de nitrosación en la formación del color, mediante el estudio de los hemo pigmentos totales y nitroso hemo pigmentos, durante el proceso de maduración de chorizos elaborados con diferentes niveles de sales nitrificantes.

### MATERIALES Y METODOS

Los chorizos fueron elaborados en el IRTA, con diferentes niveles de sales nitrificantes (Tabla 1). Se realizaron a lo largo de la maduración cuatro controles: control inicial (día 0), durante la fermentación (día 3), a mitad del proceso de curado (día 14) y al final de la curación (día 27).

La determinación de los hemo pigmentos totales (PT) y de los nitroso hemo pigmentos (NHP) se realizó empleando el procedimiento de Hornsey (1956) y Zaika et al. (1976).

El porcentaje de conversión fue calculado como la proporción de nitroso hemo pigmentos en relación con los hemo pigmentos totales (NHP/PT) e indican la intensidad de nitrosación desarrollada durante el proceso de maduración.

Tabla 1. Niveles de sales nitrificantes empleadas en los diferentes chorizos elaborados

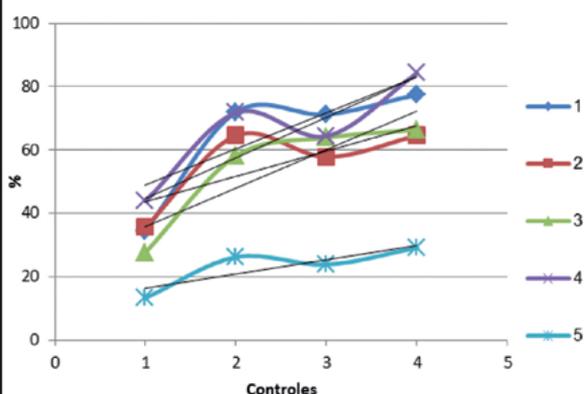
|         |   |
|---------|---|
| Lote 1: | 150 ppm nitrato + 150 ppm nitrito                               |
| Lote 2: | Reducción al 75 %   |
| Lote 3: | Reducción 50 %  |
| Lote 4: | 150 ppm nitrato + 150 ppm nitrito + 500 ppm de ascorbato sódico |
| Lote 5: | control, sin nitratos ni nitritos añadidos                      |

Figura 1. Evolución de los pigmentos totales (PT), nitroso hemo pigmentos (NHP) y el porcentaje de conversión (NHP/PT) en los chorizos en función del período de maduración y su composición.

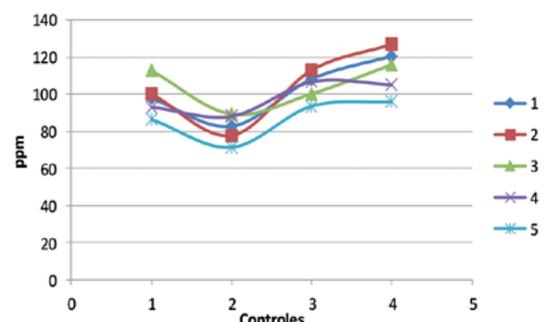
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- La formación de nitroso hemo pigmentos aumenta a lo largo del período de curación, siendo más elevados en las muestras con mayor nivel de sales nitrificantes.
- La proporción de nitroso hemo pigmentos en relación con los hemo pigmentos totales (NHP/PT) aumentan durante el proceso de curación, lo que indica una mayor intensidad en el color, siendo más elevados en las muestras con mayores niveles de sales nitrificantes (Lotes 1 y 4). Este incremento es mayor en la primera fase del proceso, sin embargo la reducción de los niveles de nitratos y nitritos no supone una disminución proporcional en este parámetro.

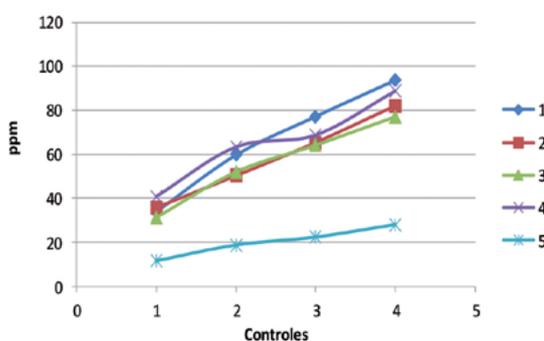
Porcentaje de Conversión (NHP/PT x 100)



Pigmentos Totales (PT)



Nitroso hemo pigmentos (NHP)



### BIBLIOGRAFIA

Hornsey, H. C. (1956). J. Sci. Food Agric. 7, 534.

Zaika, L.L., Zell, T. E., Smith, J. L. Palumbo, S. A. y Kissinger, J. C. (1976). J. Food Sci., 41, 1457-1460.



Subproyecto NITRARED  
Acción 6

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRIFICANTES EN LA MICROBIOLOGÍA DE LOS EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS.  
CHALLENGE TEST CON *Salmonella* Typhimurium



Hospital, X.F., Hierro, E. y Fernández, M.

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

**INTRODUCCIÓN**  
*Salmonella* Typhimurium es el serovar de *Salmonella* spp. predominante en la carne de cerdo, cuyo consumo sería responsable de entre un 10 y un 20% de los casos de salmonelosis que se detectan en la UE<sup>(1,2)</sup>. Aunque los embutidos crudos curados son alimentos estables y seguros gracias a su formulación, pH y a<sub>w</sub>, en la bibliografía se describen numerosos casos de salmonelosis originados por el consumo de embutidos insuficientemente fermentados o cuya materia prima contenía niveles excesivamente altos de microorganismos<sup>(2)</sup>. En este sentido, por ejemplo en EEUU se ha descrito una prevalencia de *Salmonella* spp. en estos productos de un 1,4%<sup>(3)</sup>. Entre los ingredientes de los embutidos que presentan actividad antimicrobiana se encuentran los nitratos y nitritos, aunque su efecto sobre *Salmonella* spp. es controvertido.

**OBJETIVO**  
El objetivo de este trabajo es determinar la supervivencia de *Salmonella* Typhimurium en salchichones inoculados y elaborados con diferentes concentraciones de nitrificantes a lo largo del proceso de maduración y durante el almacenamiento.

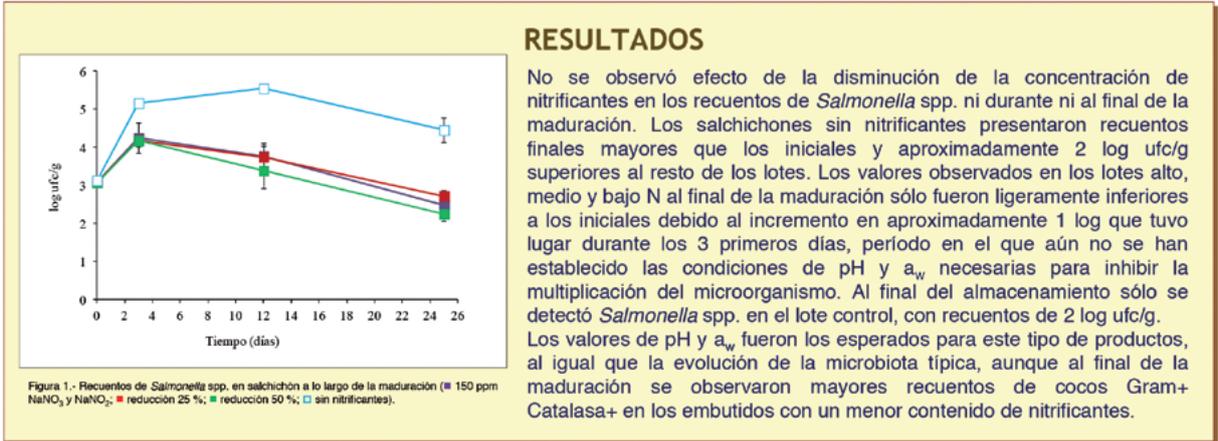


Figura 1.- Recuentos de *Salmonella* spp. en salchichón a lo largo de la maduración (■ 150 ppm NaNO<sub>3</sub> y NaNO<sub>2</sub>; ■ reducción 25%; ■ reducción 50%; □ sin nitrificantes).

**BIBLIOGRAFÍA**

1. European Food Safety Authority (2008). EFSA J. 135, 1-111.
2. European Food Safety Authority (2010). EFSA J. 8(4), 1547.
3. Levine, P.B., Rose, B., Green, S., Ransom, G., Hill, W. (2001). J. Food Prot. 64, 1188-1193.
4. Parlamento Europeo (2006). Directiva Europea 2006/52/EC. DOCE, L204, 10-22.

**AGRADECIMIENTOS**  
Este trabajo se ha llevado a cabo como parte de las actividades del Proyecto Consolider-Ingenio 2010-CARNISENUSA (Ref. CSD 2007-00016) (Ministerio de Educación y Ciencia).

## Efecto del pH en la difusión del nitrito de sodio en carne de cerdo

Gómez, J., Clemente, G., Sanjuán, N.

Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios (ASPA), Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia



### INTRODUCCIÓN

Los nitritos se utilizan como sales de curado en el proceso tradicional de elaboración de productos crudos-curados. Factores como el pH afectan a la penetración de estas sales en la carne, influenciando así los fenómenos difusivos que ocurren durante dicho proceso.

**Objetivo:** Investigar el efecto del pH de la carne en la difusión de nitrito sódico ( $\text{NaNO}_2$ ) en el músculo *Semimembranosus* de la pierna del cerdo.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Condiciones Experimentales:

Materia prima: músculos *Semimembranosus*, seleccionados a diferente pH, 5.5, 5.9 y 6.2

Geometría: cilíndrica, 12 muestras de 8.4 cm de longitud y 2.4 cm de diámetro

Temperatura de curado: 4°C

Agente de curado: salmuera saturada de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ )

Tipo de salado: inmersión (figura 1)

Tiempo de curado: 5 días



Figura 1. Cilindros inmersos en salmuera

#### Cinética experimental de difusión de nitrito

- Cada cierto tiempo, se retiraba un cilindro de la salmuera.
- Al sacar cada cilindro de la salmuera, este se pesó y mediante un sacabocados de 1,2 cm de diámetro se obtuvo la parte interna (I) y parte externa (E) de cada cilindro (figura 2).
- Se obtuvieron extractos de cada sección
- El contenido de nitrito en los extractos se determinó aplicando un método espectrofotométrico (AOAC, 2000).

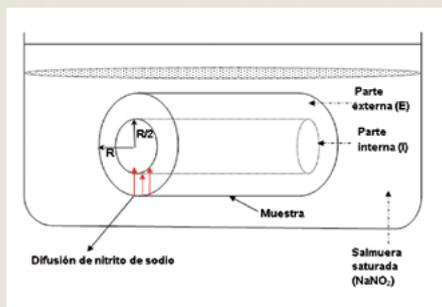


Figura 2. Esquema de las partes en las que se dividieron los cilindros de carne para analizar su contenido en nitritos.

#### Modelización:

$$\text{Ecuación 1. Centro} \quad \frac{\bar{C} - C_e}{C_0 - C_e} = 8 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{e^{-D_e \lambda n^2 t}}{(\lambda n R)^2 J_1(\lambda n R)} J_1\left(\lambda n \frac{R}{2}\right)$$

$$\text{Ecuación 2. Anillo} \quad \frac{\bar{C} - C_e}{C_0 - C_e} = \frac{16}{3} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{e^{-D_e \lambda n^2 t}}{(\lambda n R)^2 J_1(\lambda n R)} \left[ J_1(\lambda n R) - J_1\left(\lambda n \frac{R}{2}\right) \right]$$

### RESULTADOS

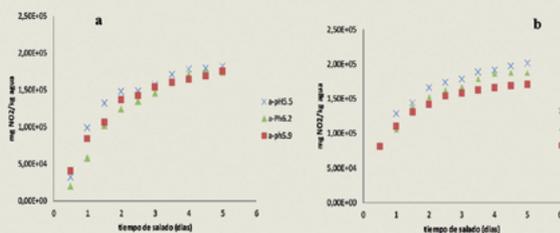


Figura 3. Concentración de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) (a) en el interior (b) en la sección exterior de los cilindros, a diferente pH (5,5; 5,9 y 6,2) y durante el tiempo de salado.

La concentración de nitritos aumentó al incrementar el tiempo de curado. En la sección interna se observaron diferencias en el contenido de nitritos con el cambio de pH solo durante los primeros dos días de salado, siendo mayor el contenido a pH de 5,5 y 5,9.

La concentración en la parte interna fue menor que en la externa. Se observaron diferencias en el contenido de nitritos para la parte externa de los cilindros con el cambio de pH de la carne, siendo mayor el contenido de nitritos a pH de 5,5. La ganancia de nitritos en la parte exterior de los cilindros a diferente pH se observa mejor a partir del primer día de salado.

En la tabla 1 se muestran los valores de la difusividad efectiva de  $\text{NO}_2$  en el músculo *Semimembranosus* obtenidos a diferente pH y a partir de la aplicación de las ecuaciones 1 y 2. En dicha tabla se puede observar que, al aumentar el pH de los cilindros para un mismo tiempo de proceso, se disminuyen los coeficientes de difusividad efectiva de  $\text{NO}_2$ .

Tabla 1. Coeficiente de difusión efectiva de  $\text{NO}_2$  en músculo *Semimembranosus*.

| pH  | $D_e \text{ (m}^2\text{/s)} \times 10^{10}$ ,<br>Difusión de $\text{NO}_2$ |
|-----|--|
| 5,5 | 1,51   |
| 5,9 | 1,13   |
| 6,2 | 1,09   |

### CONCLUSIONES

El incremento de la concentración de  $\text{NO}_2$  fue mayor para las zonas en contacto con la salmuera saturada que para las zonas internas. Además éste tiende a ser rápido al inicio de salado, mientras que, al aumentar el tiempo de inmersión tiende a ser constante.

Los resultados obtenidos muestran el efecto del pH en la cinética de la difusión de los nitritos en el músculo *Semimembranosus*, de manera que se produce un mayor aumento de la difusividad en los músculos con la disminución del pH.

Reunión anual Proyecto CONSOLIDER – Ingeniería 2011  
CARNISENUSA (CSD2007-00016). Subproyecto NITRARED

# NITRARED: Acción 3.2.

## Formación y estabilidad del color característico de los productos curados.

Pedro Marquina, Alberto Lorés, Teresa Pérez y Pedro Roncalés  
Producción Animal y Ciencia de los Alimentos / Facultad de Veterinaria / Universidad de Zaragoza



### Evolución del color durante la conservación de jamones de larga curación

#### Introducción y objetivo

La conservación del color de curado es de máxima importancia a la hora de la evaluación de la calidad de los productos curados y va a depender de las condiciones de elaboración y conservación a las que se sometan. El objetivo que se planteó en el estudio fue monitorizar la evolución del color de curado en jamón de larga curación elaborado con distintas formulaciones de nitritos, nitratos y ascorbato, durante su conservación en refrigeración tanto en condiciones de iluminación como en ausencia de la misma. De esta forma se determinó la formulación de nitrificantes más adecuada para conseguir un óptimo color de curado durante y al final del periodo de almacenamiento.

#### Materiales y métodos

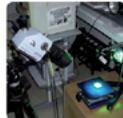
**Muestras elaboradas en IRTA**

- Tratamiento 5**  
\*250 ppm nitrato residual
- Tratamiento 6**  
\*125 ppm nitrato residual
- Tratamiento 7**  
\*250 ppm nitrato residual  
\*100 ppm nitrito residual
- Tratamiento 8**  
\*125 ppm nitrato residual  
\*50 ppm nitrito residual
- Tratamiento 9**  
\*250 ppm nitrato residual  
\*100 ppm nitrito residual  
\*500 ppm ascorbato sódico

**Envasado**  
Lonchas de 5 cm de grosor.  
Film de poliamida (20 µm) y polietileno (80 µm), con una permeabilidad al oxígeno de 40-50 cm<sup>3</sup>m<sup>2</sup>/24h, y una permeabilidad al vapor de agua de 5-7 g/m<sup>2</sup>/24h.  
Envasado al vacío.

**Conservación**  
Temperaturas:  
+4 °C  
+20 °C  
Iluminación  
\*1400 luxes -14 horas 6 días semana  
\*Siempre en oscuridad

#### Medida del color instrumental



**Espectroradiómetro:**  
\*Modelo IS CAS 140  
\*Sonda TOP 100

**Espectrofotómetro:**  
\*Minolta CM-2002

**Obtención de:**  
\*Espectros de reflectancia de 400 a 700 nm  
\*Valores CIE (1976) L\*, a\*, b\*

Índice de curado (I<sub>c</sub>): Obtenidos de la información aportada por los espectros.

$$I_{curado} = I_{nitrosación} - I_{descoloración}$$

$$I_{nitrosación} = \frac{R_{500}(T)}{R_{600}(T)} \quad I_{descoloración} = \frac{R_{600}(T)}{R_{700}(T)}$$

Valores CIE (1976) L\*, a\* y b\*: Luminosidad (L\*), índice de rojo-verde (a\*) e índice amarillo-azul (b\*)



Índice a\*/b\*: Pardeamiento del rojo

#### Resultados y discusión

Tabla 1.- Parámetros de color y curado en jamones terminados.

|                     | Trat 5  | Trat 6  | Trat 7  | Trat 8  | Trat 9   | Sig. |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|----------|------|
| L*                  | 29,47a  | 30,68b  | 30,83b  | 29,98ab | 30,49b   | **   |
| a*                  | 13,35a  | 13,29a  | 14,04bc | 13,68ab | 14,33c   | ***  |
| b*                  | 9,64a   | 10,09ab | 10,80c  | 9,62a   | 10,36bc  | ***  |
| C*                  | 16,58a  | 16,60a  | 17,82b  | 16,94a  | 17,73b   | ***  |
| h*                  | 32,27ab | 36,78ac | 37,16c  | 34,57b  | 35,67abc | ***  |
| Índice nitrosación  | 0,94b   | 0,91a   | 0,99c   | 0,93b   | 0,97c    | ***  |
| Índice decoloración | 0,37a   | 0,40b   | 0,36b   | 0,36b   | 0,36b    | ***  |
| Índice curado       | 0,56a   | 0,51b   | 0,62c   | 0,57a   | 0,62c    | ***  |

Tras finalizar el periodo de curación, el tratamiento 6 (con la menor cantidad de nitritos) presentó índices de curado más bajos que el resto de tratamientos. Los tratamientos intermedios (5 y 8) mostraron índices de curado con valores medios, mientras que los tratamientos con mayor cantidad de nitrificantes, tanto con como sin ascorbato (7 y 9) presentaron los índices de curado más altos.

Tabla 2.- Comparación pareada de tratamientos.

|                     | Tratamiento 5 y 7            | Tratamiento 5 y 8            | Tratamiento 5 y 9            | Tratamiento 7 y 8            | Tratamiento 7 y 9            |
|---------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| L*                  | Medio 2,3138<br>Medio 2,3013 | Medio 2,3735<br>Medio 2,3043 | Medio 2,3038<br>Medio 2,2809 | Medio 2,3033<br>Medio 2,3154 | Medio 2,2640<br>Medio 2,2640 |
| a*                  | Medio 2,1139<br>Medio 2,1139 | Medio 2,1591<br>Medio 2,1591 | Medio 2,1529<br>Medio 2,1529 | Medio 2,1417<br>Medio 2,1430 | Medio 2,1430<br>Medio 2,1430 |
| b*                  | Medio 2,1038<br>Medio 2,1037 | Medio 2,1038<br>Medio 2,1037 | Medio 2,1037<br>Medio 2,1037 | Medio 2,1037<br>Medio 2,1037 | Medio 2,1037<br>Medio 2,1037 |
| C*                  | Medio 2,1037<br>Medio 2,1037 |
| h*                  | Medio 2,1037<br>Medio 2,1037 |
| Índice nitrosación  | Medio 2,1037<br>Medio 2,1037 |
| Índice decoloración | Medio 2,1037<br>Medio 2,1037 |
| Índice curado       | Medio 2,1037<br>Medio 2,1037 |

En el experimento pareado, comparación de tratamientos dentro con muestras procedentes del mismo cerdo y por tanto, idéntica materia prima, se obtuvieron los siguientes resultados:  
 • En la comparación de los tratamientos 5 y 7 se encontró un efecto significativo en la iluminación, que fue inferior en presencia de nitro y en la brillantez roja, que fue más intensa cuando hay nitro. Los índices de nitrosación y de curado son mayores en presencia de nitro.  
 • Al comparar los tratamientos 5 y 8 se obtuvo diferencia significativa en todos los parámetros de color medidos, dando valores más altos con menos contenido de nitrito, a excepción de los índices de extracción y de curado que dieron valores más bajos con la concentración baja de nitrito.  
 • Con los tratamientos 6 y 8, resultaron significativos la luminosidad y b\* que fueron menores en presencia de nitro. El índice de decoloración fue más bajo con nitro, mientras que el de curado fue más alto.  
 • Con 7 y 8, solo resultaron significativos los índices de nitrosación y de curado, que fueron mayores con concentraciones bajas de nitrito y nitro.  
 • Finalmente, al comparar 7 y 9 la luminosidad fue menor estando se usaba ascorbato mientras que la brillantez roja se incrementa. El índice de decoloración también fue menor en presencia de ascorbato.

La evolución del color del jamón durante su conservación fue la siguiente: Los parámetros L\* y a\* subieron a lo largo de todo el periodo, mientras que b\*, C\* y h\* se mantuvieron subiendo ligeramente al final.  
 Los índices considerados presentaron un comportamiento similar, manteniendo sus valores durante la conservación y subiendo ligeramente al final en oscuridad. En cambio, en condiciones de iluminación los valores bajaron hacia el final del periodo considerado.  
 El tratamiento con menor cantidad de nitrificantes presentó valores significativamente más bajos que el resto de tratamientos durante toda la conservación, siendo esta diferencia más acusada en iluminación.  
 En la zona con velo, que apareció al mes y medio de iniciar la conservación, ocurren los mismos cambios, pero las diferencias entre tratamientos están enmascaradas por la presencia del velo.

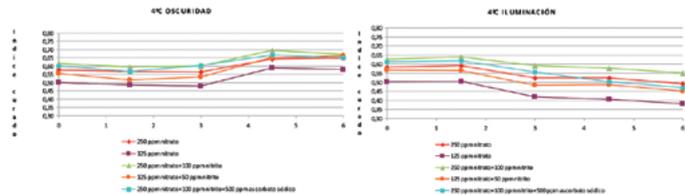


Figura 1.- Evolución del Índice de Curado en oscuridad.

Figura 2.- Evolución del Índice de Curado en iluminación.



#### Conclusiones

El índice de curado es el parámetro que más discrimina entre tratamientos al comparar jamones procedentes de un mismo cerdo. Los índices de nitrosación y de decoloración también discriminan bien.  
 Tras finalizar el periodo de curado, el índice de curado fue más bajo cuanto menor era la cantidad de nitritos, aumentando al incrementar la cantidad de nitrificantes.  
 Durante el periodo de conservación, el tratamiento con menos cantidad de nitritos presentó un índice de decoloración más alto y un índice de curado más bajo que el resto de tratamientos en cada uno de los puntos analizados durante el almacenamiento en refrigeración tanto en condiciones de iluminación como en oscuridad.  
 Estas diferencias, aun siendo estadísticamente significativas, eran poco apreciables a simple vista. Por ello, todos los tratamientos podrían ser utilizados sin merma de su calidad visual.



## SUBPROYECTO NITRARED. ACCION 7: Análisis sensorial de productos cárnicos curados con distintos niveles de nitratos y nitritos (partes I-IV)

María Lorente, María José Sánchez y Beatriz Villegas  
Consumolab (Laboratorio de Análisis Sensorial de ainia centro tecnológico). Parque Tecnológico de Valencia. Paterna, 46980, Valencia.  
e-mail: bvillegas@consumolab.es www.ainia.es

### embutidos crudo-curados

#### muestras

|   |
|---|
| Lote 1: 150 ppm nitrato + 150 ppm nitrito               |
| Lote 2: Reducción al 75 %                               |
| Lote 3: Reducción al 50 %                               |
| Lote 4: Lote 1 + 500 ppm de Ascorbato sódico            |
| Lote 5: Control (sin nitrificantes ni ascorbato sódico) |

#### análisis sensorial

- panel de 8 catadores entrenados (ainia)
- perfil sensorial de fuet, salchichón y chorizo
- cuantificación individual de atributos mediante escala lineal (0-10)
- evaluación por duplicado

#### análisis estadístico

- *funcionamiento del panel (datos de cada fabricación):* capacidad discriminativa, reproducibilidad y concordancia del panel capacidad discriminativa y reproducibilidad de cada catador
- *diferencias entre lotes (datos totales):* anova 3 factores (lote, fabricación y catador) e interacciones dobles. Test de Duncan ( $\alpha \leq 0,05$ )

lote 5 excluido del tratamiento estadístico (sólo dos fabricaciones)

### resultados: perfiles sensoriales

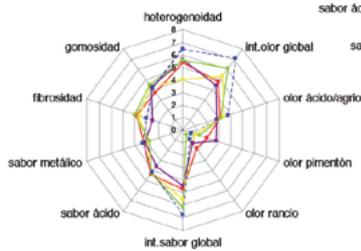
#### fuet



#### salchichón



#### chorizo



Atributos subrayados en naranja indican diferencias significativas en las características sensoriales debidas a la diferente concentración de agentes nitrificantes.

### conclusiones:

Desde un punto de vista sensorial no parece necesario el uso de la concentración máxima permitida en la actualidad (CMP) dado que muestras de los embutidos en estudio con una reducción de 50% de nitratos y nitritos presentaron características sensoriales similares a aquellas con la máxima concentración de nitratos y nitritos. Sin embargo, la reducción total de nitrificantes, provocó el desarrollo de notas desagradables, siendo por tanto esta reducción no viable.

### jamones de corta y larga curación

#### muestras

|   |
|---|
| Tratamiento 5: Nivel elevado Nitratos (600 ppm iniciales)                       |
| Tratamiento 6: Nivel bajo Nitratos (150 ppm iniciales)                          |
| Tratamiento 7: Nivel elevado Nitratos y Nitritos (600 ppm iniciales)            |
| Tratamiento 8: Nivel bajo Nitratos y Nitritos (150 ppm iniciales)               |
| Tratamiento 9: Nivel elevado Nitratos y Nitritos (600 ppm ini) + ASC. (500 ppm) |

#### análisis sensorial

- panel de 12 y 10 catadores entrenados (ainia) (jamón corta y larga curación respectivamente)
- perfil sensorial de jamón de corta y larga curación
- cuantificación individual de atributos mediante escala lineal (0-10)
- evaluación por duplicado

#### análisis estadístico

- *funcionamiento del panel (datos de cada fabricación):* capacidad discriminativa, reproducibilidad y concordancia del panel capacidad discriminativa y reproducibilidad de cada catador
- *diferencias entre lotes (datos totales):* anova 3 factores (lote, fabricación y catador) e interacciones dobles. Test de Duncan ( $\alpha \leq 0,05$ )

### resultados: perfiles sensoriales

#### jamón corta curación: comparación tratamientos 5 y 7



#### jamón larga curación: comparación tratamientos 7 y 8



Atributos subrayados en naranja indican diferencias significativas en las características sensoriales debidas a la diferente concentración de agentes nitrificantes.

Nota: se han elegido para ilustrar los resultados las dos comparaciones que más y/o mayores diferencias han presentado entre sus características sensoriales.

### conclusiones:

En general, las reducciones aplicadas en la concentración tanto de nitratos como de nitritos o la adición de ascorbato en jamón de corta y de larga curación aportaron pequeñas diferencias solamente en algunas de las características sensoriales en las comparaciones estudiadas. Por lo tanto, los resultados sugieren que la reducción de nitrificantes en jamón resultaría viable desde el punto de vista sensorial, si bien sería conveniente continuar con la investigación.



## Comparación en la formación de nitrosopigmentos en jamones de corta y larga curación elaborados con diferentes niveles de sales nitrificantes



Carballo, J. y Andrade, S.  
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) (CSIC)

NITRARED  
Acción 3.1

### INTRODUCCION Y OBJETIVO

La formación del color típico de los productos curados es importante para determinar su calidad. Entre otros factores, su desarrollo va a depender de la incorporación de sales nitrificantes y antioxidantes. La reducción de estas sales en los productos cárnicos está tomando gran relevancia desde el punto de vista sanitario al estar relacionadas con la formación de nitrosaminas, sustancias con elevado poder cancerígeno y mutagénico.

El presente trabajo comparó la formación del color (intensidad de nitrosación), mediante la determinación de los pigmentos totales y los nitroso-pigmentos, en jamones de corta y larga curación elaborados con diferentes niveles de sales nitrificantes.

### MATERIALES Y METODOS

Los jamones de corta curación (10 meses) y larga curación (18 meses) fueron elaborados en el Institut de Recerca y Tecnologia Agroalimentàries (IRTA-Monells), con diferentes niveles de sales nitrificantes (Tabla 1).

La determinación de los hemo pigmentos totales (PT) y de los nitroso hemo pigmentos (NHP) se realizó en los músculos *biceps femoris* (BF) y *semimembranosus* (SM) empleando el procedimiento de Hornsey (1956) y Zaika et al. (1976). El porcentaje de conversión fue calculado como el porcentaje de nitroso hemo pigmentos en relación con los hemo pigmentos totales (NHP/PT) e indican la "intensidad de nitrosación" desarrollada durante el proceso de curado.

Tabla 1. Niveles de sales nitrificantes empleadas en los diferentes lotes de jamones elaborados

Lote 1 - 600 ppm Nitrato  
Lote 2 - 150ppm Nitrato  
Lote 3 - 600 ppm Nitrato + 600 ppm Nitrito  
Lote 4 - 150 ppm Nitrato + 150 ppm Nitrito  
Lote 5 - 600 ppm nitrato + 600 ppm Nitrito + 500 ppm Ascorbato

Tablas 2A y 2B.- Comparativa de la "intensidad de nitrosación" (porcentaje de nitroso hemo pigmentos en relación con los hemo pigmentos totales) en jamones con distintos niveles de sales nitrificantes (Tabla 1), diferentes períodos de curación (corta y larga) y en función del músculo, *biceps femoris* (BF) o *semimembranosus* (SM).

2A

| Muestras | SM             |                | BF             |                |
|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|          | Corta Curación | Larga Curación | Corta Curación | Larga Curación |
| Lote 1   | 82,4 → 85,6    | 74,1 → 76,6    |                |                |
| Lote 2   | 64,8 → 61,5    | 60,9 → 63,8    |                |                |
| Lote 3   | 83,1           | 91,4           | 73,9           | 80,9           |
| Lote 4   | 71,1           | 65,8           | 65,5           | 60,7           |
| Lote 5   | 79,1           | 87,1           | 74,4           | 78,4           |

2B

| Muestras | SM             |                | BF             |                |
|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|          | Corta Curación | Larga Curación | Corta Curación | Larga Curación |
| Lote 1   | 82,4           | 85,6           | 74,1           | 76,6           |
| Lote 2   | 64,8           | 61,5           | 60,9           | 63,8           |
| Lote 3   | 83,1           | 91,4           | 73,9           | 80,9           |
| Lote 4   | 71,1           | 65,8           | 65,5           | 60,7           |
| Lote 5   | 79,1           | 87,1           | 74,4           | 78,4           |

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observan **niveles de nitrosación similares** en los jamones en función del **período de curación (corta o larga)**, con independencia del músculo estudiado (BF o SM) o de los distintos niveles de sales nitrificantes empleadas (Tabla 2A →).

Se encuentran **diferencias** en los niveles de nitrosación en función de:

- los **niveles de sales nitrificantes empleados**: la intensidad de nitrosación es más alta cuanto mayores son las sales nitrificantes empleadas (Lotes 1, 3 y 5)(Tabla 2B ↺). Sin embargo no se observan diferencias entre que las sales empleadas sean nitratos, nitritos o que en la formulación se halla incorporado ascorbato.
- el **músculo estudiado**, siendo estos niveles más elevados en el *semimembranosus* (SM) que en el *biceps femoris* (BF) (Tabla 2B ↻).

### BIBLIOGRAFIA

Hornsey, H. C. (1956). J. Sci. Food Agric. 7, 534.  
Zaika, L.L., Zell, T. E., Smith, J. L. Palumbo, S. A. y Kissinger, J. C. (1976). J. Food Sci., 41, 1457-1460

Monells, Septiembre 2013



## Modificación de los nitratos y los nitritos durante la maduración de fuets elaborados con diferentes niveles de sales nitrificantes

Carballo, J. y Andrade, S.  
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) (CSIC)



NITRARED  
Acción 3.1

### INTRODUCCION Y OBJETIVO

La incorporación de los nitratos y nitritos en los productos cárnicos tiene varios objetivos: por una parte evitar su deterioro y la aparición de microorganismos patógenos y por otra favorecer las características sensoriales típicas de estos productos (color, aroma, sabor, etc.), sin embargo sus niveles de utilización se están cuestionando al dar lugar a la formación de nitrosaminas, sustancias carcinogénicas.

Al adicionar el nitrito a la carne este reacciona con varios de sus componentes (proteínas, lípidos, mioglobina, grupos sulfhídrico, etc.) o se transforma en nitrato, lo que supone una variación en los niveles de nitrito detectables analíticamente. Esto implica que el nitrito detectado en los productos cárnicos, nitrito residual, disminuye a lo largo de las etapas de procesado y conservación en función de diversos factores relacionados con el tipo de producto y las condiciones de maduración (Cassens, 1990).

El presente trabajo estudió la evolución de los nitratos y nitritos durante el proceso de curación de fuets elaborados con diferentes niveles de sales nitrificantes.

### MATERIALES Y METODOS

Los fuets fueron elaboradas en el Institut de Recerca y Tecnología Agroalimentàries (IRTA-Monells), con diferentes niveles de sales nitrificantes (Tabla 1).

Se realizaron a lo largo de la maduración cuatro controles: control inicial (día 0), durante la fermentación (día 3), a mitad del proceso de curado (día 14) y al final de la curación (día 27).

Determinación de nitratos y nitritos: la extracción se realizó mediante el método de la AOAC (1990) y su cuantificación mediante análisis por inyección de flujo con detección fotométrica (FIA) (Ruiz Capillas et al., 2006).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indican que del nitrito inicialmente añadido, se detecta aproximadamente el 50 % al inicio del proceso de curación del fuet (día 0), disminuyendo su detección durante la curación alcanzando al final de la misma, día 27, entre el 10-14%, en función de las diferentes formulaciones ensayadas. Estos datos son inferiores a los determinados por Carballo y Andrade (2013) en salchichón aunque dentro los valores descritos por Cassens (1990), que indicó que del total del nitrito añadido a los productos cárnicos solo parte de él permanecería como nitrito residual al final del proceso de curación, estimándolo entre un 5-20%.

La evolución de la determinación de los niveles de nitrato durante la curación del fuet es inversa a la del nitrito al aumentar, en vez de disminuir, del 98 - 109% en el control inicial al 120-128% al final del período de curación en función de los diferentes niveles de sales nitrificantes estudiados, estos resultados coinciden con Cassens (1990) que observó que parte, entre un 1-10 %, del nitrito añadido al producto se transformaría en nitrato.

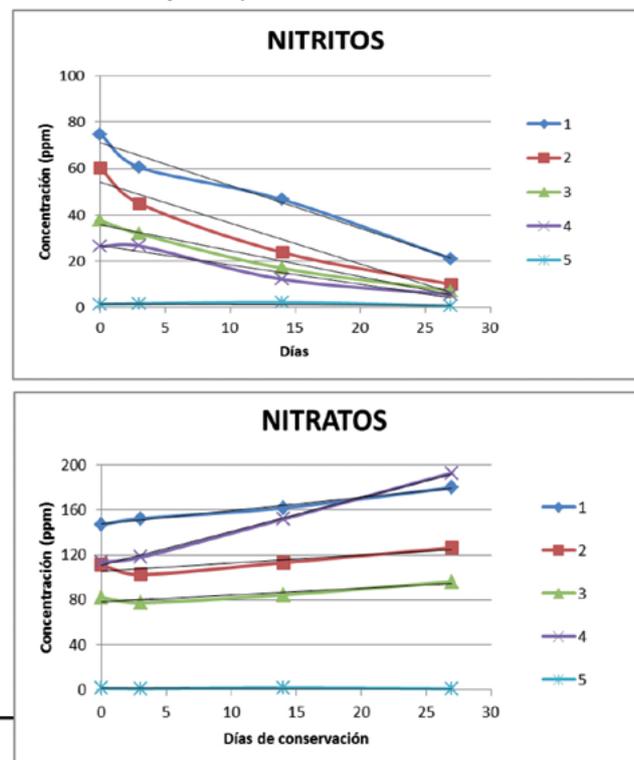
### BIBLIOGRAFIA

- AOAC (1990). Method 973.31  
Carballo, J. y Andrade, S. (2013). Nutr. Clin. Diet. Hosp. 33(1), 114-115.  
Cassens, R. G. (1990). Nitrite-Cured Meat. Food & Nutrition Press, Inc. Trumbull, Connecticut, USA.  
Ruiz-Capillas, C. et al., (2006). J. Agr. Food Chem., 54 (26), 9959-9965

Tabla 1. Niveles de sales nitrificantes empleadas en los diferentes "fuets" elaborados.

- Lote 1: 150 ppm nitrato + 150 ppm nitrito**  
**Lote 2: Reducción al 75 %**  
**Lote 3: Reducción 50 %**  
**Lote 4: 150 ppm nitrato + 150 ppm nitrito + 500 ppm de ascorbato sódico**  
**Lote 5: control, sin nitratos ni nitritos añadidos**

Figura 1. Evolución de los nitritos y nitratos en función del período de maduración y la composición de los "fuets".



Monells, Septiembre 2013



## Cuantificación de los nitratos y los nitritos en jamones de larga curación elaborados con diferentes niveles de sales nitrificantes



Carballo, J. y Andrade, S.  
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) (CSIC)



NITRARED  
Acción 3.1

### INTRODUCCION Y OBJETIVO

Los nitratos y nitritos son incorporados en los productos cárnicos con fines higiénico-sanitarios o tecnológicos, sin embargo sus niveles de utilización se están cuestionando al dar lugar a la formación de nitrosaminas, sustancias con elevado poder cancerígeno y mutagénico.

Los nitritos inicialmente adicionados son de difícil cuantificación ya que al ser muy reactivo reacciona con varios de los componentes de la carne, lo que supone una variación en sus niveles detectables (nitrito residual) durante el período de curación (Cassens, 1990).

El presente trabajo estudió los niveles de nitratos y nitritos en jamones elaborados con diferentes niveles de sales nitrificantes al final del período de curación.

### MATERIALES Y METODOS

Los jamones fueron elaborados en el Institut de Recerca y Tecnologia Agroalimentàries (IRTA-Monells), con diferentes niveles de sales nitrificantes (Tabla 1). Se realizó un único control al final del período de curación (18 meses).

Determinación de nitratos y nitritos: la extracción se realizó mediante el método de la AOAC (1990) y su cuantificación mediante análisis por inyección de flujo con detección fotométrica (FIA) (Ruiz Capillas et al., 2006).

Tabla 1. Niveles de sales nitrificantes empleadas en los diferentes lotes de jamones elaborados:

- 1 - 600 ppm Nitrato
- 2 - 150ppm Nitrato
- 3 - 600 ppm Nitrato + 600 ppm Nitrito
- 4 - 150 ppm Nitrato + 150 ppm Nitrito
- 5 - 600 ppm nitrato + 600 ppm Nitrito + 500 ppm Ascorbato

Figuras 1A y 1B. Niveles de los nitritos y nitratos (ppm) de jamones de larga curación en función de su composición (Tabla 1) y del músculo [*biceps femoris* (BF) y *semimembranosus* (SM)].

#### 1A

| Músculos | NITRITOS |      |
|----------|----------|------|
|          | BF       | SM   |
| Muestras |          |      |
| 1        | 15,2     | 13,2 |
| 2        | 7,1      | 3,7  |
| 3        | 17,3     | 20,1 |
| 4        | 6,2      | 2,8  |
| 5        | 19,4     | 15,6 |

#### 1B

| Músculos | NITRATOS |      |
|----------|----------|------|
|          | BF       | SM   |
| Muestras |          |      |
| 1        | 49,9     | 37,2 |
| 2        | 30,1     | 19,8 |
| 3        | 61,2     | 39,1 |
| 4        | 28,5     | 21,1 |
| 5        | 58,7     | 43,2 |

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se han encontrado diferencias en el nitrito residual entre los músculos *biceps femoris* (BF) y *semimembranosus* (SM) (Figura 1A →), sin embargo se han encontrado diferencias entre las muestras con altos niveles de nitratos y nitritos comparándolas con aquellas en las que se han utilizado niveles bajos de estas sales (Figura 1A ↻). Siendo en todos los casos niveles detectados muy bajos.

La concentración de nitratos detectada es considerablemente superior a la de los nitritos, siendo estas concentraciones más elevadas en el músculo *biceps femoris* (BF) que en el músculo *semimembranosus* (SM) (Figura 1B →) y es mayor cuanto mayor es la cantidad de sal adicionada, con independencia de que sean nitritos, nitratos o una mezcla de ambos (Figura 1B ↻).

#### BIBLIOGRAFIA

- AOAC (1990). Method 973,31  
Cassens, R. G. (1990). Nitrite-Cured Meat. Food & Nutrition Press, Inc. Trumbull, Connecticut, USA.  
Ruiz-Capillas, C. et al., (2006). J. Agr. Food Chem., 54 (26), 9959-9965

Monells, Septiembre 2013



## Would the reduction of the levels of nitrate and nitrite provide stable and sensorially acceptable dry fermented sausages?



Eva Hierro Paredes, Xavier F. Hospital, Manuela Fernández Álvarez  
Department of Food Technology, Complutense University, Madrid, Spain

### INTRODUCTION

Curing is one of the first nonthermal food processing technologies developed in History. Nitrate and nitrite contribute to the colour and flavour of cured meat products, but also exert antioxidant activity, which can greatly influence aroma generation, and an antimicrobial effect related to the inhibition of spoilage and pathogenic bacteria. Regardless of these beneficial activities, European food safety authorities are concerned about the role of these additives in the formation of nitrosamines. In this context, nitrate and nitrite "free" products are now available in the market although in many cases, these products have been added with vegetable extracts which contain high amounts of nitrate. This situation leads to a lack of control of the actual amounts of these additives in meat products, which might exceed the authorized limits.

### OBJETIVES

The aim of this work was to evaluate the stability and sensory quality of reduced nitrate and nitrite dry fermented sausages, in view of a possible revision of the maximum ingoing amounts of these additives allowed in the EU.

### MATERIALS AND METHODS

#### SAUSAGE PREPARATION

**Raw material:**  
Minced belly and loin pork

**Starters:**  
*Staphylococcus xylosum*  
*Pediococcus pentosaceus*

**Other ingredients:**  
Salt, dextrose, paprika, acid pyrophosphate

#### Curing compounds:

HN 150 ppm KNO<sub>3</sub> + 150 ppm NaNO<sub>2</sub>  
MN 112.5 ppm KNO<sub>3</sub> + 112.5 ppm NaNO<sub>2</sub>  
LN 75 ppm KNO<sub>3</sub> + 75 ppm NaNO<sub>2</sub>  
C Control (no nitrificants added)



#### MICROBIAL ANALYSIS

(Sampling at days 0, 2, 12 and 30 of ripening)

Total viable counts (PCA)  
Lactic acid bacteria (MRS)  
Gram+ catalase+ cocci (MSA)  
Enterobacteriaceae (VRBG)  
Clostridium (SPS)

#### VOLATILE COMPOUND ANALYSIS

(SPME/GC-MS)

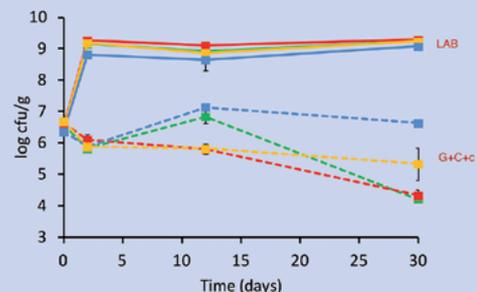


Figure 1 - Lactic acid bacteria and Gram+ catalase+ cocci (G+C+c) counts in chorizo with different concentrations of nitrates and nitrites. [HN ■; MN ■; LN ■; C ■]

### RESULTS

Total viable counts and lactic acid bacteria were not affected by the levels of nitrate and nitrite. The final numbers of Gram positive catalase positive cocci (G+C+c) were 1 and 2 log cfu/g higher in the products with 75 ppm, and in the control sausages, respectively.

Enterobacteriaceae counts were also higher, approximately 1 log cfu/g in the sausages with 75 and 112.5 ppm, and 2 log cfu/g in the control ones. No sulphite-reducing clostridia were detected in any batch.

Carbohydrate-fermentation derived volatiles were the most abundant group (89-94%), with significant differences among batches probably due to the differences in the G+C+c counts. Thus, the sausages with higher G+C+c numbers (75 ppm and control sausages) showed higher amounts of acetoin and diacetyl, which are produced by these microorganisms.

### CONCLUSIONS

Reducing the concentration of nitrate and nitrite has an impact on the sensory and microbiological quality of dry fermented sausages. These considerations should be taken into account in view of a future revision of the amounts of these additives in meat products.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Programme Consolider-Ingenio 2010, project CSD.2007-00016).

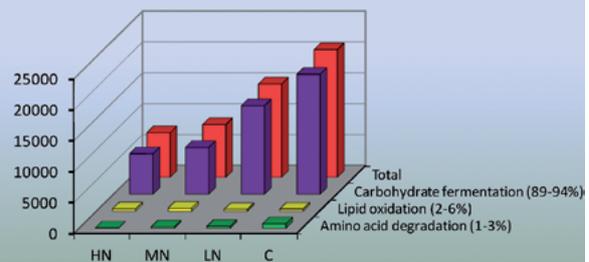


Figure 2. Concentration of volatile compounds grouped according to their origin.



## ¿SE PUEDE CONTROLAR A SALMONELLA SI SE REDUCE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS EN LOS EMBUTIDOS?



Xavier F. Hospital<sup>1</sup>, Eva Hierro<sup>1</sup>, Mónica Gañán<sup>1,2</sup> y Manuela Fernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid  
<sup>2</sup> CEI Campus Moncloa, UCM-UPM y CSIC, Madrid

### INTRODUCCIÓN

*Salmonella* Typhimurium es el serovar de *Salmonella* spp. predominante en la carne de cerdo, cuyo consumo sería responsable de entre un 10 y un 20% de los casos de salmonelosis que se detectan en la UE <sup>(1,2)</sup>. Aunque los embutidos crudos curados son alimentos estables y seguros gracias a su formulación, pH y a<sub>w</sub>, en la bibliografía se describen numerosos casos de salmonelosis originados por el consumo de embutidos insuficientemente fermentados o cuya materia prima contenía niveles excesivamente altos de microorganismos <sup>(2)</sup>. En este sentido, por ejemplo en EEUU se ha descrito una prevalencia de *Salmonella* spp. en estos productos de un 1,4% <sup>(3)</sup>. Entre los ingredientes de los embutidos que presentan actividad antimicrobiana se encuentran los nitratos y nitritos, aunque su efecto sobre *Salmonella* spp. es controvertido.

### OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es determinar la supervivencia de *Salmonella* Typhimurium en salchichones inoculados y elaborados con diferentes concentraciones de nitrificantes a lo largo del proceso de maduración y durante el almacenamiento.

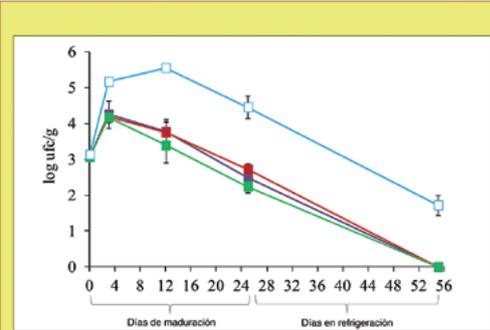
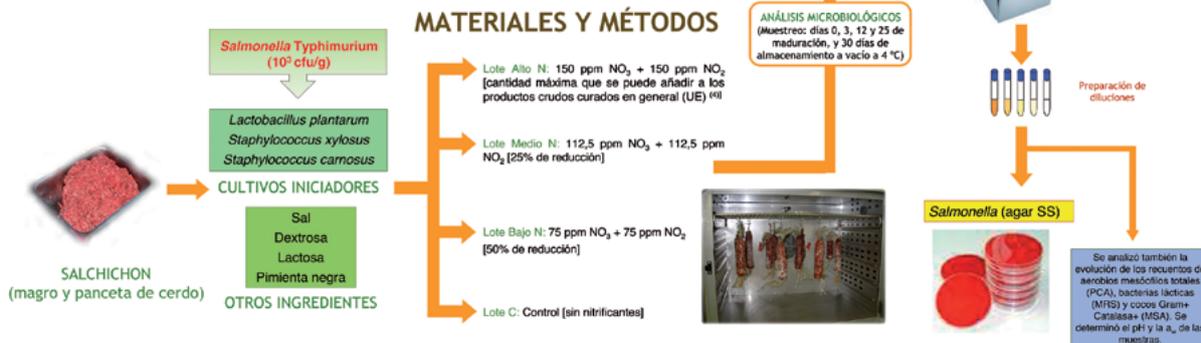


Figura 1.- Recuentos de *Salmonella* spp. en salchichón a lo largo de la maduración y almacenamiento a vacío a 4 °C (■ 150 ppm NaNO<sub>3</sub> y NaNO<sub>2</sub>; ● reducción 25 %; ▲ reducción 50 %; □ sin nitrificantes).

### RESULTADOS

No se observó efecto de la disminución de la concentración de nitrificantes en los recuentos de *Salmonella* spp. ni durante ni al final de la maduración. Los salchichones sin nitrificantes presentaron recuentos finales mayores que los iniciales y aproximadamente 2 log ufc/g superiores al resto de los lotes. Los valores observados en los lotes alto, medio y bajo N al final de la maduración sólo fueron ligeramente inferiores a los iniciales debido al incremento en aproximadamente 1 log que tuvo lugar durante los 3 primeros días, período en el que aún no se han establecido las condiciones de pH y a<sub>w</sub> necesarias para inhibir la multiplicación del microorganismo. Al final del almacenamiento sólo se detectó *Salmonella* spp. en el lote control, con recuentos de 2 log ufc/g. Los valores de pH y a<sub>w</sub> fueron los esperados para este tipo de productos, al igual que la evolución de la microbiota típica, aunque al final de la maduración se observaron mayores recuentos de cocos Gram+Catalasa+ en los embutidos con un menor contenido de nitrificantes.

### CONCLUSIONES

La reducción de la concentración de nitrato y nitrito influyó en los recuentos de cocos Gram positivos Catalasa positivos. Estos aditivos contribuyeron eficazmente al control de *Salmonella*. Por tanto, la fabricación de salchichones con una reducción de hasta un 50% del contenido máximo de nitrato y nitrito no implicaría mayores concentraciones de este microorganismo patógeno en el producto. Esta circunstancia debería tenerse en cuenta a la hora de valorar una futura revisión de las concentraciones máximas autorizadas en la UE.

### BIBLIOGRAFÍA

1. European Food Safety Authority (2008). EFSA J. 135, 1-111.
2. European Food Safety Authority (2010). EFSA J. 8(4), 1547.
3. Levine, P.B., Rose, B., Green, S., Ransom, G., Hill, W. (2001). J. Food Prot. 64, 1188-1193.
4. Parlamento Europeo (2006). Directiva Europea 2006/52/EC. DOCE, L204, 10-22.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia a través del proyecto CONSOLIDER-INGENIO 2010-CARNISENUSA. La Dra. Gañán es beneficiaria de un contrato posdoctoral del Programa Internacional de Captación de Talento (PICATA) del Campus de Excelencia Internacional (UCM-UPM, INIA).



## Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en lonchas de chorizo RTE formulado con distintas concentraciones de nitrificantes

Consolider Ingenio  
2010  
Carnisenusa

Xavier F. Hospital. Manuela Fernández. Mónica Ganan. Eva Hierro

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

### INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los cambios en los estilos de vida y las preferencias de los consumidores han propiciado el desarrollo de una gran variedad de alimentos RTE ("Ready To Eat"). En esta categoría se incluyen todos aquellos productos que no precisan de un tratamiento higienizante previo al consumo, como los embutidos loncheados. Los embutidos crudos curados, aunque son productos muy seguros desde el punto de vista microbiológico por su bajo pH y  $a_w$  y por los conservantes que contienen, como las sales nitrificantes, pueden contaminarse superficialmente durante el loncheado con microorganismos patógenos y alterantes presentes en los equipos y manipuladores.

Los nitratos y nitritos añadidos a los productos cárnicos curados contribuyen a la formación de su color, aroma y sabor típico, además de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes. Pese a ello, su uso es causa de debate en la UE dada su implicación en la formación de nitrosaminas.

### OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue determinar si la reducción de la concentración de nitrificantes en los embutidos crudos curados puede influir en la supervivencia o multiplicación de *Listeria monocytogenes* ante una posible contaminación post-procesado.

### MATERIALES Y MÉTODOS



### RESULTADOS

Los recuentos de *L. monocytogenes* se mantuvieron prácticamente constantes durante el almacenamiento, sin que se observaran diferencias significativas debidas a la concentración de nitrificantes. Los recuentos de aerobios mesófilos totales y bacterias lácticas fueron los habituales en este tipo de productos, sin apenas variaciones durante el almacenamiento. Sí que hubo diferencias en los recuentos de cocos Gram positivo Catalasa positivo, que fueron menores en los embutidos con mayor contenido de nitrificantes.

El pH de las muestras se incrementó desde 5,0 a 5,2 durante el almacenamiento, mientras que la  $a_w$  se mantuvo constante en torno a 0,93. Estas condiciones permitirían, en principio, la multiplicación de *L. monocytogenes*, por lo que la reducción de la concentración de nitrificantes podría repercutir en la seguridad del producto. Los resultados obtenidos muestran que la concentración de estos aditivos no influyó en el crecimiento/supervivencia de este patógeno en el producto loncheado y que la combinación de barreras (pH,  $a_w$  bacterias lácticas, refrigeración) fue suficiente para su control.

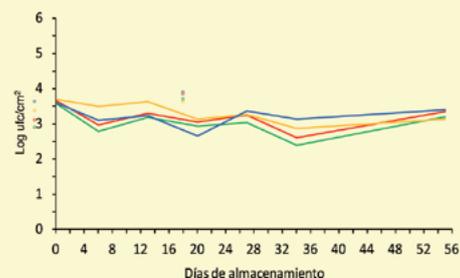


Figura 1. Inhibición de *Listeria monocytogenes* en lonchas de chorizo con diferentes concentraciones de nitrificantes, envasadas al vacío y almacenadas a 4 °C durante 55 días. [HN ■, MN ■, LN ■, C ■]

### CONCLUSIONES

Las condiciones de pH y  $a_w$  y la concentración de bacterias lácticas que se alcanzan en la maduración, unidas al almacenamiento a baja temperatura, parecen suficientes para controlar a *L. monocytogenes* en el caso de que el producto sufriese una contaminación durante el loncheado y/o envasado, independientemente de la concentración de nitrificantes añadida a la fórmula.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha llevado a cabo como parte de las actividades del Proyecto Consolider-Ingenio-CSD 2007-00016 (Ministerio de Educación y Ciencia).

## **CUANTIFICACIÓN DE NITROSAMINAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS SOMETIDOS A ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS**

Ruiz, J.\*. Tec. Alimentos; Fac. Vet. UEx; Campus Univ. s/n; 10071 Cáceres; [jruiz@unex.es](mailto:jruiz@unex.es)

CONSOLIDER - Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016)

### **NITROSAMINAS**

- Elevado poder cancerígeno y mutagénico
- Niveles residuales de nitratos y nitritos en productos cárnicos
- Posible influencia de las APH sobre la formación de este tipo de compuestos

Tabla 1.- Parámetros cromatográficos en la determinación de NAs mediante extracción sólido líquido, seguida de SPE y GC-LVI-IC-MS/MS

| Compuesto                        | TR<br>(min.) | m/z<br>cuantificación |
|----------------------------------|--------------|-----------------------|
| N-nitrosodimetilamina (NDMA)     | 6.56         | 58.0                  |
| N-nitrosometiletilamina (NMEA)   | 8.54         | 60.9                  |
| N-nitrosodietilamina (NDEA)      | 10.50        | 75.0                  |
| N-nitrosopirrolidina (NPYR)      | 17.18        | 55.0                  |
| N-nitrosodi-n-propilamina (NDPA) | 17.49        | 89.0                  |
| N-nitrosomorfolina (NMOR)        | 17.97        | 86.0                  |
| N-nitrosopiperidina (NPIP)       | 20.54        | 68.8                  |
| N-nitrosodi-n-butilamina (NDBA)  | 23.34        | 102.9 + 57.0          |
| N-nitrosodifenilamina (NDPheA)   | 26.12        | 92.0                  |

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

- Se analizaron muestras control y muestras sometidas a un tratamiento de altas presiones hidrostáticas de jamón, chorizo y salchichón
- Análisis mediante extracción mediante dispersión en fase sólida seguida de clean-up con Florisil y análisis del extracto mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas-masas con ionización química (GC-LVI-IC-MS/MS)
- Patrón de nitrosaminas (Supelco, EPA 8270) (Tabla1)

### **RESULTADOS**

- Detección de todas las NAs del patrón con el método de extracción + SPE + GC-MS/MS
- Valores adecuados de linealidad, reproducibilidad, recuperación para todas las NAs del patrón
- Límite de detección de 3 µg/Kg
- Mejora en el tiempo de análisis y en la identificación con respecto a SPME-GC/MS

### **RESULTADOS**

- Valores no cuantificables de todas las NAs en todos los productos analizados, bien sean tratados o tratados con altas presiones hidrostáticas
- Por lo tanto, no parece que las altas presiones hidrostáticas promuevan la generación de nitrosaminas a partir del nitrato/nitrito residual en muestras ya curadas.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Thicker, A.R. (1999) En: Wiley Enc. Food Sci. Technol., 1707.
- Raoul, Gremaud, Biaudet & Turesky (1997) J Agric Food Chem, 45: 4706
- Yurchenko, S. & Mölder, U. (2007) Food Chemi, 100: 1713

### **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen el apoyo técnico y humano del Servicio de Análisis e Innovación en Productos de Origen Animal (SiPA) de la UEX



## Modelización de la difusión del nitrito de sodio en carne de cerdo



Gómez, J., Clemente, G., Sanjuán, N., Bon, J.  
 Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios (ASPA), Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia

### INTRODUCCIÓN

En la bibliografía existen evidencias de la interacción entre el contenido de sal y de agua en la carne durante su salado. Por este motivo se considera interesante la modelización del proceso de salado considerando esta interacción.

**Objetivo:** Modelizar la difusión de nitrito sódico (NaNO<sub>2</sub>) en el músculo *Semimembranosus* de la pierna del cerdo considerando la interacción entre dicha sal y el agua y sin considerarla.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Condiciones Experimentales

- ❖ Músculo *Semimembranosus*
- ❖ Geometría cilíndrica, 12 muestras de 8.4 cm de longitud y 2.4 cm de diámetro
- ❖ Temperaturas de curado: 0, 4, 8 y 12°C
- ❖ Agente de curado: salmuera saturada de nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>)
- ❖ Tipo de salado: inmersión (figura 1)
- ❖ Tiempo de salado: 5 días



Figura 1. Cilindros inmersos en salmuera

#### Cinética experimental de difusión de nitrito

- ❖ Cada cierto tiempo, se retiraba un cilindro y se pesaba.
- ❖ Mediante un sacabocados de 1,2 cm de diámetro se obtuvo la parte interna y la parte externa del cilindro (figura 2).
- ❖ La humedad de cada sección se determinó experimentalmente (AOAC, 1997),
- ❖ De cada sección se obtuvo un extracto a partir del cual se determinó el contenido en nitrito mediante un método espectrofotométrico (AOAC, 2000).

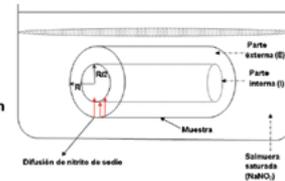


Figura 2. Esquema de las partes en las que se dividieron los cilindros de carne para analizar su contenido en nitritos.

#### MODELO I: considerando interacción entre el NO<sub>2</sub> y el agua

$$D_{Na} = \left[ a + b \left( \frac{C_{Na}}{1 + C_{Na}} \right)^x \right] \cdot 10^{-12}$$

$$\bar{C}_{Na}(t) = \frac{8}{C_{Na}(t)R^2} \int_0^{R/2} C_{Na} C_r dr$$

$$\bar{C}_{Na}(t) = \frac{8}{C_{Na}(t)3R^2} \int_{R/2}^R C_{Na} C_r dr$$

$$\bar{C}_{Na}(t) = \frac{8}{R^2} \int_0^{R/2} C_r dr$$

$$\bar{C}_{Na}(t) = \frac{8}{3R^2} \int_{R/2}^R C_r dr$$

Difusión de NO<sub>2</sub>

Difusión de agua

#### MODELO SI: sin considerar interacción entre el NO<sub>2</sub> y el agua

$$\frac{\bar{C}_{Na}(R,t) - C_{Na}}{C_{Na} - C_{Na}} = 8 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{e^{-D_{Na} \lambda_n^2 t}}{(\lambda_n R)^2 J_1(\lambda_n R)} J_1(\lambda_n \frac{R}{2})$$

$$\frac{\bar{C}_{Na}(R,t) - C_{Na}}{C_{Na} - C_{Na}} = \frac{16}{3} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{e^{-D_{Na} \lambda_n^2 t}}{(\lambda_n R)^2 J_1(\lambda_n R)} \left[ J_1(\lambda_n R) - J_1(\lambda_n \frac{R}{2}) \right]$$

$$\frac{\bar{C}_{Na}(R,t) - C_{Na}}{C_{Na} - C_{Na}} = 8 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{e^{-D_{Na} \lambda_n^2 t}}{(\lambda_n R)^2 J_1(\lambda_n R)} J_1(\lambda_n \frac{R}{2})$$

$$\frac{\bar{C}_{Na}(R,t) - C_{Na}}{C_{Na} - C_{Na}} = \frac{16}{3} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{e^{-D_{Na} \lambda_n^2 t}}{(\lambda_n R)^2 J_1(\lambda_n R)} \left[ J_1(\lambda_n R) - J_1(\lambda_n \frac{R}{2}) \right]$$

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Valores del coeficiente de (modelo SI)

| Temperature °C | (D <sub>Na</sub> ± sd) · 10 <sup>10</sup> (m <sup>2</sup> /s) | % var. | (D <sub>Na</sub> ± sd) · 10 <sup>10</sup> (m <sup>2</sup> /s) | % var. |
|----------------|---|--------|---|--------|
| 0              | 0,95 ± 0,007  | 90,32  | 1,95 ± 0,04   | 97,51  |
| 4              | 1,13 ± 0,007  | 92,43  | 2,45 ± 0,30   | 98,52  |
| 8              | 1,25 ± 0,042  | 94,12  | 3,30 ± 0,47   | 99,63  |
| 12             | 1,40 ± 0,127  | 96,81  | 5,79 ± 0,43   | 94,61  |

- ❖ Los valores de D<sub>Na</sub> son similares a los obtenidos con el modelo SI (tabla 2).
- ❖ Respecto a D<sub>Na</sub> (figura 3), el aumento de la concentración de sal afecta progresivamente a los valores del coeficiente de difusión. Además, la concentración de sal influye en la microestructura de la carne y facilita la penetración de sal y la pérdida de agua.
- ❖ Los valores de D<sub>Na</sub> calculados con el modelo I son 10 veces menores que los obtenidos a partir del modelo SI.
- ❖ El modelo I presenta una mejor descripción del proceso.

- ❖ Los valores del coeficiente de difusión del agua (D<sub>wa</sub>) obtenidos con el modelo SI son comparables a los obtenidos por otros autores.
- ❖ En el modelo SI, los valores del coeficiente de difusión de nitrito (D<sub>Na</sub>) difieren ligeramente de los obtenidos por otros autores. Las diferencias observadas pueden atribuirse a que en esos estudios el salado se realizó con una mezcla de nitrito, nitrato y cloruro de sodio.

Tabla 2. Valores del coeficiente de difusión del agua (modelo I).

| Temperatura °C | D <sub>wa</sub> (m <sup>2</sup> /s) × 10 <sup>10</sup> | % var |
|----------------|--|-------|
| 0              | 1,65   | 0,95  |
| 4              | 2,20   | 0,99  |
| 8              | 2,76   | 0,97  |
| 12             | 3,10   | 0,95  |

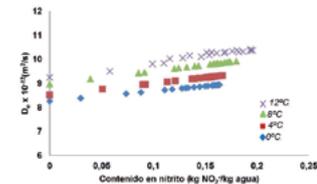


Figura 3. Variación del coeficiente de difusión del nitrito con la concentración (modelo I).

### CONCLUSIONES

- ❖ El coeficiente de difusión del agua fue del mismo orden en los dos modelos considerados
- ❖ Se obtuvieron valores del coeficiente de difusión de nitrito aproximadamente 10 veces inferiores con el modelo I.
- ❖ Los resultados obtenidos permiten concluir la importancia de tener en cuenta la interacción entre la sal y el agua en la materia cárnica y la difusión simultánea de ambas sustancias con el fin de describir adecuadamente el proceso.

# NITRARED: Acción 3.2.

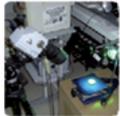
## Formación y estabilidad del color característico de los productos curados.

Pedro Marquina, Alberto Lorés, Teresa Pérez, José Antonio Beltrán y Pedro Roncalés  
 Producción Animal y Ciencia de los Alimentos / Facultad de Veterinaria / Universidad de Zaragoza



### Material y métodos

Medida del color instrumental



**Espectrorradiómetro:**  
 •Modelo IS CAS 140  
 •Sonda TOP 100



**Espectrofotómetro**  
 •Minoita CM-2002

Índice de curado (Ic)

$$I_{curado} = I_{nitrosación} - I_{descoloración}$$

$$I_n = \frac{R_{550}(T)}{R_{500}(T)} \quad I_d = \frac{R_{570}(T)}{R_{630}(T)}$$

**Obtención de:**  
 •Espectros de reflectancia de 400 a 700 nm  
 •Valores CIE (1976) L\*, a\*, b\*

Análisis de la Zn-PP



SPE



UNICAM UV 600

**Método:**  
 •Homogeneización en Acetona-Agua (3:1)  
 •Extracción en Fase Sólida de Zn-PP  
 •Medida Absorbancia a 416 nm.

### Producto terminado: jamón

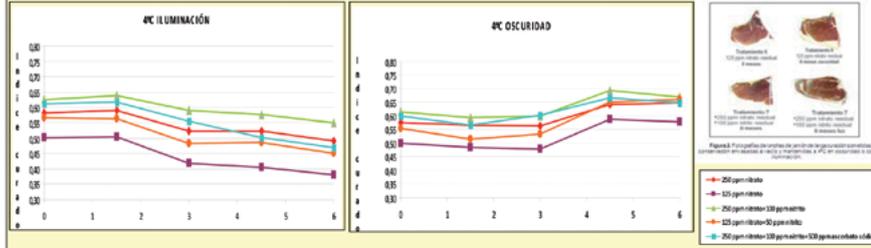
**Tabla 1.** Índice de curado y Zn-pp en jamones, una vez finalizado su proceso de curación.

| Nitrato/nitrito/asc. | Índice de curado |                | Jamón con Zn |             |
|----------------------|------------------|----------------|--------------|-------------|
|                      | Corta curación   | Larga curación | Ind. curado  | Zn-pp (ppm) |
| 250/0/0              | 0,42             | 0,58           |              |             |
| 125/0/0              | 0,30             | 0,51           |              |             |
| 250/100/0            | 0,49             | 0,62           |              |             |
| 125/50/0             | 0,41             | 0,57           |              |             |
| 250/100/500          | 0,50             | 0,62           |              |             |
| Con: 250/0/0         |                  |                | 0,57         | 0,43        |
| Sin: 0/0/0           |                  |                | 0,29         | 6,97        |



Figura 1. Fotografías de lonchas de jamón de larga curación elaborados con nitrato (A, 250 ppm) y sin nitrato (B).

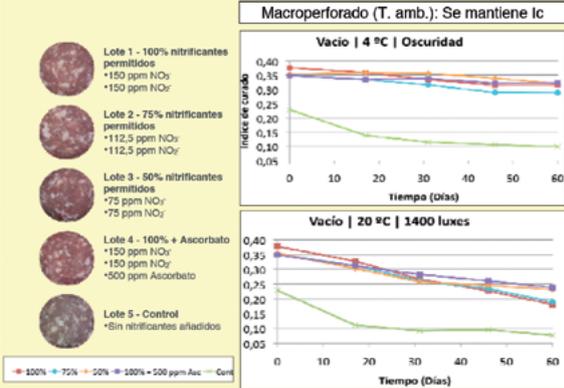
### Conservación del color en jamón



### Anal. sensorial de jamones con / sin

|                         | Nitrificación |       |          |       |     |
|-------------------------|---------------|-------|----------|-------|-----|
|                         | NO (n=9)      |       | SI (n=9) |       | sig |
|                         | Media         | SE    | Media    | ES    |     |
| Color Bf                | 5,12          | 0,62  | 5,65     | 0,58  | -   |
| Color SM                | 5,73          | 0,74  | 6,01     | 0,83  | ns  |
| Homogeneidad del color  | 5,87          | 0,58  | 4,71     | 0,83  | *** |
| Defectos aspecto visual | 2,88          | 1,03  | 3,16     | 0,75  | ns  |
| Aroma de curado         | 5,90          | 0,63  | 5,77     | 0,46  | ns  |
| Defectos del olor       | 2,07          | 0,57  | 1,92     | 0,40  | ns  |
| Sabor de curado         | 5,49          | 0,54  | 5,20     | 0,35  | ns  |
| Sabor salado            | 5,25          | 0,68  | 5,55     | 0,57  | ns  |
| Sabor rancio            | 1,35          | 0,32  | 1,39     | 0,22  | ns  |
| Sabores anormales       | 1,37          | 0,46  | 1,67     | 0,57  | ns  |
| Calidad Global          | 5,01          | 0,73  | 4,72     | 0,54  | ns  |
| COLOR                   | 2,78          | 0,54  | 3,26     | 0,62  | *   |
| AROMA                   | 3,15          | 0,29  | 3,00     | 0,35  | ns  |
| SABOR                   | 3,05          | 0,38  | 2,86     | 0,32  | ns  |
| PREFERENCIA             | 52,53         | 18,06 | 47,47    | 18,06 | ns  |

### Conservación del color en embutidos



### Conclusiones

- 1.- El uso de nitrificantes (a conc. máximas o reducidas) en jamones de corta y larga curación dio lugar a un color aceptable en todos los casos. El menos intenso fue con sólo nitrato a conc. baja (125 mg/kg).
- 2.- Los jamones sin nitrificantes presentaron un Ic muy inferior. Sin embargo, la evaluación sensorial del color no presentó dif. signif., debido a la formación de Zn-pp.
- 3.- Las lonchas envasadas a vacío (4°C) conservaron un buen color 6 meses en oscuridad. La luz dio lugar a una decoloración significativa, mayor en las muestras con menor cantidad de nitrato o nitrito.
- 4.- En los embutidos (salchichón, fuet o chorizo), los nitrificantes (a cualquier conc.) proporcionaron un Ic satisfactorio. Su ausencia dio un bajo Ic, con color no adecuado.
- 5.- La conservación de embutidos en un material macroperforado mantuvo el color 2 meses (temp. ambiente), igual que las lonchas a vacío, 4°C y oscuridad. Las lonchas con luz se decoloraron signif. en 2 meses.

## Efecto de la la adición de nitrato y nitrito en el perfil de volátiles de jamones curados.

M. Gratacós-Cubarsí, J. Arnau, Garcia-Regueiro J.A

IRTA-Monells, Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells (Girona)

### INTRODUCCIÓN

Los nitratos y nitritos se añaden a los productos cárnicos con varias finalidades como son la inhibición de microorganismos alterantes y potencialmente patógenos y la contribución de estos a la calidad sensorial del producto. La Legislación Europea actual establece que la cantidad máxima residual de nitratos en jamón curado no puede ser superior a 250 mg/kg de nitrato (E 251-E 252) [1].

### OBJETIVOS

En el presente trabajo se evaluó el perfil de compuestos volátiles mediante SPME-GC/MS en jamones curados elaborados con y sin nitrificantes. Asimismo, se analizaron dos músculos, uno considerado interno (*biceps femoris*) y otro externo (*semimembranosus*) más expuesto al oxígeno.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se elaboraron un total de 18 jamones. La mitad fue elaborada sin nitrificantes y la otra mitad se frotó superficialmente con una mezcla equivalente a 800 mg/Kg de NaNO<sub>2</sub> y 600 mg/Kg de KNO<sub>3</sub>. Al final del periodo de curado se realizó un corte transversal al jamón diseccionando anatómicamente el *biceps femoris* y el *semimembranosus*. Los nitratos residuales se determinaron según el método ISO 3091.

1 g de muestra triturada fue adicionada con una solución de Tolueno D<sub>8</sub>. Los compuestos volátiles se adsorbieron en una fibra CAR/PDMS 75 μm durante 30 minutos a 40 °C grados. Posteriormente, los compuestos se desorbieron a 240 °C e inyectaron a un sistema de GC-MS (Agilent 6850).

Para el análisis de los resultados únicamente se evaluaron en los compuestos mayoritarios del perfil detallados en la **tabla 1**. El señal del patrón interno se utilizó para la normalización de los resultados.

### RESULTADOS

La dosis media residual de nitrato fue de 201 mg/Kg en las muestras nitrificadas y 16 mg/Kg en las muestras elaboradas sin nitrificantes. El perfil de compuestos volátiles, bajo las condiciones de análisis, mostró mayoritariamente aldehídos ramificados y lineales, metilcetonas y alcoholes. Los niveles de metilestereos fueron despreciables bajo las condiciones de análisis. Si los clasificamos según origen, los compuestos mayoritarios lo presentan en la fracción lipídica y proteica.

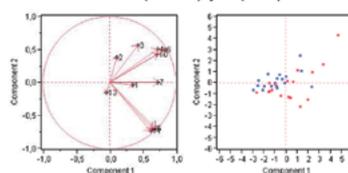
Los datos obtenidos del análisis de componentes principales (PCA) mostraron que el componente 1 (Component 1) y el componente 2 (Component 2) explican un 35,4% de la variabilidad total y un 24,36% respectivamente (ver **Figura 1**). Además, pudo determinarse que los aldehídos lineales pentanal (5), hexanal (9) y heptanal (11) así como la 2-hexanona (6) explican una proporción relevante de la misma.

Los aldehídos lineales pentanal (5), hexanal (9) y heptanal (11) variaron significativamente al adicionar sales nitrificantes como aditivo en la elaboración del jamón curado (**Figura 1**).

Las muestras elaboradas sin sales nitrificantes presentaron una mayor proporción de compuestos derivados de la oxidación lipídica, evidenciando el efecto positivo que ejercen los nitrificantes al reducir el enranciamiento. Asimismo, el efecto de los nitrificantes fue significativamente superior en el *semimembranosus*, al ser un músculo anatómica y composicionalmente diferente y más expuesto a los agentes potencialmente oxidantes.

|    | Compuesto      | Rt (min) | SIM | Confirmación |
|----|----------------|----------|-----|--------------|
| 1  | 2-butanona     | 4.825    | 72  | M,E          |
| 2  | 3-metilbutanal | 6.664    | 58  | M,E          |
| 3  | 2-metilbutanal | 6.969    | 57  | M,E          |
| 4  | 2-pentanona    | 7.599    | 86  | M,E          |
| 7  | 1-pentanol     | 10.54    | 55  | M,E          |
| 9  | hexanal        | 11.911   | 56  | M,E          |
| 5  | pentanal       | 8.041    | 58  | M,E          |
| 11 | heptanal       | 15.794   | 70  | M,E          |
| 13 | octanal        | 19.5     | 57  | M,E          |
| 6  | 2-hexanona     | 11.414   | 58  | M,E          |
| 10 | 2-heptanona    | 15.29    | 58  | M,E          |

**Tabla 1:** Compuestos mayoritarios obtenidos en el perfil de volátiles. Tiempo de retención e iones m/z utilizados para su determinación. Confirmación: M (Masas) y E (con patrón externo)



**Figura 1:** Loading plot y Score plot obtenidos del análisis de componentes principales

### CONCLUSIONES

La adición de sales nitrificantes en la elaboración del jamón curado proporciona una reducción en el perfil de volátiles de los compuestos derivados de la oxidación lipídica indicando una menor oxidación de las muestras elaboradas con una mezcla inicial de nitrato y nitrito que las elaboradas sin nitrificantes. El efecto observado es distinto en función del músculo estudiado, probablemente como consecuencia de las diferencias anatómicas en ambos músculos.

### BIBLIOGRAFÍA

[1] Reglamento (UE) 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el Anexo II del Reglamento (CE) n.º 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión.

## TRATAMIENTOS COMBINADOS DE ALTAS PRESIONES Y BACTERIOCINAS EN LA INACTIVACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *SALMONELLA ENTERITIDIS* Y *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EN CARPACCIO DE TERNERA

María de Alba, Daniel Bravo, Margarita Medina  
Dpto. de Tecnología de Alimentos, INIA, Madrid

### INTRODUCCIÓN

El carpaccio es un alimento RTE que puede contaminarse durante su preparación.

*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli* O157:H7 son los patógenos que más preocupan en productos cárnicos.

La aplicación de tratamientos combinados de altas presiones y bacteriocinas se propone como estrategia para incrementar la seguridad del producto.

El objetivo de este trabajo es conocer el efecto de tratamientos de alta presión en combinación con bacteriocinas en la eliminación de estos patógenos en carpaccio conservado en condiciones de abuso de temperatura (8°C), así como evaluar los cambios producidos en el pH, actividad de agua ( $a_w$ ), textura y color.

### RESULTADOS

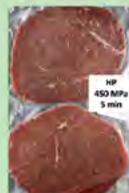
Tras el tratamiento, las altas presiones redujeron los niveles de *L. monocytogenes* 1 log y las bacteriocinas de 0.2 a 1.4 logs. El efecto antimicrobiano de los tratamientos combinados fue aditivo.

Los niveles de *S. Enteritidis* disminuyeron 4.1 logs con las altas presiones, mientras que las bacteriocinas no tuvieron efecto. No se registraron sinergias con los tratamientos combinados.

Las altas presiones redujeron los niveles de *E. coli* O157:H7 2.7 logs, mientras que el patógeno no resultó afectado por las bacteriocinas. Se observó un efecto antimicrobiano sinérgico con la combinación de alta presión y las enterocinas A y B, la pediocina PA-1 y la nisina comercial, con tasas de inactivación aproximadamente 2 logs superiores a la suma de los efectos individuales a los 30 d a 8°C.

Los valores de  $L^*$  aumentaron con la presurización, mientras que  $a^*$  y  $b^*$  disminuyeron. Las diferencias en los valores de pH fueron pequeñas y la  $a_w$  aumentó ligeramente en el carpaccio tratado. El efecto de los tratamientos sobre la fuerza al corte no mostró una tendencia clara.

|             | $L^*$ | $a^*$ | $b^*$ | pH   | $a_w$ | Fuerza corte |
|-------------|-------|-------|-------|------|-------|--------------|
| Control     | 32.8  | 22.3  | 12.8  | 5.44 | 0.922 | 33.4         |
| HP          | 35.1  | 17.8  | 10.5  | 5.38 | 0.927 | 28.3         |
| Ent AB      | 32.4  | 23.5  | 13.9  | 5.37 | 0.931 | 28.4         |
| Nis Z       | 32.0  | 20.0  | 10.3  | 5.38 | 0.929 | 30.0         |
| Ped         | 32.6  | 22.9  | 13.5  | 5.25 | 0.930 | 33.2         |
| Com. Nis    | 33.3  | 22.2  | 12.7  | 5.31 | 0.922 | 27.0         |
| Com. Ped    | 32.9  | 21.9  | 12.3  | 5.37 | 0.920 | 29.9         |
| HP+Ent AB   | 34.5  | 18.3  | 10.6  | 5.45 | 0.930 | 34.9         |
| HP+Nis Z    | 34.8  | 18.6  | 11.1  | 5.47 | 0.925 | 32.6         |
| HP+Ped      | 35.2  | 16.7  | 9.9   | 5.37 | 0.924 | 41.0         |
| HP+Com. Nis | 35.8  | 20.3  | 11.0  | 5.33 | 0.931 | 33.9         |
| HP+Com. Ped | 34.9  | 19.8  | 10.1  | 5.36 | 0.923 | 31.1         |



### CONCLUSIONES

Las altas presiones a 450 MPa durante 5 min sensibilizaron a *E. coli* O157:H7 frente a la actividad de ciertas bacteriocinas en carpaccio de ternera, mostrando ambos tratamientos un efecto antimicrobiano sinérgico que no se observó frente a *L. monocytogenes* ni *S. Enteritidis*.

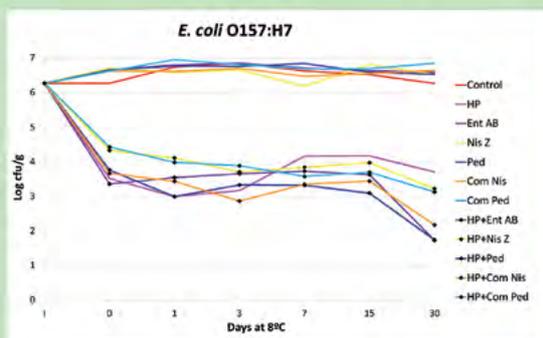
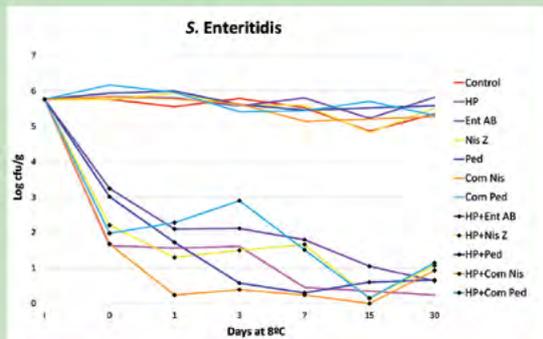
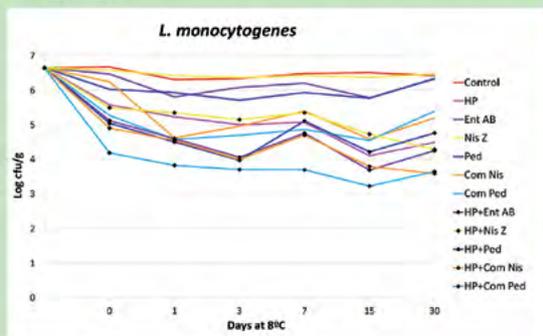
### MATERIALES Y MÉTODOS

Se contaminó carpaccio con cada uno de los patógenos a aproximadamente  $10^6$  ufc/g y se mantuvo 24 h a 4°C. Se prepararon muestras no contaminadas para la determinación del pH,  $a_w$ , textura y color.

Se aplicaron enterocinas A y B, nisina Z, pediocina PA-1 a partir de sobrenadantes de cultivos bacteriocinogénicos y dos preparaciones comerciales basadas en nisina y pediocina, sobre la superficie del carpaccio antes de la presurización.

Las altas presiones se aplicaron a 450 MPa durante 5 min a 12°C.

Las muestras se mantuvieron 30 días a 8°C. El ensayo se realizó por duplicado.





## TRATAMIENTOS COMBINADOS DE ALTAS PRESIONES, LACTOFERRINA Y EL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LA INACTIVACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *SALMONELLA ENTERITIDIS* Y *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EN CARPACCIO DE TERNERA

María de Alba, Daniel Bravo, Margarita Medina  
Dpto. de Tecnología de Alimentos, INIA, Madrid



### INTRODUCCIÓN

El carpaccio es un producto listo para el consumo susceptible de contaminarse durante su preparación. La contaminación se produce fundamentalmente por contacto con el equipo de procesado, aumentando el riesgo de proliferación de los patógenos si se conserva en condiciones de abuso de temperatura.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las altas presiones combinadas con lactoferrina activada o el sistema lactoperoxidasa para eliminar *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7 en carpaccio de ternera conservado a 8°C y 22°C durante 7 d.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se inoculó carpaccio con aproximadamente 10<sup>6</sup> ufc/g de *L. monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis o *E. coli* O157:H7 y se mantuvo 24 h a 4°C. Se prepararon muestras no contaminadas para la determinación del pH, a<sub>w</sub>, textura y color.

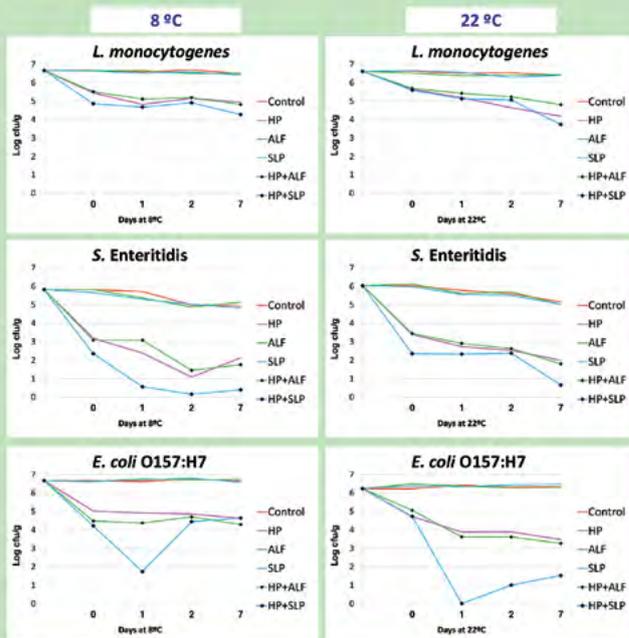
Se aplicaron altas presiones a 450 MPa durante 5 min [HP] a 12°C, los bioconservantes lactoferrina activada (ALF) y lactoperoxidasa (SLP), y tratamientos combinados de HP y ALF o SLP. Las muestras se mantuvieron 7 días a 8°C y 22°C. El ensayo se realizó por duplicado.

### RESULTADOS

**L. monocytogenes** Tras la aplicación de los tratamientos se consiguieron reducciones de 1.3, 1.2 y 1.8 logs con HP, HP+ALF y HP+SLP, respectivamente. A los 7 d, se registraron con respecto al carpaccio control descensos de 1.7 (8°C) y 3.2 (22°C) logs en carpaccio HP, 1.9 (8°C) y 1.8 (22°C) logs con la combinación HP+ALF y 2.4 (8°C) y 2.9 (22°C) logs con HP+SLP.

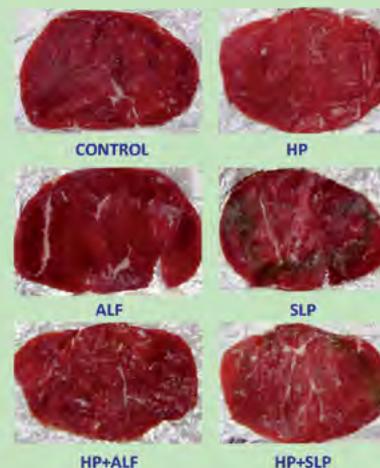
**S. Enteritidis** La reducción con la HP fue de 2.7 logs, con HP+ALF de 3.4 logs y con HP+SLP de 4.1 logs. A los 7 d, las diferencias con el carpaccio control fueron de 3.2 (8°C) y 4.6 (22°C) logs en el carpaccio HP, de 3.6 (8°C) y 4.8 (22°C) logs con la combinación HP+ALF y de 4.9 (8°C) y 5.4 (22°C) logs con HP+SLP.

**E. coli O157:H7** Tras el tratamiento se registraron reducciones de 1.7 logs con HP, 2.3 logs con la combinación HP+ALF y 2.5 logs con HP+SLP. A los 7 d, los niveles del patógeno en carpaccio HP fueron 2.4 (8°C) y 3.0 (22°C) logs menores que en el control, 2.4 (8°C) y 3.0 (22°C) logs en carpaccio con HP+ALF y 2.1 (8°C) y 4.7 (22°C) logs con la combinación HP+SLP.



|         | L*   | a*   | b*  | pH   | a <sub>w</sub> | Fuerza corte |
|---------|------|------|-----|------|----------------|--------------|
| Control | 34.3 | 19.6 | 7.2 | 5.36 | 0.922          | 23.2         |
| HP      | 37.2 | 17.7 | 7.6 | 5.31 | 0.926          | 30.4         |
| ALF     | 30.9 | 20.3 | 6.7 | 5.48 | 0.922          | 23.8         |
| SLP     | 34.9 | 17.3 | 6.7 | 5.44 | 0.923          | 28.4         |
| HP+ALF  | 38.0 | 17.7 | 7.4 | 5.58 | 0.933          | 30.3         |
| HP+SLP  | 38.2 | 17.1 | 7.2 | 5.52 | 0.928          | 43.9         |

Los valores de L\* aumentaron con los tratamientos de alta presión, y a\* tendió a disminuir, mientras que b\* no resultó prácticamente afectada. La a<sub>w</sub> aumentó ligeramente en las muestras presurizadas. Los valores de resistencia al corte tendieron a incrementarse en el carpaccio tratado.



### CONCLUSIONES

Las altas presiones a 450 MPa durante 5 min inactivaron a *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7 1.3, 2.7 y 1.7 logs, respectivamente. La aplicación individual de lactoferrina o de lactoperoxidasa no afectó a los patógenos. La combinación alta presión y sistema lactoperoxidasa proporcionó un efecto bactericida sinérgico frente a *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7



# PROCARTE. Acción:3

## Efecto de la Aplicación de Pulsos de Luz de Alta Intensidad en la Inactivación de Virus Entéricos en Jamón Cocido



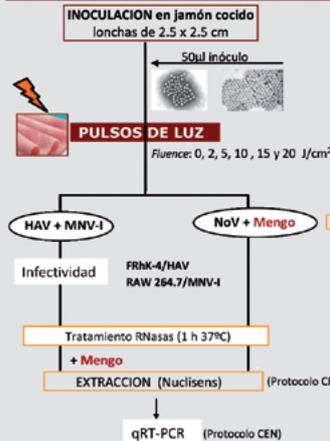
Beguiristain N, Fuentes C, Pintó RM, Bosch A.

Virus Entéricos, Dep. Microbiología e Instituto de Nutrición y Seguridad Alimentaria, Universidad de Barcelona,

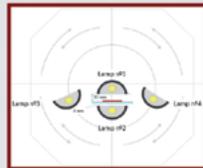
### Objetivos

- Determinar la sensibilidad de los virus modelo más relevantes de transmisión alimentaria (Hepatitis A; Norovirus murino tipo-I y Norovirus humano genogrupo I y II) frente a la aplicación de pulsos de luz de amplio espectro de corta duración y alta intensidad en diferentes tipos de jamón, así como su reproducibilidad y aplicación a la industria alimentaria.
- Optimizar los protocolos de cuantificación y detección de virus en este tipo de matrices alimentarias complejas.

### Metodología y Condiciones del Proceso



Equipo: CLARAMOR TECUM. (IRTA)  
3000 Voltios  
Frecuencia entre pulsos: 1 HZ  
300ms/pulsos. 1J/cm² por pulso  
Distancia de la lámpara: 22 mm



| Nº pulsos Aplicados | Fluence J/cm <sup>2</sup> | Temperatura Muestra |        |         |
|---------------------|---------------------------|---------------------|--------|---------|
|                     |                           | Exp. 1              | Exp. 2 | Exp. 3  |
| 2                   | 2.00                      | NG                  | 19.5°C | 21.5°C  |
| 5                   | 5.00                      | NG                  | 21°C   | 20-24°C |
| 10                  | 10.00                     | 40°C                | 34.5°C | 38°C    |
| 15                  | 15.00                     | 45°C                | 47°C   | 48°C    |
| 20                  | 20.00                     | 79°C                | 55°C   | 60°C    |

NG: no registrada

- Experimentos independientes distanciados en el tiempo.
- Diferentes matrices de jamón utilizadas.

### Resultados

Como control de la influencia de la matriz alimentaria en la eficiencia del proceso, se llevó a cabo la aplicación de 20 pulsos de luz a una suspensión vírica de HAV de título semejante al inoculado en el jamón; los resultados mostraron una inactivación de -5.46 log<sub>10</sub> (aunque se detectó algo de infectividad residual en la muestra directa) frente a los 1.31 log<sub>10</sub> de inactivación correspondientes a la muestra que contiene la matriz alimentaria.

| Muestra   | Pulsos aplicados | Promedio Log (Ni/No) | Tª Muestra |
|---|------------------|----------------------|------------|
| Suspensión vírica                               | 20               | -5.46                | 53-67°C    |
| Stock vírico inoculado en la matriz alimentaria | 20               | -1.31                | 60°C       |

Tabla 1. Inactivación del HAV en presencia y ausencia de jamón tras la aplicación de 20 pulsos de luz.

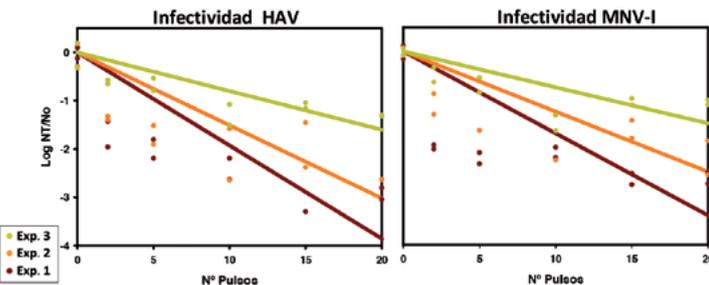


Figura 1. Inactivación de los virus HAV y MNV-I mediante pulsos de luz tras la aplicación de pulsos de luz de hasta 20 J/cm<sup>2</sup> medida en TCID<sub>50</sub>/ml

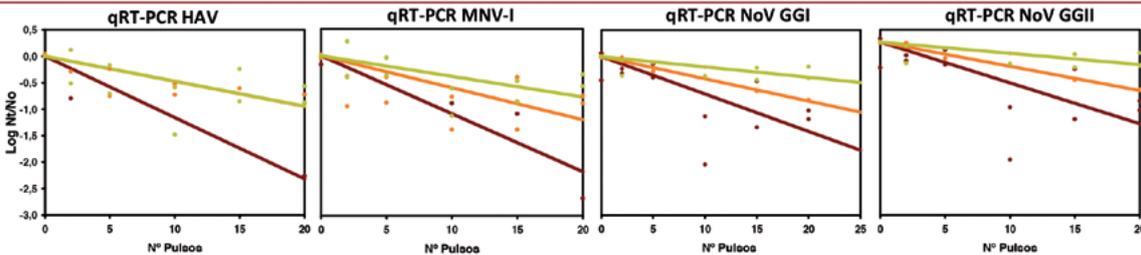


Figura 2. Inactivación de los virus HAV, MNV-I, NoV GGI y NoV GGII tras la aplicación de pulsos de luz de hasta 20 J/cm<sup>2</sup> medida en copias genómicas.

| Virus ensayado | Procedimiento utilizado | Exp. 1   |                  | Exp. 2   |                  | Exp. 3   |                  |
|----------------|-------------------------|--|------------------|--|------------------|--|------------------|
|                |                         | Inactivación en log <sub>10</sub> para las dosis |                  | Inactivación en log <sub>10</sub> para las dosis |                  | Inactivación en log <sub>10</sub> para las dosis |                  |
|                |                         | 12 pulsos  | 20 pulsos        | 12 pulsos  | 20 pulsos        | 12 pulsos  | 20 pulsos        |
| HAV            | Infectividad            | 2.32 (2.26-2.47)                                 | 3.86 (3.61-4.12) | 1.81 (1.68-1.95)                                 | 3.02 (2.80-3.25) | 0.96 (0.90-1.03)                                 | 1.60 (1.50-1.71) |
|                | RNasas + qRT-PCR        | 1.39 (1.12-1.66)                                 | 2.32 (1.87-2.77) | 0.57 (0.51-0.63)                                 | 0.95 (0.77-1.13) | 0.57 (0.49-0.64)                                 | 0.94 (0.82-1.06) |
| MNV-I          | Infectividad            | 2.04 (1.84-2.21)                                 | 3.40 (3.11-3.68) | 1.50 (1.16-1.34)                                 | 2.49 (2.31-2.67) | 0.89 (0.68-0.81)                                 | 1.49 (1.36-1.62) |
|                | RNasas + qRT-PCR        | 1.00 (0.35-1.65)                                 | 1.66 (0.57-2.75) | 0.72 (0.64-0.80)                                 | 1.20 (1.06-1.34) | 0.46 (0.41-0.52)                                 | 0.77 (0.68-0.87) |
| NoV GGI        | RNasas + qRT-PCR        | 0.85 (0.76-0.93)                                 | 1.42 (1.26-1.57) | 0.51 (0.49-0.52)                                 | 0.84 (0.82-0.87) | 0.24 (0.21-0.26)                                 | 0.39 (0.35-0.44) |
|                | RNasas + qRT-PCR        | 0.48 (0.41-0.54)                                 | 0.79 (0.68-0.90) | 0.60 (0.51-0.69)                                 | 1.00 (0.85-1.15) | 0.43 (0.40-0.46)                                 | 0.72 (0.67-0.78) |

Tabla 2. Inactivación en log<sub>10</sub> para 12 y 20 pulsos de luz aplicados en los tres experimentos independientes realizados.

### Conclusiones

- Tras llevar a cabo experimentos independientes utilizando diferentes matrices de jamón, la aplicación de pulsos de luz de hasta 20 J/cm<sup>2</sup> produce una inactivación variable con ratios de inactivación no reproducibles (Figura 1 y Tabla 2).
- Los resultados obtenidos al aplicar un tratamiento previo con RNasas, con el objetivo de optimizar la aproximación qRT-PCR/virus infecciosos, no son consistentes a pesar de observarse una tendencia de inactivación similar (Figura 2).
- Ante la problemática del uso de matrices alimentarias complejas, será necesario optimizar aún más los métodos de detección de virus en este tipo de matrices para poder obtener métodos más simples, eficientes y reproducibles, así como analizar la posible interferencia del tipo y composición de la matriz en la eficacia de la técnica para inactivar los virus (Tabla 1).



**Modelado de la fase de latencia de micropoblaciones de *Listeria innocua***

Juan Aguirre, María Rosa Rodríguez, Gonzalo García de Fernando, Acción 4 PROCARTE  
 Depto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, UCM



**Resumen**

Es probable que en un alimento listo para el consumo recién fabricado se mantengan viables un número pequeño de microorganismos. Así mismo es posible que tales microorganismos hayan sobrevivido a condiciones estresantes. Es obvio que la vida útil de ese producto, desde una perspectiva microbiológica, depende del número inicial de viables, su fase de latencia y su tasa de crecimiento, y estos dos parámetros están condicionados, entre otros factores, por la temperatura de almacenamiento.

El objetivo aquí marcado es el modelado de la fase de latencia de *Listeria innocua*, y su variabilidad (en términos de la desviación estándar, *Sd*), en función de la temperatura de crecimiento, intensidad del tratamiento térmico al que han sobrevivido y el número de células que inician el crecimiento.

Se ha observado que la fase de latencia presenta una correlación negativa con el tamaño del inóculo y la temperatura de crecimiento y positiva con la intensidad del tratamiento. Ambos modelos se han validado con muestras de leche experimentalmente contaminadas, observándose unos valores de factor de discrepancia y de sesgo que permiten utilizar el modelo con garantías, tanto de resultados como de seguridad.

**Material y métodos**

- *L. innocua* se trató a 54°C durante tiempos suficientes para reducir la carga microbiana en 0, 1, 3 y 5 ciclos logarítmicos.
- Los microorganismos supervivientes se diluyeron hasta conseguir inóculos entre 1 y 600 ufc/ml y se incubaron (muestras de 300 µl) en el Bioscreen a 7, 11 y 16°C. El número de muestras para cada condición estudiada fue, como mínimo, 50.
- Una vez calculadas las fases de latencia de cada muestra, este parámetro se modeló en función de la temperatura de crecimiento, el estrés térmico previo y el tamaño del inóculo. Así mismo, se modeló la variabilidad de la fase de latencia en términos de la *Sd*.
- Los modelos se validaron con datos experimentales obtenidos en leche.

**MODELOS**

$$\text{Ln(Lag)} = 6,27 - 0,14T - 0,39C + 0,01TD - 0,003T^2 + 0,01D^2$$

$$R^2 = 0,99. \text{ Error cuadrático medio (ECM)} = 9,11$$

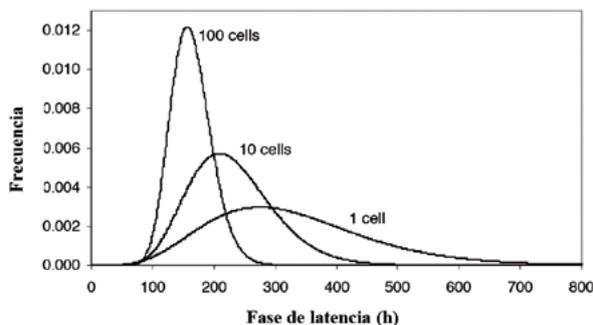
$$\text{Ln(Sd)} = 4,20 + 0,09D - 0,44C + 0,001TD - 0,03TC - 0,01T^2 + 0,01D^2 - 0,06C^2$$

$$R^2 = 0,99. \text{ ECM} = 2,98$$

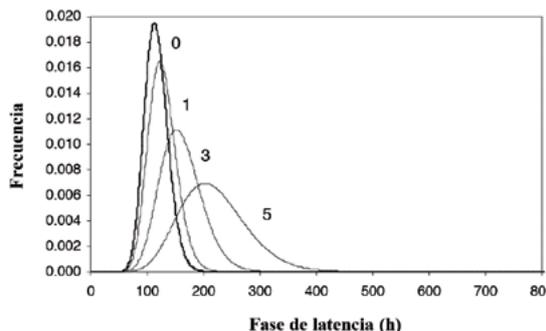
Los modelos permiten predecir las distribuciones de frecuencia (gamma) de fases de latencia mediante las ecuaciones:

Escala = Media / Varianza      Forma = Escala \* Media  
 Siendo la escala y la forma, dos valores que caracterizan la geometría de la distribución gamma.

**Dos ejemplos:**



Predicción de distribución de frecuencias de fases de latencia a 7°C de diferentes inóculos tras un tratamiento térmico que redujo la población en 5 ciclos logarítmicos



Predicción de distribución de frecuencias de fases de latencia de 10 células a 7°C tras haber sufrido diferentes tratamientos térmicos. Los números al lado de las curvas indican la reducción decimal a la que las células han sobrevivido.

**CONCLUSIÓN**

Los modelos desarrollados permiten predecir la distribución de frecuencias de fases de latencia de un microorganismo en función de la reducción decimal a la que haya sobrevivido, la temperatura de crecimiento y el tamaño del inóculo.

Estas predicciones pueden utilizarse en la evaluación cuantitativa de los riesgos microbiológicos



## Efecto del tratamiento con electrones acelerados en las características del lomo fresco de cerdo

IRENE GARCÍA-MÁRQUEZ, MARÍA I. CAMBERO\*, JUAN A. ORDÓÑEZ, MARÍA C. CABEZA  
 Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.



### INTRODUCCIÓN

El lomo fresco de cerdo (*Longissimus dorsi*) es una pieza cárnica que habitualmente llega a minoristas y a grandes supermercados para preparar porciones familiares. En su comercialización, la última operación a la que se somete es una reducción de tamaño para producir cortes (generalmente filetes) que facilitan al consumidor su preparación culinaria en el medio doméstico. Como cualquier carne fresca, el deterioro del lomo de cerdo, por su pH de 5,56 y aw de 0,99, se debe al crecimiento de bacterias Gram negativas, principalmente *Pseudomonas* spp. La vida útil de esta pieza cárnica entera no supera los 5 días y en porciones o filetes apenas un par de días. Cualquier tratamiento o medida que permita incrementar su vida útil tendría un gran interés comercial. En trabajos previos (García-Márquez et al., 2012), hemos demostrado la eficacia de la aplicación de electrones acelerados para prolongar la vida útil (en refrigeración a 4 °C desde 5 hasta 11 y 20 días después de la aplicación de 1 y 2 kGy respectivamente y a 8 °C de 3 a 8 y 16 días). Esta tecnología también permite garantizar un producto libre de *listeria* en un periodo de 11 (con 1 kGy) y 20 (con 2 kGy) días frente a los 3-5 días en producto no tratado. El objetivo del presente estudio es conocer el efecto de estos tratamientos en las características (reológicas, color y sensorial), y en la aceptación del consumidor, de esta pieza cárnica.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Lomo fresco de cerdo



Envasado (en aire) (copolímero: 60 µm poliamida/ polietileno)



Tratamiento con electrones acelerados (0-2 kGy). IONISOS IBERICA (Tarancón, Cuenca)

Características reológicas: Fuerza de ruptura

Color: a\* (rojo), b\* (amarillo), L\* (luminosidad)

Características organolépticas: Prueba triangular y preferencial



Minolta Chroma Meter CR300

Análisis del perfil de textura (TPA)



Olor Apariencia Flavor

150 °C 2 min (70 °C)

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tratamiento (0-2 kGy) con electrones acelerados (TEA) de lomo de cerdo fresco de cerdo en:

#### A) Características reológicas

(fuerza de ruptura y análisis del perfil de textura, TPA)

| Factores | Resistencia a la rotura (N/cm <sup>2</sup> ) |         | Dureza (N) |         | Adhesividad (N/s) |         | Cohesividad |         | Elasticidad (10 <sup>-2</sup> x cm) |         | Masticabilidad (s) |         |
|----------|--|---------|------------|---------|-------------------|---------|-------------|---------|-------------------------------------|---------|--------------------|---------|
|          | F-Ratio                                      | P-Value | F-Ratio    | P-Value | F-Ratio           | P-Value | F-Ratio     | P-Value | F-Ratio                             | P-Value | F-Ratio            | P-Value |
| A: TEA   | 0.72*  | 0.36*   | 1.36*      | 0.03*   | 2.42*             | 0.0001  | 3.85*       | 0.0001  | 0.84*                               | 0.0001  | 4.17*              | 0.0001  |
| B: t. a. | 3.26*  | 0.0001  | 0.63*      | 0.0001  | 13.21**           | 0.0001  | 0.98*       | 0.0001  | 17.7***                             | 0.0001  | 9.47**             | 0.0001  |
| C: T. a. | 0.24*  | 0.0001  | 9.64**     | 0.0001  | 1.38*             | 0.0001  | 1.53*       | 0.0001  | 0.07*                               | 0.0001  | 0.69*              | 0.0001  |

| Factores    | Interacciones |         | Efecto del tratamiento (dosas) <sup>1</sup> |                |
|-------------|---------------|---------|---|----------------|
|             | F-Ratio       | P-Value | F-Ratio                                     | P-Value        |
| A vs B      | 0.11*         | 0.73    | 3.63 ± 0.35 a                               | 31.44 ± 5.57 a |
| A vs C      | 0.59*         | 0.36*   | 0.57 ± 0.13 a                               | 0.50 ± 0.30 ab |
| B vs C      | 0.01*         | 11.94** | 0.45 ± 0.40 b                               | 0.21 ± 0.70 a  |
| A vs B vs C | 0.76*         | 0.36*   | 0.51 ± 0.40 a                               | 0.17 ± 0.40 a  |

Significancia: [n.s.: no significativo (P>0.05)]; \* P<0.05; \*\* P<0.005; \*\*\* P<0.0005. Valores en la misma columna con diferente letra difieren significativamente

t.a.= Tiempo de almacenamiento. T.a.: Temperatura de almacenamiento

#### B) Color

(tendencia al rojo: a\*, tendencia al amarillo: b\* y brillo: L\*)

| Factores | a*      |         | b*      |         | L*      |         |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|          | F-Ratio | P-Value | F-Ratio | P-Value | F-Ratio | P-Value |
| A: TEA   | 31.46   | 0.0000  | 15.57   | 0.0000  | 48.53   | 0.0000  |
| B: t. a. | 10.09   | 0.0001  | 51.33   | 0.0000  | 64.29   | 0.0000  |
| C: T. a. | 16.90   | 0.0000  | 52.23   | 0.0000  | 15.82   | 0.0000  |

| Factores    | Interacciones |         | Efecto del tratamiento <sup>1</sup> |                |
|-------------|---------------|---------|-------------------------------------|----------------|
|             | F-Ratio       | P-Value | F-Ratio                             | P-Value        |
| A vs B      | 1.48          | 0.2010  | 7.90 ± 0.28 a                       | 6.39 ± 0.35 b  |
| A vs C      | 4.45          | 0.0018  | 8.29 ± 0.65 a                       | 55.48 ± 0.87 b |
| B vs C      | 1.35          | 0.2500  | 8.05 ± 0.67 a                       | 57.74 ± 0.77 a |
| A vs B vs C | 2.30          | 0.0200  |                                     |                |

Valores en la misma columna con diferente letra difieren significativamente

#### C) Características organolépticas

C.1) Diferencias significativas (P<0.05) en apariencia (A) y olor (O) detectadas en pruebas triangulares de muestras no tratadas y tratadas (1 y 2 kGy) a los 0 y 5 días de almacenamiento a 4 °C

| Dose (kGy) | 0 | 1                              | 2                              |
|------------|---|--------------------------------|--------------------------------|
| 0          |   | A <sup>0</sup> ,O <sup>0</sup> | A <sup>0</sup> ,O <sup>0</sup> |
| 1          |   | O <sup>1</sup>                 | A <sup>1</sup> ,O <sup>1</sup> |
| 2          |   |                                | A <sup>2</sup> ,O <sup>2</sup> |

C.2) Evaluación de la preferencia sensorial de muestras no tratadas y tratadas (1 y 2 kGy) a los 0 y 5 días de almacenamiento a 4 °C

| Dosis (kGy) | Puntuación total              |    |      |      |        |    |
|-------------|-------------------------------|----|------|------|--------|----|
|             | Apariencia                    |    | Olor |      | Flavor |    |
|             | Días de almacenamiento a 4 °C |    |      |      |        |    |
| 0           | 60 a                          | 36 | 60 a | 32 b | 40     | 38 |
| 1           | 30 b                          | 38 | 34 b | 51 a | 42     | 44 |
| 2           | 30 b                          | 46 | 26 b | 37 b | 38     | 38 |

\*Prueba de ordenación [Puntuación= [(N<sub>1</sub>×1) + (N<sub>2</sub>×2) + (N<sub>3</sub>×3)], siendo N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub> y N<sub>3</sub> número de panelistas que ordenaron la muestra en la posición 1 (mínima preferencia), 2 (intermedia preferencia) o 3 (máxima preferencia). Valores en columna con diferente letra difieren significativamente (P<0.05)



2 1,5 1 0 kGy

### CONCLUSIONES

El tratamiento del lomo fresco de cerdo con electrones acelerados:

- 1) No modifica las características reológicas
- 2) Reduce el enrojecimiento e incrementa la tonalidad amarillenta y el brillo de la superficie
- 3) No produce cambios en el sabor del producto cocinado
- 4) Modifica la apariencia y el olor inmediatamente después del tratamiento, reduciendo la aceptación sensorial del producto. Sin embargo, la carne tratada después de cinco días en almacenamiento a 4 °C presenta una calidad sensorial igual o superior a la del producto control

REFERENCIAS: García-Márquez I, Cambero MI, Ordóñez JA, Cabeza MC. Shelf-life extension and sanitation of fresh pork loin by E-beam treatment. J Food Protect (En prensa)

AGRADECIMIENTOS: Financiado por los proyectos del MICINN: Consolider-Ingenio 2010. CSD 2007-00016, AGL2010-19158 y Grupos de Investigación Santander-UCM Grupo: 920276



## Eficacia de la tecnología de pulsos de luz para la inactivación de *Salmonella Typhimurium* en lonchas de salchichón



Xavier F. Hospital, Serena Cammarota, Mónica Gañán, Eva Hierro y Manuela Fernández  
 Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

### INTRODUCCIÓN

Los cambios en los estilos de vida y las preferencias de los consumidores han propiciado el desarrollo de una gran variedad de alimentos listos para el consumo, conocidos como RTE ("Ready To Eat"). En esta categoría se incluyen todos aquellos productos que no precisan de un tratamiento higienizante previo al consumo, como los embutidos loncheados. Los embutidos crudos curados, aunque son productos muy seguros desde el punto de vista microbiológico por su bajo pH y  $a_w$  y por los conservantes que contienen, pueden contaminarse superficialmente durante el loncheado con microorganismos patógenos y alterantes presentes en los equipos y manipuladores. El uso de tecnologías no térmicas de higienización superficial, como los pulsos de luz (PL), podría ser una alternativa para garantizar su seguridad. Esta tecnología consiste en la aplicación de luz de amplio espectro (200-1100 nm) en forma de pulsos cortos ( $10^{-3}$ - $10^{-2}$  milisegundos), siendo el componente UV-C el principal responsable de la inactivación microbiana.

### OBJETIVOS

El objetivo del estudio fue determinar la utilidad de los pulsos de luz para la inactivación de *Salmonella Typhimurium* en lonchas de salchichón.

### MATERIALES Y MÉTODOS



### RESULTADOS

Inmediatamente tras el tratamiento se obtuvieron reducciones de *Salmonella Typhimurium* comprendidas entre 0,3 y 1,5 log ufc/cm<sup>2</sup>, dependiendo de la fluencia aplicada. Las diferencias entre los recuentos de supervivientes a los distintos tratamientos disminuyeron durante el almacenamiento en refrigeración a 4 °C.

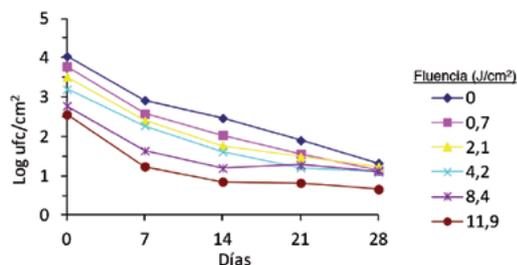


Figura 1. Inhibición de *Salmonella Typhimurium* en lonchas de salchichón envasadas al vacío aplicando diferentes fluencias de luz pulsada.

### CONCLUSIONES

El tratamiento con pulsos de luz proporcionó un razonable nivel de inactivación de *Salmonella Typhimurium* en la superficie de las lonchas de salchichón. Para incrementar la seguridad de los embutidos RTE se podría valorar la combinación de los PL con otras tecnologías no térmicas.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha llevado a cabo como parte de las actividades del Proyecto Consolider-Ingenio-CSD 2007-00016 (Ministerio de Educación y Ciencia) y AGL2011-29325 (Ministerio de Economía y Competitividad). Mónica Gañán es beneficiaria de un contrato postdoctoral del Programa Internacional de Captación de Talento (PICATA), del Campus de Excelencia Internacional de Moncloa (UCM-UPM, INIA).



## Efecto de la aplicación de electrones acelerados en características físicas de lomo fresco y adobado de cerdo

IRENE GARCÍA-MÁRQUEZ, MARÍA I. CAMBERO, JUAN A. ORDÓÑEZ, MARÍA C. CABEZA  
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.

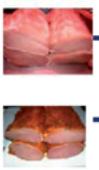


### INTRODUCCIÓN

El lomo (*Longissimus dorsi*), fresco y adobado, de cerdo es una de las piezas cárnicas porcinas de mayor demanda. A pesar del almacenamiento en refrigeración que se exige para su distribución, su vida útil es corta, no más de 4-6 días en aire y algo más de una semana a vacío. Cualquier método que permita ralentizar su deterioro conlleva un beneficio comercial considerable, siempre que se aseguren unas buenas condiciones higiénicas. En trabajos previos (García-Márquez et al., 2012a,b), hemos demostrado que la aplicación de electrones acelerados a dosis entre 1-2 kGy, tanto en lomos frescos como adobados, permite al menos duplicar su vida útil, garantizándose además un producto libre de *Listeria* y sin causar cambios sustanciales en las características sensoriales del mismo. El presente trabajo se ha realizado con el objetivo de estudiar el efecto de estos tratamientos en la interacción del agua con los componentes miofibrilares a través de la estimación de distintas características físicas como la actividad de agua ( $a_w$ ), la capacidad de retención de agua (CRA), y las pérdidas en el cocinado y por goteo de la carne. Estos atributos tienen una notable repercusión en las características tecnológicas y sensoriales del producto.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### Lomo fresco de cerdo



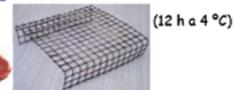
Envasado (en aire)

IONISOS IBERICA (Tarancón, Cuenca)

Tratamiento con electrones acelerados (0-2 kGy).

(capolímico: 60  $\mu$ m poliamida/polietileno)

#### Lomo adobado de cerdo



### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modificaciones del pH, actividad de agua ( $a_w$ ), capacidad de retención de agua (CRA), pérdidas de cocinado y pérdidas por goteo derivadas de la aplicación (0-2 kGy) de electrones acelerados en:

#### A) Lomo fresco de cerdo

|                           | Tiempo de almacenaje (días) | Dosis (kGy)      |                   |                  |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|-------------------|------------------|
|                           |                             | 0                | 1                 | 2                |
| pH                        | 0                           | 5,55 ± 0,04      | 5,57 ± 0,03       | 5,49 ± 0,06      |
|                           | 5                           | 5,61 ± 0,05      | 5,52 ± 0,06       | 5,54 ± 0,06      |
| $a_w$                     | 0                           | 0,989 ± 0,001 A  | 0,987 ± 0,002 A   | 0,986 ± 0,002    |
|                           | 5                           | 0,984 ± 0,001 B  | 0,983 ± 0,001 B   | 0,984 ± 0,001    |
| CRA (%)                   | 0                           | 32,76 ± 4,17 B a | 30,99 ± 2,82 B ab | 28,53 ± 1,40 B b |
|                           | 5                           | 52,75 ± 2,15 A a | 52,11 ± 3,97 A ab | 46,94 ± 1,56 A b |
| Pérdidas por cocinado (%) | 0                           | 31,23 ± 2,65     | 31,69 ± 1,37      | 30,77 ± 3,12     |
|                           | 5                           | 32,78 ± 2,17     | 30,49 ± 3,70      | 29,59 ± 4,26     |
| Pérdidas por goteo (%)    | 0                           | 2,72 ± 1,47 b    | 4,73 ± 1,09 b     | 7,24 ± 1,89 a    |
|                           | 5                           | 3,04 ± 1,11 b    | 3,19 ± 1,70 b     | 9,74 ± 2,10 a    |



Exudado liberado (5 días de almacenamiento a 4 °C)

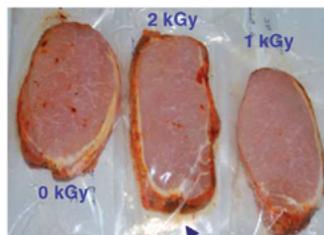


Abundante liberación de exudado (día 0)

Tras el tratamiento con electrones acelerados la carne se almacenó a 4 °C. Valores medios en la misma columna con diferente letra mayúscula difieren significativamente ( $P < 0,05$ ). Valores medios en la misma fila con diferente letra minúscula difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

#### B) Lomo adobado de cerdo

|                           | Tiempo de almacenaje (días) | Dosis (kGy)     |                  |                  |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------|------------------|------------------|
|                           |                             | 0               | 1                | 2                |
| pH                        | 0                           | 5,71 ± 0,04     | 5,69 ± 0,02      | 5,74 ± 0,04      |
|                           | 8                           | 5,69 ± 0,03     | 5,68 ± 0,02      | 5,70 ± 0,03      |
| $a_w$                     | 0                           | 0,992 ± 0,003 A | 0,990 ± 0,003 A  | 0,989 ± 0,002    |
|                           | 8                           | 0,986 ± 0,001 B | 0,984 ± 0,002 B  | 0,987 ± 0,003    |
| CRA (%)                   | 0                           | 41,37 ± 2,7 B b | 51,37 ± 8,15 A a | 48,32 ± 1,78 A a |
|                           | 8                           | 54,32 ± 1,8 A a | 36,64 ± 6,9 B b  | 43,51 ± 3,2 B b  |
| Pérdidas por cocinado (%) | 0                           | 31,44 ± 4,02    | 28,76 ± 3,62     | 29,88 ± 3,34     |
|                           | 8                           | 27,53 ± 2,34    | 32,74 ± 3,95     | 31,43 ± 3,56     |
| Pérdidas por goteo (%)    | 0                           | 2,91 ± 1,27     | 2,23 ± 1,10      | 2,48 ± 1,07      |
|                           | 8                           | 2,05 ± 1,09     | 3,42 ± 1,15      | 2,87 ± 0,97      |



Exudado liberado (8 días de almacenamiento a 4 °C)



Mínima liberación de exudado (0 días)

### CONCLUSIONES

La aplicación de electrones acelerados (1 y 2 kGy):

- 1) No modifica el pH del lomo (tanto fresco como adobado)
- 2) No modifica la  $a_w$  de los lomos frescos y adobados
- 3) La capacidad de retención de agua (CRA) del lomo fresco se reduce con la aplicación de 2 kGy, incrementándose las pérdidas por goteo. El adobado evita este efecto, presentando entonces los lomos un comportamiento totalmente opuesto: la CRA se incrementa con el tratamiento con electrones acelerados sin que se modifiquen las pérdidas por goteo.
- 4) No afecta a las pérdidas por cocinado de lomos fresco y adobados.

REFERENCIAS: Aaslyng MD, Bejerholm C, Ertbjerg P, Bertram HC, Andersen HJ. 2003. Food Qual Prefer. 14: 277-288. García-Márquez I, Cambero MI, Ordóñez JA, Cabeza MC. 2012a. Food Protect (En prensa). García-Márquez I, Cambero MI, Ordóñez JA, Cabeza MC. 2012b. Inter J Microbiol (En prensa). Kauffman RG, Eikelenboom G, van der Wal PG, Merkus G, Zaar M. 1986. Meat Sci. 18:191-198. Honikel OK. 1998. Meat Sci. 49:447-457

AGRADECIMIENTOS: Financiado por los proyectos del MICINN: Consolider-Ingenio 2010, CSD 2007-00016, AGL2010-19158 y Grupos de Investigación Santander-UCM Grupo: 920276



## Efecto del envasado en atmósfera modificada y las altas presiones hidrostáticas sobre la vida útil del lacón loncheado.

A. del Olmo, J. Calzada & M. Nuñez  
Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA, Madrid.

### INTRODUCCIÓN

El lacón es la extremidad anterior o brazuelo del cerdo, sometido a un proceso de salado o curado y posterior cocción, y en algunos casos ahumado. Estudios previos (Vilar *et al.* 2000; Lorenzo *et al.* 2008a,b; Purriños *et al.* 2011) han descrito diversos aspectos del lacón, como características fisicoquímicas y organolépticas, proteólisis, lipólisis, oxidación, perfil de compuestos volátiles y microbiología, bien a lo largo del proceso de elaboración o bien sobre el producto final, pero ninguno evalúa dichos aspectos a lo largo de la vida útil o comercial del producto ya elaborado. En este trabajo hemos investigado la evolución de pH, color, características organolépticas y calidad microbiológica a lo largo de la vida útil del lacón. Se emplearon bandejas comerciales de lacón y loncheado y empaquetado, listo para su consumo como producto RTE..

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se procesaron por duplicado 36 bandejas de lacón cortado a cuchillo, sometidas a distinto tipo de envasado o tratamiento: envasado en MAP (presentación comercial habitual), envasado a vacío, y envasado a vacío y posterior tratamiento con 500 o 600 MPa durante 5 min a 12 °C. Las bandejas se conservaron a 4 °C y se analizaron los días 1, 30 y 60. El período de vida útil de este lacón comercial es de 45 días. Los análisis incluyeron determinación de pH (pHmetro Crison con electrodo de penetración) y de color (colorímetro Minolta, en el espacio CIELAB), evaluación organoléptica (panel de 19 catadores) y análisis microbiológico (mediante siembras en los medios recogidos en la Figura 1).

### RESULTADOS

El pH (datos no mostrados) varió entre 6.03 y 6.28 en el día 1. A los 30 días alcanzó 6.28-6.35 en las muestras presurizadas frente a 6.03 en vacío control y 6.05 en MAP. A los 60 días los valores de pH oscilaron entre 5.87 para vacío control y 6.62 para el envasado en MAP.

En cuanto a la **evaluación colorimétrica** (datos no mostrados) se observó una gran heterogeneidad del producto así como una disminución de luminosidad ( $L^*$ ) y un aumento de tendencia al amarillo ( $b^*$ ), saturación ( $h$ ) y cromaticidad ( $C$ ) durante el primer mes, y una disminución de  $b^*$  y  $h$  en el segundo mes. El envasado en MAP conservó mejor los parámetros  $L^*$ ,  $h$  y  $C$  pero también aumentó  $b^*$ . El envasado a vacío mejoró el parámetro  $a^*$  (tendencia al rojo), y la presurización indujo una disminución de  $b^*$  pero también indujo una pérdida de cromaticidad.

Las **características organolépticas** (datos no mostrados) no se vieron prácticamente afectadas durante los dos meses de conservación, obteniéndose puntuaciones aceptables para todos los descriptores evaluados ( $> 5$  para intensidad,  $> 6$  para calidad, próximos a 5 para salado y textura, próximos a 1 para sabor ácido, y  $< 0.7$  para sabor pútrido y rancio). Se observó una cierta tendencia en el tiempo a disminuir las puntuaciones de calidad y aumentar las de sabor pútrido. A día 1 no se encontraron diferencias entre tratamientos para ningún descriptor. A día 30 las muestras envasadas en MAP obtuvieron puntuaciones significativamente ( $P < 0.05$ ) más bajas de intensidad y calidad de sabor que el resto, pero a día 60 desaparecieron de nuevo las diferencias significativas entre muestras para todos los descriptores evaluados.

En cuanto a los **análisis microbiológicos** (Tabla 1) se observó entre los días 1 y 30 un marcado incremento para todos los grupos microbianos evaluados, excepto esporulados, estafilococos, *L. monocytogenes*, levaduras y mohos. Durante el segundo mes el incremento microbiano fue mucho menos pronunciado, excepto para esporulados, *Enterococcus* y levaduras que aumentaron notablemente. El envasado en MAP presentó los niveles más altos de bacterias totales aerobias durante toda la conservación, manteniendo sin embargo bajos niveles de *Enterococcus*. El envasado a vacío (sin HHP) presentó mayores niveles de bacterias anaerobias, esporuladas, *Pseudomonadaceae*, gram negativas, bacterias lácticas, lactobacilos y *Enterococcus*, aunque menores de *Brochothrix*, y fueron las únicas muestras en que se detectó la presencia de *L. monocytogenes* ( $< 2$  log ufc/g). La presurización logró disminuir los niveles de todos los grupo microbianos. No obstante, durante la conservación se fue produciendo una recuperación microbiana especialmente marcada en las muestras presurizadas a 600 MPa, de tal modo que las muestras presurizadas a 500 MPa mantuvieron niveles más bajos de gram negativas, *Pseudomonadaceae*, enterobacterias y levaduras que las presurizadas a 600 MPa. De hecho sólo las muestras presurizadas a 500 MPa se ajustaron a la Norma de calidad microbiológica para productos cárnicos RTE (Gilbert *et al.* 2002), tanto a día 30 como a día 60.

### CONCLUSIÓN

El lacón una vez cortado es altamente perecedero. A pesar de no tener alterados ciertos parámetros (color, pH o características organolépticas) podría presentar una baja calidad microbiológica al cabo de 30 días. El envasado a vacío en combinación con la presurización a 500 MPa durante 5 minutos permite mejorar sus características higiénico-sanitarias..

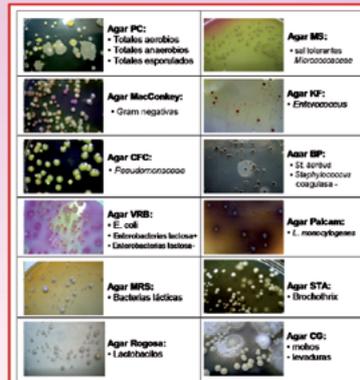


Figura 1. Medios empleados para la determinación de los distintos grupos microbianos.

Tabla 1. Grupos microbianos (log ufc/g) en lacón a lo largo de la conservación a 4 °C.

| Tiempo  | Grupo microbiano          | Vacío control  | 500 MPa vacío  | 600 MPa vacío  | MAP            |
|---------|---------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 día   | Totales aerobios          | 4.18 ± 0.08 b  | 2.53 ± 0.31 a  | 2.63 ± 0.13 a  | 4.45 ± 0.06 b  |
|         | Totales anaerobios        | 2.35 ± 0.13 b  | 1.85 ± 0.09 a  | 1.85 ± 0.09 a  | 3.10 ± 0.14 c  |
|         | Totales esporulados       | nd             | nd             | nd             | nd             |
|         | Gram negativas            | 3.02 ± 0.05 a  | nd             | nd             | 3.20 ± 0.05 b  |
|         | <i>Pseudomonadaceae</i>   | 2.39 ± 0.12 a  | nd             | nd             | 2.60 ± 0.13 a  |
|         | <i>Escherichia coli</i>   | nd             | nd             | nd             | nd             |
|         | <i>Enterob. lactosa</i> + | nd             | nd             | nd             | 1.08 ± 0.62    |
|         | <i>Enterob. lactosa</i> - | 0.85 ± 0.49 a  | nd             | nd             | 2.00 ± 0.00 b  |
|         | Bacterias lácticas        | 1.08 ± 0.62 a  | nd             | nd             | 2.00 ± 0.00 a  |
|         | Lactobacilos              | nd             | nd             | nd             | nd             |
|         | Microcococaceae           | 3.30 ± 0.01 a  | nd             | nd             | 3.57 ± 0.10 b  |
|         | <i>Enterococcus</i>       | nd             | nd             | nd             | 2.53 ± 0.06    |
|         | <i>St. aureus</i>         | nd             | nd             | nd             | 1.93 ± 0.14    |
|         | Otros estafilococos       | 1.00 ± 0.58 a  | nd             | nd             | 2.70 ± 0.10 b  |
|         | <i>L. monocytogenes</i>   | nd             | nd             | nd             | nd             |
|         | <i>Brochothrix</i>        | 3.83 ± 0.05 b  | 0.93 ± 0.54 a  | nd             | 4.02 ± 0.03 b  |
|         | Levaduras                 | 1.00 ± 0.58 a  | nd             | nd             | 2.00 ± 0.00 a  |
| Mohos   | nd                        | nd             | nd             | nd             |                |
| 30 días | Totales aerobios          | 8.12 ± 0.01 c  | 7.68 ± 0.06 b  | 7.07 ± 0.04 a  | 8.47 ± 0.02 d  |
|         | Totales anaerobios        | 8.09 ± 0.03 c  | 7.01 ± 0.06 b  | 6.66 ± 0.01 a  | 8.39 ± 0.01 d  |
|         | Totales esporulados       | nd             | nd             | nd             | nd             |
|         | Gram negativas            | 6.69 ± 0.04 d  | 3.13 ± 0.06 a  | 5.75 ± 0.05 b  | 6.17 ± 0.03 c  |
|         | <i>Pseudomonadaceae</i>   | 6.70 ± 0.04 d  | 2.90 ± 0.11 a  | 5.78 ± 0.07 b  | 6.25 ± 0.04 c  |
|         | <i>Escherichia coli</i>   | 5.19 ± 0.06 b  | 2.12 ± 0.12 a  | 1.35 ± 0.45 a  | 5.67 ± 0.04 b  |
|         | <i>Enterob. lactosa</i> + | 5.72 ± 0.02 c  | 2.63 ± 0.13 a  | 5.39 ± 0.07 b  | 5.80 ± 0.05 c  |
|         | <i>Enterob. lactosa</i> - | 5.10 ± 0.10 c  | 1.93 ± 0.14 a  | 3.55 ± 0.09 b  | 5.05 ± 0.07 c  |
|         | Bacterias lácticas        | 7.73 ± 0.04 d  | 5.74 ± 0.29 b  | 4.20 ± 0.05 a  | 8.14 ± 0.01 c  |
|         | Lactobacilos              | 4.90 ± 0.02 b  | 5.14 ± 0.16 b  | 1.85 ± 0.09 a  | 6.94 ± 0.02 c  |
|         | Microcococaceae           | 6.73 ± 0.07 ab | 6.75 ± 0.11 ab | 6.42 ± 0.07 a  | 6.64 ± 0.11 b  |
|         | <i>Enterococcus</i>       | 3.89 ± 0.14 b  | nd             | nd             | 1.85 ± 0.09 a  |
|         | <i>St. aureus</i>         | nd             | nd             | nd             | nd             |
|         | Otros estafilococos       | 1.85 ± 0.09 a  | nd             | nd             | 2.29 ± 0.18 b  |
|         | <i>L. monocytogenes</i>   | 1.77 ± 0.08    | nd             | nd             | nd             |
|         | <i>Brochothrix</i>        | 7.05 ± 0.05 ab | 7.32 ± 0.04 b  | 6.62 ± 0.22 a  | 6.73 ± 0.09 a  |
|         | Levaduras                 | 2.61 ± 0.08    | nd             | nd             | nd             |
| Mohos   | nd                        | nd             | nd             | nd             |                |
| 60 días | Totales aerobios          | 8.54 ± 0.02 c  | 7.63 ± 0.11 a  | 8.10 ± 0.08 b  | 8.02 ± 0.06 d  |
|         | Totales anaerobios        | 7.68 ± 0.03 b  | 7.19 ± 0.02 a  | 7.51 ± 0.17 ab | 7.29 ± 0.07 ab |
|         | Totales esporulados       | 4.06 ± 0.27 b  | 2.48 ± 0.16 a  | 3.27 ± 0.25 ab | 3.29 ± 0.07 ab |
|         | Gram negativas            | 7.02 ± 0.11 c  | 3.17 ± 0.06 a  | 6.08 ± 0.60 bc | 5.64 ± 0.06 b  |
|         | <i>Pseudomonadaceae</i>   | 6.91 ± 0.02 c  | 2.85 ± 0.09 a  | 6.20 ± 0.45 bc | 5.56 ± 0.10 b  |
|         | <i>Escherichia coli</i>   | 3.90 ± 0.13 a  | nd             | nd             | 4.29 ± 0.41 a  |
|         | <i>Enterob. lactosa</i> + | 5.95 ± 0.10 b  | 2.20 ± 0.12 a  | 5.24 ± 0.64 b  | 4.95 ± 0.43 b  |
|         | <i>Enterob. lactosa</i> - | 6.85 ± 0.04 c  | 2.87 ± 0.11 a  | 5.71 ± 0.35 b  | 5.35 ± 0.09 b  |
|         | Bacterias lácticas        | 7.89 ± 0.19 b  | 7.09 ± 0.03 a  | 7.23 ± 0.09 a  | 7.28 ± 0.04 ab |
|         | Lactobacilos              | 6.82 ± 0.10 c  | 6.27 ± 0.16 b  | 6.72 ± 0.09 bc | 4.64 ± 0.12 a  |
|         | Microcococaceae           | 6.38 ± 0.06 b  | 4.08 ± 0.08 a  | 4.59 ± 0.26 a  | 6.95 ± 0.13 b  |
|         | <i>Enterococcus</i>       | 6.10 ± 0.04 c  | 3.25 ± 0.06 b  | 2.30 ± 0.12 a  | 2.00 ± 0.17 a  |
|         | <i>St. aureus</i>         | nd             | nd             | nd             | nd             |
|         | Otros estafilococos       | 1.93 ± 0.14 a  | nd             | nd             | 1.70 ± 0.01 a  |
|         | <i>L. monocytogenes</i>   | 1.55 ± 0.09    | nd             | nd             | nd             |
|         | <i>Brochothrix</i>        | 6.78 ± 0.13 a  | 7.64 ± 0.06 b  | 8.02 ± 0.10 c  | 8.90 ± 0.06 d  |
|         | Levaduras                 | 2.49 ± 0.08 b  | nd a           | 3.43 ± 0.17 c  | 5.02 ± 0.17 d  |
| Mohos   | nd                        | nd             | nd             | nd             |                |

Se muestran los valores medios ± error estándar (n = 4). nd, no detectado.

\*Valores distintos entre columnas dentro de la misma fila indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) por el test de Tukey, entre muestras para cada tiempo de conservación y grupo microbiano.



### REFERENCIAS

- Gilbert RJ, *et al.* 2002. *Commun. Dis. Pub. Health* 3: 163-167.
- Lorenzo JM, *et al.* 2008a. *Food. Chem.* 110: 137-149.
- Lorenzo JM, *et al.* 2008b. *Food Control* 19: 1148-1158.
- Purriños L, *et al.* 2011. *J. Food. Sci.* 76: C89-C97.
- Vilar I, *et al.* 2000. *J. App. Microbiol.* 89: 1018-1026.

## INACTIVACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN JAMÓN COCIDO MEDIANTE TRATAMIENTOS COMBINADOS DE ALTAS PRESIONES Y REUTERINA, LACTOPEROXIDASA O LACTOFERRINA

Raquel Montiel, Izaskun Martín-Cabrejas, Margarita Medina  
Dpto. de Tecnología de Alimentos, INIA, Madrid

### INTRODUCCIÓN

Los productos cárnicos RTE (ready-to eat) son susceptibles de contaminación por *Listeria monocytogenes* durante su preparación industrial. Esta contaminación suele producirse principalmente durante el loncheado o empaquetado.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto individual y combinado de las altas presiones (HP) y tres bioconservantes, la reuterina (Reu), el sistema lactoperoxidasa (LPS) y la lactoferrina (LF), sobre *L. monocytogenes* inoculada artificialmente en la superficie de jamón cocido.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se inoculó jamón cocido con *L. monocytogenes* INIA2530 (aprox.  $10^5$  ufc/g) y se mantuvo 24 h a 4°C. Se prepararon muestras no contaminadas para el recuento de microorganismos totales y la determinación del pH,  $a_w$ , color y textura.

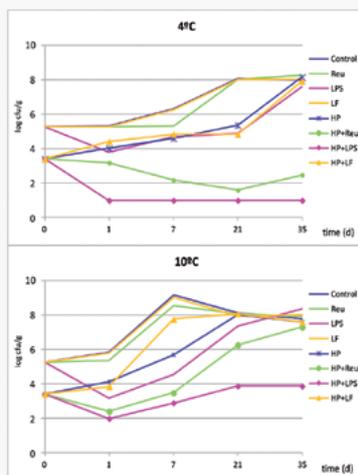
Se aplicaron altas presiones a 450 MPa 5 min, reuterina purificada (8 UR/g), lactoperoxidasa (2.8 U/g), lactoferrina (0.1%) y tratamientos combinados de HP y reuterina, LPS o LF. Las muestras se mantuvieron 35 días a 4 y 10°C. El ensayo se realizó por duplicado.

### RESULTADOS

***L. monocytogenes*** Tras la aplicación de los tratamientos, se consiguieron reducciones superiores a 1.8 logs con HP. A las 24 h, los antimicrobianos Reu y LF aplicados de forma individual no afectaron a la supervivencia del patógeno, mientras que LPS consiguió reducciones de hasta 2 logs. Con la combinación de Reu y LPS con HP aumentó significativamente la inactivación alcanzada por los tratamientos individuales.

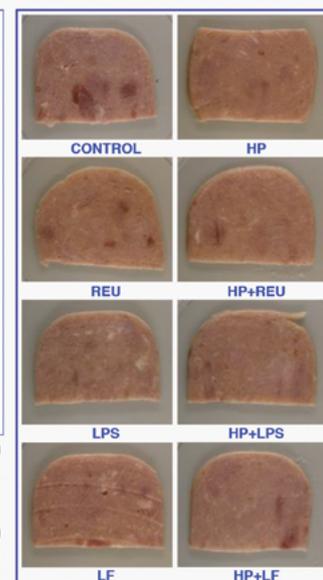
Reu mostró un efecto bacteriostático sobre el patógeno durante 7 a 4°C y 1 d a 10°C. LPS resultó bactericida a las dos temperaturas ensayadas. A los 35 d, tanto en muestras presurizadas como en las tratadas con antimicrobianos aplicados de forma individual no se registraron diferencias respecto a las muestras control. La combinación de HP con Reu o LPS mantuvo los recuentos de *L. monocytogenes* por debajo de 2.5 logs tras 35 d a 4°C y la HP con LPS por debajo de 4 logs a 10°C.

**Microorganismos mesófilos totales** Los recuentos de bacterias totales en el jamón control fueron iguales o inferiores a 2 logs durante los primeros 15 d a las dos temperaturas ensayadas. A los 35 d, dichos recuentos alcanzaron valores de 2.2 y 5.2 logs a 4 y 10°C, respectivamente. A 4°C, todos los tratamientos, excepto LF, mantuvieron los recuentos por debajo de 1 log. A 10°C, con Reu y LPS, individualmente y en combinación con HP se registraron recuentos inferiores a 1 log.



|      | 0 d     | pH    | $a_w$  | $L^*$ | $a^*$ | $b^*$  | $F_{corte}$ |
|------|---------|-------|--------|-------|-------|--------|-------------|
| 4°C  | Control | 6.82  | 0.967  | 60.0  | 10.2  | 8.5    | 7.8         |
|      | HP      | 6.90  | 0.974  | 60.8  | 10.4  | 8.8    | 5.9*        |
|      | Reu     | 6.81  | 0.972  | 60.9  | 10.1  | 9.2    | 6.5*        |
|      | HP+Reu  | 6.85  | 0.977* | 59.9  | 10.5  | 9.3    | 5.9*        |
|      | LPS     | 6.84  | 0.974  | 60.6  | 9.3*  | 10.1   | 5.8*        |
|      | HP+LPS  | 6.86  | 0.978* | 61.1  | 9.1*  | 10.48* | 7.4         |
|      | LF      | 6.85  | 0.976  | 60.2  | 10.7  | 9.2    | 6.3*        |
|      | HP+LF   | 6.87  | 0.980* | 61.3  | 10.1  | 8.7    | 8.2         |
| 35 d | Control | 6.93  | 0.971  | 62.2  | 9.7   | 9.3    | 6.0         |
|      | HP      | 6.96  | 0.971  | 62.5  | 9.8   | 8.8    | 10.0*       |
|      | Reu     | 6.68* | 0.973  | 62.9  | 9.8   | 9.3    | 7.2         |
|      | HP+Reu  | 7.06  | 0.973  | 61.6  | 10.0  | 9.0    | 13.3*       |
|      | LPS     | 7.05  | 0.968  | 61.5  | 8.2*  | 9.3    | 10.7*       |
|      | HP+LPS  | 7.01  | 0.970  | 61.9  | 9.1   | 9.8    | 8.1         |
|      | LF      | 7.07  | 0.969  | 61.4  | 10.4  | 9.1    | 10.0*       |
|      | HP+LF   | 6.91  | 0.972  | 60.6  | 10.3  | 9.2    | 9.1*        |

|      | 0 d     | pH    | $a_w$  | $L^*$ | $a^*$ | $b^*$ | $F_{corte}$ |
|------|---------|-------|--------|-------|-------|-------|-------------|
| 10°C | Control | 6.87  | 0.979  | 59.9  | 10.3  | 9.1   | 8.0         |
|      | HP      | 6.75  | 0.982  | 60.5  | 10.1  | 8.8   | 7.9         |
|      | Reu     | 6.85  | 0.982  | 61.5* | 9.0*  | 10.4  | 8.5         |
|      | HP+Reu  | 6.86  | 0.980  | 61.5* | 10.0  | 8.9   | 8.9         |
|      | LPS     | 6.93  | 0.980  | 60.5  | 10.5  | 8.9   | 9.0         |
|      | HP+LPS  | 6.89  | 0.984* | 60.5  | 10.3  | 9.3   | 7.8         |
|      | LF      | 6.87  | 0.983* | 61.5* | 9.3*  | 10.5  | 7.6         |
|      | HP+LF   | 6.95  | 0.980  | 60.8  | 10.1  | 9.3   | 9.6         |
| 35 d | Control | 7.03  | 0.972  | 60.9  | 10.0  | 8.7   | 11.8        |
|      | HP      | 6.65* | 0.972  | 60.8  | 10.4  | 10.9* | 11.9        |
|      | Reu     | 6.84* | 0.970  | 62.0  | 8.9*  | 10.2* | 10.1        |
|      | HP+Reu  | 6.30* | 0.970  | 61.1  | 10.2  | 9.0   | 10.0        |
|      | LPS     | 6.99  | 0.969  | 60.6  | 10.4  | 9.5   | 19.1*       |
|      | HP+LPS  | 7.04  | 0.968* | 60.3  | 10.6  | 11.0* | 11.5        |
|      | LF      | 7.00  | 0.967* | 62.0  | 8.8*  | 10.0* | 11.6        |
|      | HP+LF   | 6.88  | 0.971  | 61.2  | 10.4  | 9.5   | 13.8        |



**pH y  $a_w$**  Se registraron ligeras diferencias con alguno de los tratamientos, aunque no una tendencia clara.

**Color** Los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  resultaron ligeramente afectados con la adición de Reu, LPS y LF.

**Textura** Los valores de resistencia al corte tendieron a disminuir en jamón cocido tratado con antimicrobianos, aumentado durante el tiempo de refrigeración.

### CONCLUSIONES

La aplicación individual de HP, reuterina o lactoperoxidasa retrasó el crecimiento de *L. monocytogenes* en jamón cocido. La combinación de alta presión y reuterina o lactoperoxidasa proporcionó un efecto bactericida sinérgico frente al patógeno a temperaturas de refrigeración.

**Subproyecto 1: PROCARTE.** Coordinadora: Isabel Cambero  
**Uso de tecnologías emergentes para garantizar la seguridad de los productos listos para el consumo**

**Acción 2 – Tratamiento de productos listos para el consumo mediante bioconservantes naturales y alta presión hidrostática.**

Sara Bover-Cid, Anna Hereu, Anna Jofré, Margarita Garriga, Teresa Aymerich.

IRTA. Programa de Seguretat Alimentària. Finca Camps i Armet, E-17121 Monells, Girona.



**INTRODUCCIÓN**

Las altas presiones hidrostáticas (APH) son una tecnología no térmica muy interesante que se puede aplicar después del envasado. También llamada pasteurización en frío, permite alargar la vida útil del producto así como aumentar su seguridad alimentaria.

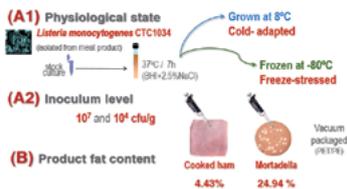
Los modelos predictivos disponibles se centran en la inactivación por APH, sin tener en cuenta la recuperación y el posible crecimiento durante el almacenamiento en refrigeración.

**OBJETIVOS**

- I** Modelizar el crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada en productos cárnicos cocidos, loncheados y envasados al vacío durante el almacenamiento en refrigeración después del procesado por APH (400 MPa 5 min). Como variables objeto de estudio se consideran:
  - (A) *L. monocytogenes*: estado fisiológico (adaptada al frío, estrés por congelación) y nivel de inoculo
  - (B) Producto: contenido en grasa (< 4,5% y > 20%)
  - (C) Temperatura de refrigeración (4-12°C)
- II** Evaluar el comportamiento de los modelos matemáticos desarrollados a partir de datos independientes.

**METODOLOGÍA**

**Sample preparation**



**High hydrostatic pressure processing**

Pressure: 400 MPa Holding time: 5 min Temperature: 19°C  
 \* Came up to 220MPa/min and release (almost immediate) time were not included.  
 † Initial fluid temperature

**Product storage**



**Microbiological determinations**

Presence/absence in 25g  
 TSBYE Enrichment @37°C for 24-48h streaked on CLA  
 PCR confirmation of growth colonies (Aymerich et al., 2005)

**Mathematical modeling**

Primary model → Logistic growth model with delay  

$$\text{Log}(N_t) = \text{Log} \left( \frac{N_{max}}{1 + \left[ \frac{N_{max}}{N_0} - 1 \right] \exp(-\mu_{max} \times (t - \lambda))} \right)$$
 A: lag time (h)  
 μ<sub>max</sub>: growth rate (h<sup>-1</sup>)  
 N<sub>max</sub>: [max. cell conc.]  
 N<sub>0</sub>: [initial conc.]  
 Secondary models → vary kinetic parameters as a function of storage temperature (T)  

$$\sqrt{\mu_{max}} = b \cdot (T - T_{min})$$

$$\lambda = RLT \cdot \ln(2) = \frac{RLT \cdot \ln(2)}{\mu_{max}}$$
 b: constant  
 T: temperature  
 T<sub>min</sub>: theoretical minimum T for growth  
 (Ratkowsky et al. 1982) (Ross and Dalgaard 2004) RLT: relative lag time, GT: generation time

**Model evaluation**

**Statistical performance**  
 - Residual Sum of Squares (RSS)  
 - Root Mean Square Error (RMSE)  
 - Adjusted determination coefficient (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>)  
 - Plot of observed vs fitted values

**Predictive Performance**  
 Comparison of growth predicted by the models with data from independent experiments, performed in cooked ham and mortadella inoculated with a different *L. monocytogenes* isolate, with different physiological states (cold adapted and freeze-stressed) before HHP treatment at 400 MPa (5 min).

**RESULTADOS**

**Mathematical models describing the growth of *L. monocytogenes* in pressurised (400 MPa/5min) RTE cooked meat products during storage as function of temperature (T) and time (t) of storage** (according to Eqn. 1)

Eqn. 1. Model parameters depending on the product and the physiological state of *L. monocytogenes* are shown in Table 1

$$\text{Log}(N_t) = \text{Log} \left( \frac{N_{max}}{1 + \left( \frac{N_{max}}{N_0} - 1 \right) \cdot \exp \left( - (b \cdot (T - T_{min}))^2 \times \left( t - \left( \frac{RLT \cdot \ln(2)}{(b \cdot (T - T_{min}))^2} \right) \right) \right)} \right)$$

Table 1. Growth parameters for *L. monocytogenes* and goodness of fit indexes obtained through the global regression integrating the Ratkowsky square root model (for growth rate) and the relative lag time (RLT) concept into the Logistic model with delay.

|            | Growth model parameters |                       | Lag model parameters    |         | Log N <sub>max</sub> (log cfu/g) | Goodness of fit |       |                               |
|------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|---------|----------------------------------|-----------------|-------|-------------------------------|
|            | b                       | T <sub>min</sub> (°C) | RLT (h)                 | RLT (h) |                                  | RSS             | RMSE  | R <sup>2</sup> <sub>adj</sub> |
| Cooked ham | 0.023                   | -1.40                 | freeze-stressed → 6.43  | → 4.43  | 9.09                             | 913             | 0.894 | 0.88                          |
|            |                         |                       | cold-adapted → 0.00     | → 0.00  |                                  |                 |       |                               |
| Mortadella | 0.024                   | -1.37                 | freeze-stressed → 11.60 | → 11.60 | 8.81                             |                 |       |                               |
|            |                         |                       | cold-adapted → 2.27     | → 2.27  |                                  |                 |       |                               |

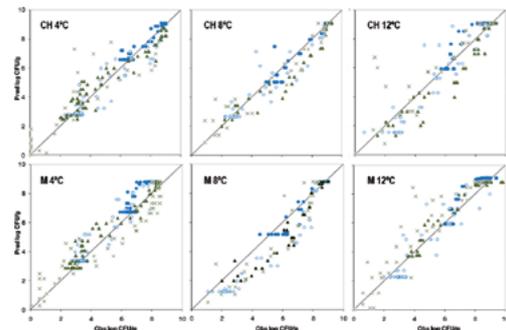


Figure 1. Observed and fitted concentrations of *L. monocytogenes* (log CFU/g). Fitted values were obtained using the global model (Eqn 1, Table 1) for cooked ham (CH) and mortadella (M) inoculated at ca. 10<sup>7</sup> CFU/g (solid symbols) or ca. 10<sup>8</sup> CFU/g (open symbols) with freeze-stressed (●, ○) and cold-adapted (▲, ×) cells before HHP treatment.

**The impact of the physiological state on pressure-related behavior was relevant to:**

- Immediate inactivation: Freeze-stressed cells were piezo-protected in comparison with cold-adapted cells.
- Subsequent growth: Freeze-stressed cells showed a significant or longer lag phase in comparison with cold-adapted cells.

The impact of physiological state would be irrelevant to estimate the time to 2 Log-increase from the contamination level before HHP treatment (Figure 2).

The use of the RLT concept allowed a proper prediction of overall growth behaviour as a function of the physiological state of the pathogen (Figure 3).

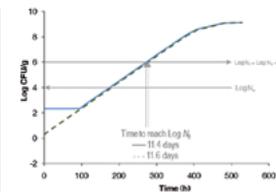


Figure 2. Predicted growth of *L. monocytogenes* (— previously frozen at -80°C and - - - cold-adapted at 8°C), inoculated on cooked ham (N<sub>0</sub> = 10<sup>8</sup> CFU/g) and mortadella (N<sub>0</sub> = 10<sup>7</sup> CFU/g) pressurized at 400 MPa (5 min) and stored at 8°C, according to the model of Eqn 1 and Table 1.

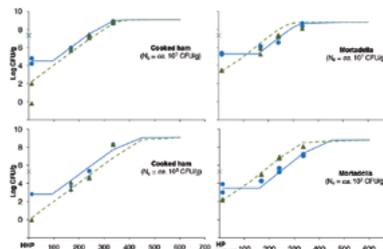


Figure 3. Observed responses of *L. monocytogenes* CTC 1587 applying freeze-stress (at -80°C, ●) or cold-adaptation (at 8°C, ▲) before its inoculation onto cooked ham and mortadella, pressurized at 400 MPa for 5 min and stored at 8°C (Bover-Cid et al. in preparation). Predicted growth for freeze-stressed cells (—) and cold-adapted cells (- - -) according to the developed model (Eqn 1, Table 1). Log N<sub>0</sub> being the observed *L. monocytogenes* counts after the HHP.

**BIBLIOGRAFIA:**

- Bover-Cid S., Hereu A., Garriga M., Aymerich T. (2011). Communication, Summer Conference of the Society for Applied Microbiology, Dublin, Ireland.
- Bover-Cid S., Hereu A., Garriga M., Aymerich T. (2011). Communication, TUBETAK-MAM 4th International Congress on Food and Nutrition and SAFE Consortium 3rd International Congress on Food Safety, Istanbul, Turkey.
- Bover-Cid S., Hereu A., Dalgaard P., Garriga M., Aymerich T. (2013). Communication, 8<sup>th</sup> International Conference on Predictive Modeling of Food, Paris, France.
- Hereu A., Dalgaard P., Garriga M., Aymerich T., Bover-Cid S. (2012). Communication, 23rd International ICFMH Symposium, FoodMicro 2012, Global Issues in Food Microbiology, Istanbul, Turkey.
- Hereu A., Dalgaard P., Garriga M., Aymerich T., Bover-Cid S. (2013). Understanding and modeling the quantitative growth of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products after high pressure processing, *International Journal of Food Microbiology*, submitted.



# PROCARTE. Acción:3 Aplicación de Tecnologías Emergentes para Inactivar Virus en Alimentos



Beguiristain N, Fuentes C, Pintó RM, Bosch A.

Virus Entéricos, Dep. Microbiología e Instituto de Nutrición y Seguridad Alimentaria, Universidad de Barcelona,

## Objetivos

1. Determinar la sensibilidad de los virus modelo más relevantes de transmisión alimentaria (Hepatitis A y Norovirus murino tipo-1 (modelo de infectividad del Norovirus humano genogrupo I y II) frente a la aplicación de tecnologías emergentes no térmicas como son la radiación ionizante, pulsos de luz y altas presiones, en muestras de jamón dulce, así como su reproducibilidad de cara a su aplicación a la industria alimentaria.
2. Discernir el mecanismo de acción de dichas técnicas potencialmente efectivas para la inactivación de virus entéricos y su efecto sobre las partículas víricas.

## Metodología y Condiciones del Proceso

### RADIACIÓN IONIZANTE POR ELECTRONES ACCELERADOS

1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 y 16 KGy



Ruptura de la cadena del ADN de los microorganismos contaminantes

### PULSOS DE LUZ DE AMPLIO ESPECTRO DE CORTA DURACIÓN Y ALTA INTENSIDAD

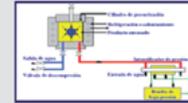
1, 2, 5, 10, 15 y 20 pulsos. 1J/cm<sup>2</sup>. 3000 Voltios.



Impacto mayoritario en el ácido nucleico, además de proteínas, membranas y otros materiales celulares

### ALTA PRESION HIDROSTÁTICA

150, 300 y 400 MPa. 1 minuto. 10°C



Impacto mayoritario a nivel proteico

## Resultados

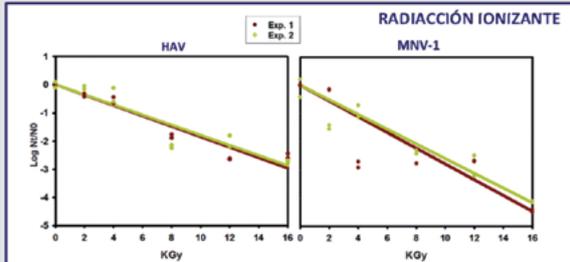


Fig.1: Inactivación de los virus HAV y MNV-1 tras la aplicación de radiación ionizante hasta dosis de 16 KGy medida por TCID<sub>50</sub>/ml

| Virus ensayado | Inactivación en log <sub>10</sub> para las 10 KGy | 16 KGy           |
|----------------|---|------------------|
| HAV            | 1.32 (1.79-1.85)                                  | 2.91 (2.85-2.95) |
| MNV-1          | 2.80 (2.74-2.86)                                  | 4.48 (4.38-4.57) |

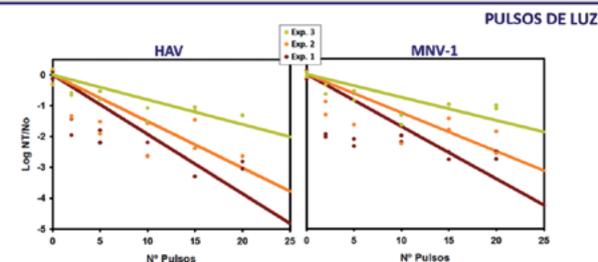


Fig.2: Inactivación de los virus HAV y MNV-1 tras la aplicación de pulsos de luz de hasta 20J/cm<sup>2</sup> medida por TCID<sub>50</sub>/ml

| Virus                                   | Exp. 1   |                  | Exp. 2   |                  | Exp. 3   |                  |
|---|--|------------------|--|------------------|--|------------------|
|   | Inactivación en log <sub>10</sub> para las 12 pulsos | 20 pulsos        | Inactivación en log <sub>10</sub> para las 12 pulsos | 20 pulsos        | Inactivación en log <sub>10</sub> para las 12 pulsos | 20 pulsos        |
| HAV                                     | 2.32 (2.26-2.47)                                     | 3.86 (3.61-4.12) | 1.81 (1.68-1.95)                                     | 3.02 (2.80-3.25) | 0.96 (0.90-1.03)                                     | 1.60 (1.50-1.71) |
| MNV-1                                   | 2.04 (1.84-2.21)                                     | 3.40 (3.11-3.68) | 1.50 (1.16-1.34)                                     | 2.49 (2.31-2.67) | 0.89 (0.68-0.81)                                     | 1.49 (1.36-1.62) |
| Susp. vírica HAV (en medio de cultivo): | 5.46 (5.38-5.54)                                     |                  |  |                  |  |                  |

## MECANISMOS DE ACCION

Estudios ya publicados sugieren que las altas presiones inactivan, vía desnaturalización, las cápsides proteicas de los virus. Respecto a los pulsos de luz no se han descrito hasta ahora detalles acerca de su mecanismo de inactivación sobre las partículas víricas.

Con el objetivo de conocer con mayor profundidad dichos mecanismos de inactivación se utilizaron poblaciones complejas de HAV adaptadas a multiplicar en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de actinomicina D (AMD) durante un periodo de tiempo corto o largo. Dichas poblaciones en función de la concentración de actinomicina D a la que se someten, presentarían potenciales cambios de plegamiento de la cápside dando lugar a cápsides con un mayor a menor grado de alteración, por lo que podrían ser excelentes modelos para evaluar la sensibilidad del HAV a tratamientos de altas presiones hidrostáticas e irradiación con pulsos de luz.

Los resultados mostraron que las poblaciones sometidas a una concentración más alta de actinomicina D, son más sensibles a las altas presiones, lo que pone de manifiesto la relación de inactivación del virus en función del grado de conformación de sus cápsides (Fig. 3, Tabla 1).

| Muestra | Inactivación en log <sub>10</sub> a 400 MPa |
|---------|---|
| L0      | 0.69  |
| F0.05A  | 2.69  |
| F0.05LA | 3.06  |
| F0.2A   | 3.06  |
| F0.2LA  | 4.37  |

Tabla.1: Inactivación de las diferentes poblaciones de HAV tras la aplicación de altas presiones a 400 MPa

| Muestra | Inactivación en log <sub>10</sub> para dosis de 20 J/cm <sup>2</sup> |
|---------|--|
| L0      | 5.46   |
| F0.05A  | 6.14   |
| F0.05LA | 6.02   |
| F0.2A   | 5.51   |
| F0.2LA  | 5.27   |

Tabla.2: Inactivación de las diferentes poblaciones de HAV tras la aplicación de pulsos de luz a 20J/cm<sup>2</sup>

Sin embargo, cuando sometemos dichas poblaciones a pulsos de luz de 20J/cm<sup>2</sup>, el efecto es similar en todas las poblaciones observándose caídas en la infectividad del virus de aproximadamente 5.5 log<sub>10</sub> (Tabla 2).

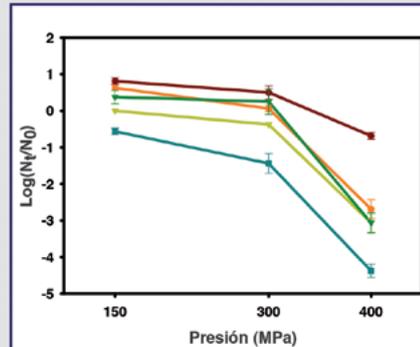


Fig.3: Inactivación de poblaciones de HAV adaptadas a diferente concentración de actinomicina D tras la aplicación de altas presiones a 150, 300 y 400 MPa respectivamente, medida por TCID<sub>50</sub>/ml

## Conclusiones

- A) La aplicación de radiaciones ionizantes de hasta 10KGy (máximo permitido por la legislación) en muestras de jamón cocido produce inactivaciones en los virus HAV y MNV-1 de 1.82 y 2.80 logaritmos, respectivamente ( Fig.1).
- B) Tras llevar a cabo experimentos independientes utilizando diferentes matrices de jamón, la aplicación de pulsos de luz de hasta 20 J/cm<sup>2</sup> produce una inactivación variable con ratios de inactivación no reproducibles ( Fig. 2). Dichos experimentos ponen de manifiesto la importancia de la matriz alimentaria a la hora de inactivar los virus, ya que el virus en medio de cultivo es inactivado 5.46 logaritmos.
- C) Los resultados obtenidos tras aplicar altas presiones de 150, 300 y 400 MPa a poblaciones de HAV con diferente grado de plegamiento de sus cápsides confirman el efecto dependiente de dicha tecnología al nivel de alteración de la cápside del virus (Figura 3). Al ser los virus entéricos virus no envueltos, dicho resultado resulta alentador, desde el punto de vista de seguridad alimentaria, ya la que la aplicación de las altas presiones causaría un alteración en la cápside del virus interfiriendo en su unión al receptor de la célula hospedadora.
- (E) Tras aplicar pulsos de luz de 20 J/cm<sup>2</sup>, la inactivación resultante fue similar en dichas poblaciones de HAV adaptadas llegando a los 5 logaritmos de inactivación y poniendo de manifiesto que el mecanismo de inactivación se da a nivel del ácido nucleico del virus.
- (E) Ante la problemática del uso de matrices alimentarias complejas, será necesario optimizar aún más los métodos de detección de virus en este tipo de matrices para poder obtener métodos más simples, eficientes y reproducibles, así como analizar la posible interferencia del tipo y composición de la matriz en la eficacia de la técnica para inactivar los virus.

**EFECTO DE LOS PULSOS DE LUZ SOBRE LA TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE *Listeria innocua***

J.S. Aguirre, R. González, G.D. García de Fernando, E. Hierro, M. Fernández

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos,  
Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid 28040, España.

\*juaguirr@vet.ucm.es

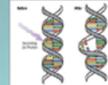


**INTRODUCCIÓN**

Para asegurar la calidad microbiológica de los alimentos es importante predecir el comportamiento que tendrán los microorganismos, lo que requiere un conocimiento detallado de sus parámetros cinéticos. Entre ellos, resulta de gran relevancia determinar la tasa específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ).

Cuando se aplican tratamientos de conservación a los alimentos, algunos de los microorganismos supervivientes que han sufrido un daño subletal serán incapaces de dividirse (viables no cultivables), mientras que otros podrán repararse y, en las condiciones adecuadas, iniciar su crecimiento. Adicionalmente, se sabe que no todas las células se comportan de igual forma, e incluso se ha observado variabilidad entre bacterias provenientes de una misma célula. Por todo ello, las células supervivientes pueden plantear un riesgo para los consumidores si el tiempo de almacenamiento es suficientemente largo para que se alcancen dosis infectivas. Si no se estima adecuadamente la  $\mu_{max}$ , la predicción de la vida útil sería inexacta.

En la última década ha surgido un gran interés por las tecnologías no térmicas para la conservación de los alimentos, entre ellas los pulsos de luz (PL). Este método inactiva a los microorganismos principalmente gracias a la acción del componente UV-C de la luz. Sin embargo, no se dispone de mucha información sobre cómo afecta esta nueva tecnología a los parámetros cinéticos de los microorganismos.



**METODOLOGÍA**

Revitalización de *Listeria innocua* (ATCC 33090)  
Doble pase caldo tripticasa soja (TSB) 24 h, 37 °C

Centrifugación del cultivo y resuspensión del pellet  
en 0,8% NaCl (Inóculo)

Siembra en placas Petri con agar tripticasa soja (TSA)  
con 1 ml del inóculo. Esperar 15 min para que las  
células se fijen a la superficie

Aplicación de 0, 1, 2 y 3 pulsos de luz (PL) sobre las  
placas de TSA inoculadas (Fluencia= 0,175 J/cm<sup>2</sup>/pulso)

- Homogeneización en bolsa de Stomacher con TSB estéril de las placas de TSA tratadas con 0, 1, 2 y 3 PL.
- Recuperación de 10 ml del homogeneizado de cada muestra. Se realizó recuento del inóculo inicial con siembra en TSA.
- Incubación de diluciones decimales de las células tratadas con 0, 1, 2 y 3 PL en turbidímetro (Bioscreen) a 16 °C para determinar la tasa específica máxima de crecimiento.

**OBJETIVO**

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de los pulsos de luz sobre la tasa específica de crecimiento de *Listeria innocua*.

**RESULTADOS**

Tabla 1. Efecto de los PL en la tasa específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y el tiempo de duplicación (Tg) de *L. innocua* en agar

|                                | Número de pulsos |      |      |      |
|--------------------------------|------------------|------|------|------|
|                                | 0                | 1    | 2    | 3    |
| $\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> ) | 0,36             | 0,28 | 0,18 | 0,11 |
| Tg (h)                         | 1,94             | 2,48 | 3,79 | 6,11 |
| Lag (h)                        | 20,3             | 23,6 | 28,7 | 39,5 |
| R <sup>2</sup>                 | 0,99             | 0,99 | 0,97 | 0,99 |
| Error típico                   | 0,13             | 0,19 | 0,52 | 0,16 |

Fluencia: 0,175 J/cm<sup>2</sup> por pulso

Al analizar las tasas de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) tras las distintas fluencias aplicadas, se apreció claramente que el crecimiento de *L. innocua* se hizo más lento conforme la intensidad del tratamiento aumentaba (Tabla 1). Así, la  $\mu_{max}$  disminuyó en torno al 22% en las células que recibieron 1 pulso, 49% en las células que recibieron 2 y 69% en las células que recibieron 3, respecto a las que no recibieron ningún tratamiento (control 0 PL).

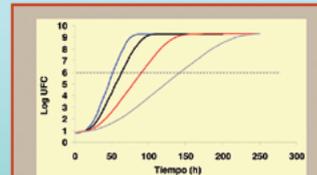


Figura 2. Simulación del crecimiento de 10 células supervivientes a 0 PL (-), 1 PL (-), 2 PL (-) y 3 PL (-) utilizando las tasas de crecimiento de la Tabla 1.

Como puede observarse en la Figura 2, las fases de latencia aumentan a la vez que aumenta el número de pulsos aplicados. Por otra parte, se observa claramente como la tasa de crecimiento disminuye conforme aumenta el grado de estrés aplicado. Las células que no han sido sometidas a estrés tardarán unas 50 horas en llegar a 10<sup>6</sup> UFC en cambio las células supervivientes a 3 PL tardarán unas 142 horas en llegar a la misma concentración. Estas diferencias deben tenerse en cuenta a la hora de evaluar cuantitativamente los riesgos microbiológicos.

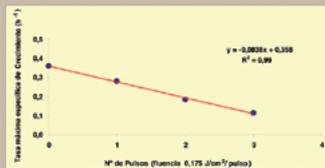


Figura 1. Relación entre los PL y la tasa específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de *L. innocua* en agar

Como puede observarse en la Figura 1, existe una correlación lineal inversa entre la tasa específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de *L. innocua* y la cantidad de pulsos de luz aplicados.

Es posible que el comportamiento observado en este estudio se deba a que los daños fotoquímicos producidos por el componente UV-C de la luz en el ADN (principalmente por la formación de dímeros de pirimidina) causen la represión de algún gen que no se transmite a las células hijas durante la duplicación celular. Este aspecto se escapa de los objetivos del presente estudio, pero apunta a la necesidad de continuar esta investigación en el campo de la biología molecular. No obstante, si que ha sido posible cuantificar dichas variaciones, que deben ser tomadas en cuenta, por ejemplo, cuando se estima la fase de latencia, dado que este parámetro se calcula en función de la  $\mu_{max}$ .

**CONCLUSIONES**

La velocidad de crecimiento de *L. innocua* disminuye a medida que aumenta la intensidad del tratamiento con PL, lo que debe tenerse en cuenta a la hora de modelar el comportamiento de *Listeria* spp. para estimar la vida útil y los riesgos derivados de la presencia de estos microorganismos en los alimentos.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2011-29325 (MICINN) y Consolider-Ingenio CARNISENUSA CSD2007-0016 (MEC).

# EFFECTO DE LA PROFUNDIDAD DEL INÓCULO Y DEL COLOR DEL SUSTRATO EN LA INACTIVACIÓN DE *LISTERIA INNOCUA* MEDIANTE PULSOS DE LUZ

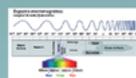
J.S. Aguirre, R. González, G.D. García de Fernando, E. Hierro, M. Fernández

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, F. Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid 28040, España

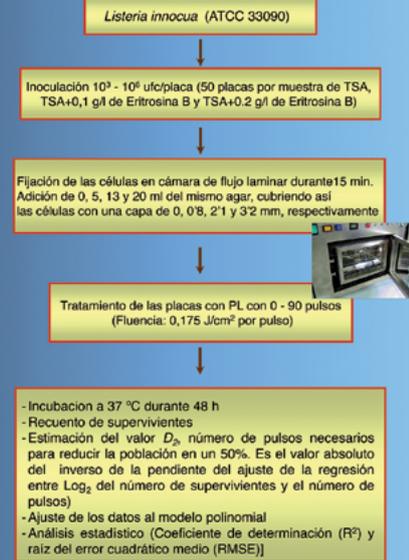


## INTRODUCCIÓN

Los pulsos de luz (PL) inactivan microorganismos sobre todo mediante los daños fotoquímicos que ocasiona la luz UV en el ADN. Esta inactivación es evidente y está suficientemente contrastada en superficies. No obstante, no se sabe a ciencia cierta su capacidad de penetración ni cómo pueden influir ciertas características del sustrato, como el color, en el efecto microbicida de la luz. Los efectos de las propiedades de la matriz en la inactivación pueden predecirse mediante modelos matemáticos generados a partir de datos experimentales obtenidos en estudios cuantitativos de cinéticas de inactivación.



## MATERIALES Y MÉTODOS



## OBJETIVO

Modelar el grado de inactivación de *Listeria innocua* mediante PL en función de la penetración de la luz y el color de la matriz.

## RESULTADOS

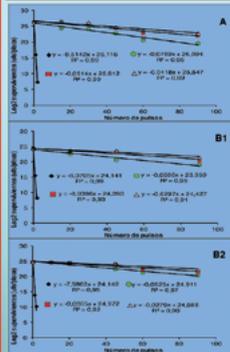


Tabla 1. Inactivación de *Listeria innocua* mediante pulsos de luz en función del color de la matriz y el grado de penetración

| Capa (mm) | TSA             |                | Eritrosina B (0,1 g/l) |                | Eritrosina B (0,2 g/l) |                |
|-----------|-----------------|----------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------|
|           | D <sub>50</sub> | R <sup>2</sup> | D <sub>50</sub>        | R <sup>2</sup> | D <sub>50</sub>        | R <sup>2</sup> |
| 0,0       | 0,105b          | 0,99           | 0,124a                 | 0,99           | 0,132a                 | 0,95           |
| 0,8       | 13,00b          | 0,96           | 17,06a                 | 0,95           | 19,05a                 | 0,97           |
| 2,1       | 19,46b          | 0,90           | 25,25a                 | 0,93           | 27,40a                 | 0,92           |
| 3,2       | 23,92b          | 0,89           | 33,67a                 | 0,91           | 35,84a                 | 0,90           |

D<sub>50</sub>: Número de pulsos necesarios para reducir la población en un 50%  
 a,b: Letras distintas en la misma fila indican que hay diferencias significativas (p<0,05). Fluencia: 0,175 J/cm<sup>2</sup> por pulso

Modelo predictivo de la tasa de inactivación de *L. innocua* (D<sub>50</sub>) en función del color de la matriz (A) (medido Abs<sub>550 nm</sub>) y el espesor de la capa de agar que cubre a los microorganismos (E).

$$\ln(D_{50}) = -2.06 - 7.74A + 0.38E - 3.02A^2 - 0.02E^2 - 0.03AE$$

R<sup>2</sup> = 0,99  
 % RMSE = 1,53 (validación interna)

Los resultados demuestran que el espesor de la capa que cubre las células influye poderosamente en el grado de inactivación de los PL, ya que éste disminuye significativamente (p<0.05) a medida que el espesor aumenta.

Este comportamiento fue más notorio en placas de TSA con 0,2 g/l de eritrosina B. Por tanto, parece que los microorganismos pueden verse protegidos de los PL por el color de su entorno; cuanto más intenso sea éste, mayor será la protección. Esto puede deberse a los posibles cambios en la absorción de la luz o a su capacidad de penetración en el agar.

## CONCLUSIONES

Puede predecirse el efecto de los pulsos de luz en la inactivación microbiana en función de la penetrabilidad de la luz y del color del sustrato en el que se encuentran los microorganismos.

Los pulsos de luz son eficaces en la descontaminación de superficies, pero su capacidad de penetración ha de considerarse escasa.

Los sustratos coloreados ejercen cierto efecto protector en los microorganismos. Cuanto más intenso es el color del sustrato, más fluencia es necesaria para conseguir el mismo efecto microbicida.

Agradecimiento: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2011-29325 (MICINN) y Consolider-Ingenio CARNISENSA CSD2007-0016 (MEC).



## INACTIVACIÓN de *Vibrio parahaemolyticus* en carpaccio de atún MEDIANTE PULSOS DE LUZ

Mónica Gahán<sup>1,2</sup>, Manuela Fernández<sup>1</sup>, Xavier F. Hospital<sup>1</sup>, Eva Hierro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain, mghanan@vet.ucm.es

<sup>2</sup> CEI Campus Moncloa, UCM-UPM y CSIC, Madrid, España.

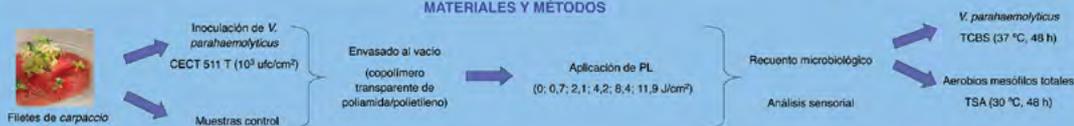
### INTRODUCCIÓN

Los carpaccios son alimentos mínimamente procesados cuya demanda ha aumentando en los últimos años en los países industrializados. Al tratarse de un producto para consumo en crudo, cualquier microorganismo patógeno que pudiera alcanzar el músculo podría desencadenar un brote de toxoinfección. Uno de los patógenos más importantes asociados al consumo de pescado es *Vibrio parahaemolyticus*, que desde el agua puede alcanzar la piel y el intestino en niveles significativos y de ahí, pasar al músculo durante el procesado del pescado. Por ello, la aplicación de métodos no térmicos de descontaminación superficial resulta interesante para garantizar la seguridad microbiológica del producto y, en este sentido, los pulsos de luz (PL) podrían llegar a ser una estrategia alternativa. Los PL consisten en la aplicación de pulsos cortos de luz blanca de amplio espectro, cuya acción antimicrobiana se debe a la suma de un efecto fotoquímico sobre el ADN y daño fototérmico.

### OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es estudiar la utilidad de los PL para la inactivación de *V. parahaemolyticus* en carpaccio de atún y determinar su efecto sobre la vida útil del producto.

### MATERIALES Y MÉTODOS



### RESULTADOS

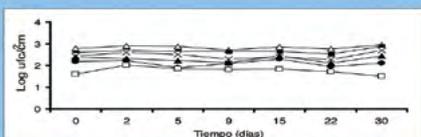


Figura 1. Recuentos de *V. parahaemolyticus* en carpaccio de atún envasado a vacío durante el almacenamiento a 5 °C después del tratamiento: 0 J/cm<sup>2</sup> (Δ), 0,7 J/cm<sup>2</sup> (■), 2,1 J/cm<sup>2</sup> (X), 4,2 J/cm<sup>2</sup> (▲), 8,4 J/cm<sup>2</sup> (●), 11,9 J/cm<sup>2</sup> (◊).

Tabla 1. Efecto de los PL en la vida útil (aerobios mesófilos totales, olor y aspecto general) del carpaccio de atún. a,b,c: valores en la misma fila con diferente letra son significativamente diferentes (p<0,05).

| Fluencia (J/cm <sup>2</sup> ) | 0                                 | 0,7                      | 2,1                             | 4,2                        | 8,4                        | 11,9                       |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Días                          | Luz blanca<br>Observación general |                          |                                 |                            |                            |                            |
| 0                             | 2,67a                             | 2,32ab                   | 1,55b                           | 1,96b                      | 7,86c                      | 2,66c                      |
|                               | Agradable/Buena                   | Agradable/Buena          | Agradable/Buena                 | Agradable/Buena            | Ligeramente azulado/Palos  | Ligeramente azulado/Palos  |
| 2                             | 2,46a                             | 2,51a                    | 2,25ab                          | 2,16ab                     | 2,26ab                     | 1,93b                      |
|                               | Agradable/Buena                   | Agradable/Buena          | Agradable/Buena                 | Agradable/Buena            | Ligeramente azulado/Cocido | Ligeramente azulado/Cocido |
| 4                             | 3,47a                             | 3,71a                    | 2,34b                           | 2,05b                      |                            |                            |
|                               | Agradable/Buena                   | Agradable/Buena          | Agradable/Buena                 | Agradable/Palos            |                            |                            |
| 7                             | 5,16a                             | 4,40b                    | 4,30b                           | 3,76c                      |                            |                            |
|                               | Aceptable/Buena                   | Agradable/Buena          | Aceptable/Aceptable             | Ligeramente azulado/Cocido |                            |                            |
| 11                            | 6,51                              | 6,74                     | 6,14                            |                            |                            |                            |
|                               | Ligeramente insoportable          | Ligeramente insoportable | Ligeramente insoportable/Cocido |                            |                            |                            |
| 22                            | 7,04                              | 6,63                     |                                 |                            |                            |                            |
|                               | Acido intenso/Limo                | Acido intenso/Limo       |                                 |                            |                            |                            |

Tras aplicar un tratamiento de 11,9 J/cm<sup>2</sup> se obtuvo una reducción de *V. parahaemolyticus* de en torno a un 1 log cfu/cm<sup>2</sup>, que resultó significativamente mayor (p<0,05) que la obtenida al emplear fluencias más bajas (Figura 1). En la Tabla 1 se observa el efecto de los PL sobre diferentes parámetros relacionados con la vida útil del producto. Fluencias de 2,1 J/cm<sup>2</sup> o superiores disminuyeron significativamente (p<0,05) los recuentos de aerobios mesófilos totales inmediatamente después del tratamiento. Sin embargo la aplicación de 8,4 y 11,9 J/cm<sup>2</sup> ocasionó cambios importantes en el color y el aspecto. A lo largo del almacenamiento se observaron diferencias significativas en los recuentos, siendo entre 0,8-1,5 log cfu/cm<sup>2</sup> menores en las muestras tratadas tras 7 días de almacenamiento. El desarrollo del color cocido y de notas azufradas se tradujo en un rechazo del producto tratado con 4,2 J/cm<sup>2</sup>. En el día 14, los recuentos microbianos no difirieron entre las muestras control y las tratadas. Por consiguiente, a pesar de que el tratamiento con PL no incrementó la vida útil, la aplicación de 2,1 J/cm<sup>2</sup> mejoró la calidad microbiológica del producto, manteniendo intactas sus propiedades sensoriales durante una semana.

### CONCLUSIONES

La aplicación de 11,9 J/cm<sup>2</sup> a carpaccio de atún mejora la seguridad microbiológica del producto, logrando tasas de inactivación de aproximadamente 1 log ufc/cm<sup>2</sup>. Sin embargo, dichas dosis comprometen la calidad sensorial del alimento. Para poder mantener las propiedades organolépticas se deberían emplear fluencias más bajas. Con ello, la reducción de *V. parahaemolyticus* sería menor, pero en cualquier caso no sería despreciable si se produjera una contaminación cruzada.



## Inactivation of *E. Coli* in chicken samples using a Supercritical Carbon Dioxide Processing assisted by High Power Ultrasound

Rosa Castillo, Carmen Ortuño, Jose Benedito

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, Universitat Politècnica de València. Camino de Vera, s/n 46022 Valencia, España.



### Introduction

Supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) has been tested to inactivate bacteria, yeast and fungi species and some viruses.<sup>1</sup> SC-CO<sub>2</sub> processes have been widely applied in liquid media such as commercial culture, milk, juices, beer or milk;<sup>2</sup> however in solid matrices, the bactericide effect is more difficult to achieve. In this regard, some researchers have implemented combined technologies, like High Power Ultrasound (HPU),<sup>1</sup> to enhance the lethal effect of SC-CO<sub>2</sub>.

### Objective

Evaluate the HPU effect on SC-CO<sub>2</sub> inactivation of *E. coli* inoculated in chicken samples, under different process conditions.

### METHODOLOGY

#### SAMPLE PREPARATION

- Pieces of chicken breast were cut into 3 cm of thickness cylinders, weighing 10 g.
- Pellet of *E. coli* was resuspended in saline solution (SS, 0.85% w/w) to obtain 10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>.

#### INOCULATION

100 µL of the microorganism suspension of *E. coli* was inoculated in each chicken sample to obtain 10<sup>6</sup> CFU g<sup>-1</sup>.

#### CONDITIONS

|   |   |
|---|---|
| Pressures:<br>150,250,350,450 bar   | SC-CO <sub>2</sub>                              |
| Constant T <sup>a</sup> = 41 °C<br>Temperatures:<br>36, 41, 46, 51 °C<br>Constant P = 350 bar |   |
| Pressures:<br>150, 450 bar<br>Constant T <sup>a</sup> = 46 °C                                 | SC-CO <sub>2</sub> + HPU (40 5 W)               |
|   | SC-CO <sub>2</sub> + HPU + Saline Solution (SS) |

#### MICROBIAL ANALYSIS

The samples were placed in a stomacher bag containing 90 ml of SS. The viability of *E. coli* in the chicken samples was determined on triplicate plates using PCA. The results are expressed as a survival ratio  $\log(N/N_0)$  versus time relationship, where  $N$  is the number of cell after the treatment time and  $N_0$  is the initial number of cells in the control sample.



### RESULTS

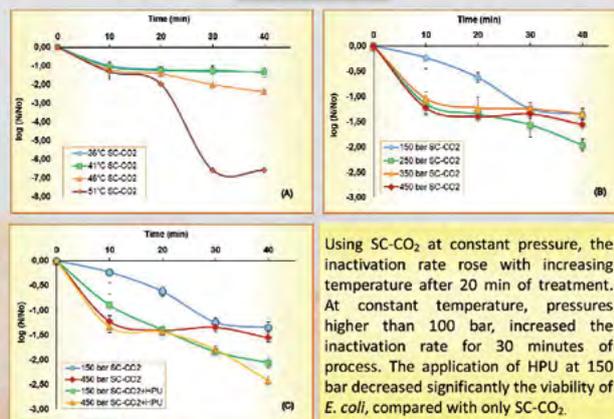


Fig. 1. Inactivation kinetics of *E. coli* in chicken samples with SC-CO<sub>2</sub> at different temperatures (A, constant P = 350 bar), different pressures (B, constant T = 41 °C) and assisted with HPU (C).

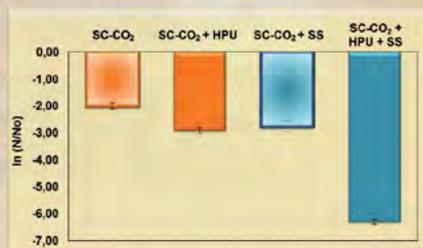


Fig. 2. Effect of HPU application and SS during SC-CO<sub>2</sub> inactivation of *E. coli* in chicken samples at 150 bar and 46 °C, after 40 min of treatment.

SC-CO<sub>2</sub>+HPU+SS allow to obtain a total reduction (6 log-cycles) of *E. coli* in chicken samples. HPU and SS increased the solubility of CO<sub>2</sub> in the samples, accelerating the inactivation mechanisms associated to SC-CO<sub>2</sub>.

### CONCLUSION

Supercritical Carbon Dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) assisted by HPU might be used as a non-thermal technique for the inactivation of *E. coli* in chicken samples. The application of HPU to SC-CO<sub>2</sub> allows the use of shorter times and lower temperatures, compared with only SC-CO<sub>2</sub>. The SC-CO<sub>2</sub>+HPU inactivation mechanisms were greatly improved through the use of saline solution in the inactivation vessel.

#### References:

- Ortuño C., Martínez-Pastor, M.T., Mulet, A. & Benedito J. (2012). An ultrasound-enhanced system for microbial inactivation using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 15, 31-37.
- Ferrentino G. & Spillimbergo S. (2011). High pressure carbon dioxide pasteurization of solid foods: Current knowledge and future outlooks. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 427-441.

#### Acknowledgements:

The authors acknowledge the financial support from project CSD2007-00016 (CONSOLIDER-INGENIO 2010) funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation and from the PROMETEO/2010/062 project financed by the Generalitat Valenciana

# CAPITULO X

## Indicadores de calidad y producción de I+D+i de CARNISENUSA

*Lluís Salvà*

*Gestor del proyecto*

*Institut de Recerca i Tecnologies Agroalimentàries (IRTA). Monells*

### 1. Introducción

Como se recoge en el Convenio de Ejecución firmado con el, por aquel entonces, Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), la Entidad Gestora, en representación del equipo investigador del proyecto Consolider CARNISENUSA, ha sido el organismo encargado del seguimiento, cuantificación y control de CARNISENUSA, cuyo rendimiento deriva del esfuerzo y dedicación de los investigadores integrantes en el proyecto. La cláusula octava de dicho convenio (“Evaluación, control y seguimiento científico-técnico”) señala una serie de indicadores a cumplir de acuerdo con el compromiso firmado en su día con el Ministerio al que le ha permitido realizar una evaluación continua y objetiva de la evolución del proyecto.

En este capítulo se describe el rendimiento científico-técnico global obtenido en CARNISENUSA en el que, tomando siempre como referencia los indicadores consensuados, se resaltan las cotas alcanzadas en el proyecto, ahora que éste llega a su fin. De todas formas, será difícil que este capítulo repleto de “fríos” números y datos objetivos pueda poner de manifiesto el efecto que las sinergias y colaboraciones entre los grupos ha ejercido en los investigadores que, en muchos casos, ha derivado en una magnífica relación personal.

### 2. Publicaciones

La calidad científico-técnica de cualquier proyecto de investigación viene determinada, por lo general, por el número y sobre todo por la calidad de las publicaciones. El proyecto CARNISENUSA no podía ser menos, y por este motivo, uno de los principales indicadores utilizados es el número y la relevancia de los artículos publicados por los distintos miembros del grupo investigador del proyecto. La evaluación de la calidad de las publicaciones se basa en el *ranking* establecido por el *Journal Citation Reports* que, dentro del ámbito de *Food Science and Technology* (y otras áreas temáticas utilizadas por los investigadores), se han dividido en cuatro grupos de los cuales tres de ellos, los de más relevancia por su factor de impacto, se recogen en la tabla 1. Para mayor información, el lector puede consultar el Anexo I donde figura una relación de los artículos publicados.

El total de publicaciones comprometidas con el Ministerio (Tabla 1), era de un centenar, una cantidad nada despreciable, que suponía una media de 25 anuales. Esta cifra, sin embargo, se ha superado ampliamente alcanzando un total de 233 publicaciones, lo que significa más del doble de lo comprometido. Este resultado es ya de por sí revelador de la gran actividad investigadora llevada a cabo durante el proyecto. Sin embargo, la dimensión real de las aportaciones del mismo queda reflejada sobre todo en la calidad de las publicaciones. Tomando como referencia el indicador recogido en el Convenio de Ejecución (Tabla 1), se observa que el número

Tabla 1. Número de artículos científicos clasificados según su factor de impacto (JCR 2006-11) generados por el proyecto CARNISENUSA

| Factor de impacto                                 | Número de publicaciones |           |           |           |           |           |           |           |          |           |          |           |            |            |
|---|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|------------|------------|
|   | 2008                    |           | 2009      |           | 2010      |           | 2011      |           | 2012     |           | 2013     |           | TOTAL      |            |
|   | C                       | P         | C         | P         | C         | P         | C         | P         | C        | P         | C        | P         | C          | P          |
| 1 <sup>er</sup> cuartil (> 1.579)                 | 4                       | 10        | 5         | 34        | 10        | 32        | 20        | 41        | 0        | 51        | 0        | 39        | 39         | 207        |
| 2 <sup>o</sup> y 3 <sup>er</sup> cuartil (<1,578) | 11                      | 2         | 15        | 6         | 15        | 3         | 20        | 8         | 0        | 5         | 0        | 2         | 61         | 26         |
| <b>TOTAL</b>                                      | <b>15</b>               | <b>12</b> | <b>20</b> | <b>40</b> | <b>25</b> | <b>35</b> | <b>40</b> | <b>49</b> | <b>0</b> | <b>56</b> | <b>0</b> | <b>41</b> | <b>100</b> | <b>233</b> |

C: Comprometidas según consta en el Convenio de Ejecución firmado con el MEC  
P: Artículos publicados

total de artículos del primer cuartil comprometidos fue de 39. A unos meses de finalizar el proyecto el número de trabajos dentro del primer cuartil es de 207, lo que supone más de un 90% de las publicaciones realizadas. Este contundente dato permite acreditar el avance científico que ha supuesto el proyecto CARNISENUSA en la Ciencia y Tecnología de la Carne y Productos Cárnicos.

Además de las publicaciones en revistas científicas se han redactado 45 capítulos de libros (entre ellos los incluidos en la primera edición de este libro) y de artículos de divulgación, fundamentalmente en revistas de interés para el sector cárnico. Todo ello con el propósito de difundir los avances obtenidos y dar visibilidad a los principales hallazgos publicados en revistas científicas.

### 3. Índice h (Hirsch)

En los últimos años, la comunidad científica viene aceptando el indicador desarrollado por el Dr. Jorge Hirsch como una herramienta satisfactoria para evaluar el historial científico de los investigadores que se fundamenta en el número de veces que los artículos de un autor son citados en las publicaciones de otros autores, mostrando así la relevancia de los resultados; es un parámetro sencillo que refleja de forma excepcional el éxito de un investigador y la evolución de su trabajo. Basándose en este criterio, se consideró como indicador global del índice h, la media calculada a partir del valor del índice h individual de los 26 investigadores más consolidados del proyecto. El valor al inicio del proyecto (2007) era de 14 y se propuso al MEC un incremento del 15% al finalizar el proyecto que fue aceptado y así se hizo constar en el Convenio de Ejecución. Este aumento equivalía a alcanzar la cifra de 16. En la tabla 2 se recogen los valores h actuales de los citados investigadores, resultando un valor medio de 20,96, lo que supone un aumento muy superior (50%) al comprometido (15%) en el Convenio de Ejecución.

Conviene decir que no todas las ciencias y tecnologías son comparables y, por tanto, la calidad de los artículos de los investigadores depende de la rama de la Ciencia que cultive un determinado investigador. Rodríguez Navarro y Juan Imperial Ródenas (Índice "h": guía para la evaluación de la investigación española en ciencia y tecnología utilizando el índice "h" 2007 Vol. 33 de Mi+d. [www.madridmasd.org](http://www.madridmasd.org)) han analizado profundamente el significado y alcance del índice h como forma de evaluar la calidad de la investigación y han clasificado los campos científicos en 5 categorías atendiendo al factor de impacto que figura en el *Journal Citation Reports*. Las ciencias aplicadas en general, como la Ciencia y Tecnología de los Alimentos en el cuarto grupo donde un índice h entre 10 y 20 equivale a una calidad alta y a partir de 20 cae ya en la categoría de excelente. El índice h medio de los 26 científicos consolidados de CARNISENUSA (tabla 2) partía en 2007 con un índice h de 14 (de alta calidad científica) y en

los seis años que ha estado “vivo” el proyecto han superado el umbral de 20 y, por tanto, han pasado al nivel de excelencia.

Tabla 2. Relación de los índices h de los 26 investigadores más consolidados participantes en el proyecto a la fecha de edición de este libro

|                                   |    |                                    |    |
|-----------------------------------|----|------------------------------------|----|
| Dr. Juan A. Ordóñez               | 30 | Dr. José Carballo                  | 19 |
| Dr. Juan José Córdoba             | 21 | Dra. Carmen Sárraga                | 13 |
| Dr. Jacinto Arnau                 | 22 | Dr. Jorge Ruiz                     | 25 |
| Dr. F. Jiménez Colmenero          | 23 | Dra. M.L. García                   | 18 |
| Dr. Antoni Mulet                  | 26 | Dra. M. Isabel Cambero             | 16 |
| Dr. Manuel Núñez                  | 33 | Dr. José A. García Regueiro        | 16 |
| Dr. Josep M <sup>a</sup> Monfort  | 19 | Dra. Manuela Fernández             | 16 |
| Dr. Albert Bosch                  | 27 | Dra. M <sup>a</sup> Dolores Selgas | 17 |
| Dr. G. García de Fernando         | 11 | Dra. Iciar Astiasaran              | 26 |
| Dr. Andrés Otero                  | 17 | Dr. Jesús Ventanas                 | 29 |
| Dra. Teresa Aymerich              | 23 | Dra. Margarita Medina              | 30 |
| Dra. M <sup>a</sup> Mar Rodríguez | 14 | Dra. Eva Hierro                    | 12 |
| Dr. Pedro Roncalés                | 21 |                                    |    |

#### 4. Contratos con empresas

A pesar de ser un proyecto de carácter netamente científico, el proyecto CARNISENUSA no se entendería sin el apoyo del sector cárnico español. Aunque las bases de la convocatoria Consolidar – Ingenio 2010 dejaban claro que únicamente podían recibir financiación los organismos públicos de investigación (OPIs), desde el inicio se implicaron en el consorcio algunas de las principales empresas y asociaciones del sector cárnico. Dichas empresas y asociaciones son:

- El Pozo Alimentación S.A.
- Cooperativa Andaluza Ganadera del Valle de los Pedroches (COVAP)
- Frigoríficos Andaluces de Conservas de Carne (FACCSA-Prolongo)
- Campofrío S.A
- Federación Española de Industrias de Alimentación y Bebidas (FIAB)
- Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España (ANICE-CONFECARNE)

La investigación llevada a cabo en el proyecto CARNISENUSA ha sido fundamentalmente orientada a la industria cárnica. Por ello, siempre se ha tenido presente el usuario final a la hora de generar conocimientos para su transferencia al sector cárnico español, aunque, como los resultados están publicados en revistas internacionales, su disponibilidad trasciende también a la comunidad científica mundial. Otro de los indicadores acordados con el Ministerio se basaba precisamente en la interacción OPIs-industria. Según se recogía en el Convenio de Ejecución, el objetivo previsto era, a partir del segundo año de proyecto, incrementar un 10% anual el nivel de acuerdos económicos entre ambas organizaciones.

Por otra parte, la difusión de las actividades realizadas durante el desarrollo de CARNISENUSA es, en cierto modo, una forma de rendir cuentas de los fondos proporcionados por los presupuestos nacionales. Parte de estas actividades han correspondido a las acciones acometidas conjuntamente con empresas que pueden visualizarse utilizando como indicador in-

directo los aumentos que ha habido respecto a lo previsto. La relación, cooperación y contacto de los grupos de investigación con las empresas del sector cárnico español se muestran en la tabla 3 donde se refleja una relación anual de los contratos con empresas y el incremento teórico del 10% comprometido con el Ministerio así como el incremento real respecto al porcentaje anterior. El incremento medio fue ligeramente superior al 50%, destacando un 75% el año 2010. Realmente, en todos los años se superó el 10% prefijado, excepto en 2013 que se produjo un descenso de un 15%, lo que se justifica al estar programada la finalización del proyecto para 2012 y, sin embargo, se prorrogó por un año de forma administrativa (no económica) y, por tanto, no hubo ninguna reposición de fondos y en 2013 solo quedaban restos del ejercicio anterior. Por otra parte, los contratos firmados con las empresas en 2013 no pueden considerarse dentro de ese año ya no era posible firmar ningún acuerdo con las empresas bajo el marco de CARNISENUSA.

Estos resultados reflejan no sólo el interés que suscitan en el sector cárnico español los avances científicos conseguidos en el proyecto sino además la inquietud y el giro de un sector históricamente tradicional y comedido en lo que a las innovaciones se refiere así como la confianza en la actividad de los OPIs y la percepción de la industria que cada vez ve con mayor nitidez percatada que la investigación y la innovación pueden ser un pilar básico para su desarrollo.

Tabla 3. Relación de los importes contratados con las empresas para el desarrollo de diversos trabajos tecnológicos

| <i>Contratos</i>                                   | <i>2008</i> | <i>2009</i> | <i>2010</i> | <i>2011</i> | <i>2012</i> | <i>2013</i> |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Número de contratos                                | 14          | 22          | 15          | 23          | 34          | 8           |
| Contribución Económica                             | 241.821€    | 398.364€    | 309.375€    | 443.296€    | 564.272€    | 298.975€    |
| Incremento anual del 10% (comprometido con el MEC) | 241.821     | 266.003     | 292.603     | 321.863     | 354.049     | 389.454     |
| Incremento real respecto al teórico (%)            | 0           | 64,73       | 16,30       | 51,50       | 75,31       | -15,55      |

Además del indicador en su día firmado con el Ministerio, otro parámetro que puede ser interesante en relación con la transferencia de resultados de la investigación a las empresas son las nueve patentes obtenidas durante la evolución del proyecto por los distintos grupos investigadores:

- A. Bosch & R.M. Pintó. "Standardized method and kit for the quantification of Hepatitis A virus". Reference: CT/EP2007/055402: WO 2008/145196. International PCT USA, 2007. Date: 04/12/2008 (In exploitation, Ceeram, 2009).
- A. Bosch & R.M. Pintó. "Control for assays based on reverse-transcription polymerase chain reaction". Reference: PCT/EP2007/055407:WO 2008/145197. International PCT USA, 2007. Date: 04/12/2008 (In exploitation, Ceeram, 2009).
- C. Rodríguez, M.M., Rodríguez Castillo, M.J., Santa-María Blanco, J.G., Selgas Cortecero, M.D. & García Sanz, M.L. "Productos cárnicos y de la pesca enriquecidos en licopeno mediante la adición de piel de tomate". Application: P200701670. Spain. Date: 18<sup>th</sup> of June of 2007.
- D. Morcuende, J. Ventanas, R. Ganhao, M. Estévez. "Empleo de un extracto de madroño en la elaboración de productos alimenticios". Application: P201030173 -2010. Spain. Date: 09/02/2010.
- D. Morcuende, J. Ventanas, R. Ganhao, M. Estévez. "Empleo de un extracto de Rosa canina L. en la elaboración de productos alimenticios". Application: P201030175-2010. Spain. Date: 09/02/2010.

- M. Estévez, D. Morcuende, J. Ventanas, J. G. Rodríguez. “Empleo de un extracto de piel de aguacate en la elaboración de productos alimenticios”. Application: P201031390. Spain. Date: 17/09/2010.
- M. Estévez, D. Morcuende, J. Ventanas, J. G. Rodríguez. “Empleo de un extracto de semilla de aguacate en la elaboración de productos alimenticios”. Application: P201031391. Spain. Date: 17/09/2010.
- Cofrades, S., López López, I., Ruiz-Capillas, C., Jiménez Colmenero, F. “Procedimiento de obtención de productos cárnicos saludables con algas”. Application: P201030390. Reference: ES1641.716. Spain. Date: 17/03/2010.
- Benedito, J. J., Martínez-Pastor, M.T., Mulet, A., Ortuño, C., & Peña, R. “Procedure of microbial inactivation by the combination of supercritical fluids and ultrasound”. Application: P201131099. Spain. Date: 29/06/2011.

## 5. Tesis doctorales

Uno de los principales objetivos del proyecto, además de la excelencia investigadora (reflejada por las publicaciones e índice h) y el interés industrial (contratos con empresas y patentes), es la formación de jóvenes investigadores que, no cabe duda, es una actividad prioritaria e imprescindible para asegurar la continuidad del conocimiento. Las tesis doctorales realizadas es, quizás, el mejor medio que puede emplearse para evaluar el grado de formación de científicos, sin olvidar los programas docentes de másters y cursos. La tabla 4 refleja el número de tesis defendidas, las que únicamente queda ultimar algunos detalles y se van a defender de forma inminente (en 2013) pero también se han recogido las que está previsto se defiendan en 2014, ya que una tesis doctoral es una labor de varios años y, por tanto, las que se defiendan en 2014 se han realizado mayoritariamente en años anteriores, cuando el proyecto estaba en pleno desarrollo. En el momento de la edición de este libro había ya 18 tesis defendidas, sólo faltaban dos para cumplir lo que se especificaba en el Convenio de Ejecución según el cual, a la conclusión del proyecto se deberían haber defendido alrededor de 20 tesis. Teniendo en cuenta las tesis defendidas (18) y las que con la máxima certeza se defenderán en 2013 (11) se llegará al final del proyecto (diciembre 2013) con un total de 29 tesis realizadas, aproximadamente un 50% más de las comprometidas con el Ministerio. A este valor se le debería añadir las tesis (9) que, aunque defendidas una vez finalizado el proyecto (2014) su contenido y resultados básicamente derivan, como se ha indicado anteriormente, de la investigación realizada por el doctorando/a durante la ejecución del proyecto CARNISENUSA, completándose un total de 38 tesis doctorales relacionadas con el proyecto CARNISENUSA.

| Tabla 4. Relación nominal de tesis finalizadas, o de defensa inminente, relacionadas con el proyecto CARNISENUSA |           |
|--|-----------|
| Tesis defendidas   | 18        |
| Tesis a defender durante 2013  | 11        |
| Tesis a defender durante 2014  | 9         |
| <b>TOTAL</b>   | <b>38</b> |

A continuación se describe una relación detallada de las tesis defendidas o en proceso de defenderse durante 2013 o 2014:

| Tesis doctorales finalizadas          |   |   |
|---------------------------------------|---|---|
| Nombre                                | Título  | Director  |
| Izaskun Berasategui Zabalza           | Nuevas fuentes lipídicas en la elaboración de productos cárnicos cocidos enriquecidos en omega-3  | Iciar Astiasarán y Diana Ansorena                                       |
| Idoya Valencia Redín                  | Meat products enriched in n-3 polyunsaturated fatty acids: technological, healthy and sensory aspects. Excelente <i>cum laude</i>   | Iciar Astiasarán y Diana Ansorena                                       |
| A. Bocanegra de Juana.                | Utilización nutricional de Nori y Konbu. Efectos sobre la defensa antioxidante y metabolismo lipoproteico en ratas. Excelente <i>cum laude</i>  | Francisco Sánchez-Muniz, Sara Bastida y Juana Benedí                    |
| Lluís Aragonès Marimon                | El virus de la hepatitis A y su código genético. Excelente <i>cum laude</i>   | Rosa M <sup>a</sup> Pintó y Albert Bosch                                |
| Inés López-López                      | Algas ( <i>Himantalia elongata</i> , <i>Undaria pinnatifida</i> y <i>Porphyra umbilicalis</i> ) como ingrediente funcional en productos cárnicos: aspectos nutricionales y tecnológicos. Excelente <i>cum laude</i> | Susana Cofrades y Francisco Jiménez Colmenero                           |
| Ana Rivas Cañedo                      | Influence of high pressure treatment of meat products on the formation of volatile compounds. Excelente <i>cum laude</i>  | Estrella Fernández y Manuel Nuñez                                       |
| Raquel Montiel Moreno                 | <i>Listeria monocytogenes</i> in smoked salmon: detection at the industry and elimination in the product by means of high pressure and biopreservation. Excelente <i>cum laude</i>                                  | Margarita Medina y Daniel Bravo   |
| Unai Pérez Sautu                      | Epidemiología molecular de virus causantes de gastroenteritis y hepatitis A en Cataluña. Excelente <i>cum laude</i>   | Albert Bosch  |
| Mikel García de Ciriano               | Design and development of functional meat products. Excelente <i>cum laude</i>  | Iciar Astiasarán y Diana Ansorena                                       |
| Irene Galán Trigo                     | Estudio de la biodisponibilidad del ácido fólico como ingrediente funcional en productos cárnicos. Excelente <i>cum laude</i>   | M <sup>a</sup> Dolores Selgas y M <sup>a</sup> Luisa García             |
| Gonzalo Delgado Pando                 | Diseño y desarrollo de productos cárnicos con perfil lipídico optimizado. Excelente <i>cum laude</i>  | Francisco Jiménez Colmenero, Begoña Olmedilla y Francisco Sánchez Muniz |
| Juan Aguirre García                   | Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a distintos tratamientos conservantes de alimentos. Excelente <i>cum laude</i>                            | Gonzalo García de Fernando  |
| Diego Gómez Lozano                    | <i>Listeria monocytogenes</i> en la industria de productos cárnicos: presencia en ambiente y en productos listos para el consumo (LPC). Excelente <i>cum laude</i> . Mención Internacional.                         | Javier Yangüela y Agustín Ariño   |
| Teresa Pérez Beriain                  | Repercusión de las variaciones en el procesado tecnológico del jamón D.O. Teruel en su calidad. Excelente <i>cum laude</i>  | Pedro Roncalés  |
| M <sup>a</sup> Isabel Luque Caballero | Desarrollo de métodos de PCR convencional para la detección de mohos productores de micotoxinas en alimentos madurados  | Juan José Córdoba y M <sup>a</sup> Jesús Andrade                        |

| Nombre                   | Título  | Director                                 |
|--------------------------|---|--|
| Alicia Rodríguez Jimenez | Métodos de PCR en tiempo real para detectar mohos productores de micotoxinas en alimentos   | Juan José Córdoba y Mar Rodríguez Jovita |
| Ana Del Olmo Sánchez     | Evaluación del efecto antimicrobiano de la lactoferrina bovina y sus derivados, y su combinación con altas presiones, sobre patógenos y alterantes de la carne y los productos cárnicos. Excelente <i>cum laude</i> | Manuel Nuñez                             |
| Julián Gómez Salazar     | Modelización de la difusión de nitratos y nitritos en el curado de carne". Enero 2012. Universidad Politécnica de Valencia. Excelente <i>cum laude</i>  | Neus Sanjuán y Gabriela Clemente         |

## Tesis que se defenderán en 2013

| Nombre   | Título  | Director   |
|--|---|--|
| Anna Hereu Soms                                | Les altes pressions i la bioconservació com a estratègies de control de <i>Listeria monocytogenes</i> en productes carnis llestos pel consum                                | Teresa Aymerich y Sara Bover-Cid                                       |
| Carmina Ortuño Cases                           | Optimización del proceso de extracción de compuestos naturales con capacidad antioxidante y antimicrobiana  | José Bon y José Benedito   |
| Elsa Iglesias Collar                           | Evaluación del riesgo asociado a la presencia de bacterias patógenas en productos cárnicos comercializados en la ciudad de León   | Andrés Otero   |
| María de Alba Ortega                           | Altas presiones y bioconservación en la eliminación de patógenos en productos cárnicos  | Margarita Medina y Daniel Bravo  |
| M <sup>a</sup> Dolores Romero de Ávila Hidalgo | Empleo de sistemas de cohesión en frío para la elaboración de jamón deshuesado curado   | Juna A. Ordóñez, M <sup>a</sup> Isabel Cambero y Lorenzo de la Hoz (†) |
| Ruben Gordillo Duran                           | Desarrollo de Métodos de PCR convencional y en tiempo real para detectar <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i> enterotoxigénico en productos cárnicos                   | Mar Rodríguez Jovita y Elena Bermúdez                                  |
| Jader Rodríguez Cortina                        | Contribucion al estudio de la intensificacion del proceso de secado de tomillo ( <i>thymus vulgaris l.</i> ): aplicación de ultrasonidos de potencia y secado intermitente. | José Bon y Antonio Mulet   |
| Irene García Márquez                           | Ampliación de la vida útil de lomo fresco y adobado mediante la aplicación de electrones acelerados   | M <sup>a</sup> Dolores Selgas  |
| Medhi Triki                                    | Aminas biógenas en productos cárnicos más saludables en base a su contenido lipídico  | Claudia Ruiz-Capillas, Ana M. Herrero y Francisco Jimenez-Colmenero    |
| Julia Calvarro Labrador                        | Estudio de la influencia de la concentración de nitratos y nitritos en el olor y la formación de nitrosaminas en productos cárnicos crudos curados                          | Jorge Ruiz y Carmen García González                                    |
| Ana M <sup>a</sup> Soto Carrión                | Productos cárnicos enriquecidos con calcio. Estudio de la biodisponibilidad   | M <sup>a</sup> Dolores Selgas y M <sup>a</sup> Luisa García            |

| Tesis que se defenderán en 2014      |  |   |
|--------------------------------------|--|---|
| Nombre                               | Título   | Director  |
| Xavier Fernández Hospital            | Efecto de la reducción del contenido de nitratos y nitritos en la generación de compuestos volátiles y en la microbiota típica de los productos cárnicos curados | Manuela Fernández y Eva Hierro  |
| Raquel Velasco de Diego              | Uso de electrones acelerados para el control de <i>Clostridium tyrobutyricum</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> en queso  | Juna A. Ordóñez, M <sup>a</sup> Isabel Cambero y M <sup>a</sup> Concepción Cabeza       |
| Alberto Lorés Guerrero               | Implicaciones en el color de la reducción de nitrificantes en productos cárnicos   | Pedro Roncalés  |
| Candelaria Poyato Aledo              | Viabilidad de emulsiones múltiples como vehículo de compuestos bioactivos para productos cárnicos  | Iciar Astiasarán y Diana Ansorena   |
| Lorena Salcedo Sandoval              | Desarrollo de productos cárnicos con reducido contenido en grasa en base a la utilización de konjac glucomanano  | Susana Cofrades y Claudia Ruiz-Capillas   |
| M <sup>a</sup> Rosa Rodríguez Vargas | Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a distintos tratamientos de acidificación de alimentos | Gonzalo García de Fernando  |
| M <sup>a</sup> Carmen Gámez Losada   | El licopeno como ingredientes funcionales en productos cárnicos listos para el consumo   | M <sup>a</sup> Dolores Selgas, M <sup>a</sup> Luisa García y Marta M <sup>a</sup> Calvo |

## 6. Conclusiones

Uno de los requisitos de la convocatoria del programa Consolider Ingenio 2010 era, aparte del seguimiento por evaluadores seleccionados por el Ministerio y de los informes anuales preceptivos, la firma de un Convenio de Ejecución con el entonces Ministerio de Educación y Ciencia en el que los investigadores responsables de los proyectos concedidos deberían proponer los objetivos que se pretendían alcanzar al finalizar el proyecto, a través de una serie de indicadores que permitieran evaluar los avances y logros del mismo. En el presente capítulo se ofrece un resumen de los indicadores de mayor transcendencia. Puede concluirse que se han superado todos los indicadores que se fijaron, y fueron admitidos, por las autoridades competentes del MEC. Así, se ha superado la duplicación del número de artículos científicos publicados en revistas de difusión internacional y se ha redactado un buen número monografías, artículos de divulgación científica y capítulos de libros por diversos investigadores del proyecto CARNISENUSA. Otros indicadores (índice h de los 26 investigadores más consolidados, importe de contratos con empresas y tesis doctorales realizadas bajo el marco del proyecto) aumentaron en torno al 50%, o superaron este valor, en relación con lo fijado en el Convenio de Ejecución.

El firmante de este capítulo, gestor de CARNISENUSA, considera que ampliamente se han cumplido todas las cláusulas recogidas en el Convenio de Ejecución que el Coordinador General, en nombre de todos los investigadores, firmó con el Ministerio y estima que los participantes en el proyecto pueden sentirse satisfechos de haber gestionado con eficacia los recursos públicos que el MEC puso a su disposición.

Nota final: deseo agradecer al Comité de Gestión la posibilidad de participar en el proyecto CARNISENUSA encargándome de su gestión. Ha sido una experiencia muy fructífera en relación con mi perfeccionamiento en las actividades propias del cometido que conlleva una tarea de esta naturaleza y, al tiempo, me ha permitido obtener un mayor conocimiento de la ciencia y tecnología de los productos cárnicos. Por último quisiera agradecer a los investigadores integrantes del proyecto su colaboración y disponibilidad facilitándome en todo momento el trabajo de gestión. Muchas gracias a todos.

# APÉNDICE I

## Lista oficial de participantes en el proyecto

| <i>Investigador</i>                       | <i>E-mail</i>            | <i>Organización</i>                                      | <i>Subproyecto/s</i> |
|---|--------------------------|--|----------------------|
| Aguirre García, Juan salvador             | juaguirr@ucm.es          | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                  | PROCARTE             |
| Altisent Gómez, Anna                      | annaaltisentgomez@ub.edu | Universitat de Barcelona (UB)                            | PROCARTE             |
| Andrade Gracia, María Jesús               | mjandrad@unex.es         | Universidad de Extremadura (UEX)                         | DETRAPAT             |
| Andrés Nieto, Ana Isabel                  | aiandres@unex.es         | Universidad de Extremadura (UEX)                         | NITRARED             |
| Ansorena Artieda, Diana                   | dansorena@unav.es        | Universidad de Navarra (UN)                              | FUNCIOCA             |
| Antequera Rojas, M <sup>a</sup> Teresa    | tantero@unex.es          | Universidad de Extremadura (UEX)                         | NITRARED             |
| Aranda Medina, Emilio                     | earanda@unex.es          | Universidad de Extremadura (UEX)                         | DETRAPAT             |
| Ariño Moneva, Agustín                     | aarino@unizar.es         | Universidad de Zaragoza (UZ)                             | DETRAPAT             |
| Arnau Arboix, Jacint                      | jacint.arnau@irta.cat    | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA) | NITRARED             |
| Asensio Pérez, Miguel Ángel               | masensio@unex.es         | Universidad de Extremadura (UEX)                         | DETRAPAT             |
| Astiasarán Anchía, Iciar                  | iastiasa@unav.es         | Universidad de Navarra (UN)                              | FUNCIOCA             |
| Aymerich Calvet, Teresa                   | teresa.aymerich@irta.cat | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA) | DETRAPAT y PROCARTE  |
| Bastida Codina, Sara                      | sbastida@farm.ucm.es     | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                  | FUNCIOCA             |
| Beguiristain Celayeta, Nerea              | nbeguiristain@ub.edu     | Universitat de Barcelona (UB)                            | PROCARTE             |
| Beltran García, José Antonio              | jbeltran@unizar.es       | Universidad de Zaragoza (UZ)                             | NITRARED             |
| Benedí González, Juana                    | jbenedi@farm.ucm.es      | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                  | FUNCIOCA             |
| Benedito Fort, José Javier                | jjbenedi@tal.upv.es      | Universidad Politécnica de Valencia (UPV)                | PROCARTE             |
| Benito Bernaldez, M <sup>a</sup> José     | mjbenito@unex.es         | Universidad de Extremadura (UEX)                         | DETRAPAT             |
| Bermúdez Polo, M <sup>a</sup> Elena       | bermudez@unex.es         | Universidad de Extremadura (UEX)                         | DETRAPAT             |
| Bon Corbin, José                          | jbon@tal.upv.es          | Universidad Politécnica de Valencia (UPV)                | FUNCIOCA             |
| Bosch Navarro, Albert                     | abosch@ub.edu            | Universitat de Barcelona (UB)                            | PROCARTE             |
| Bover Cid, Sara                           | sara.bover@irta.cat      | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA) | DETRAPAT y PROCARTE  |
| Cabeza Briales, M <sup>a</sup> Concepción | ccabezab@vet.ucm.es      | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                  | PROCARTE             |
| Calvarro Labrador, Julia                  | jcalvarro@hotmail.com    | Universidad de Extremadura (UEX)                         | NITRARED             |

| <i>Investigador</i>                      | <i>E-mail</i>                       | <i>Organización</i>   | <i>Subproyecto/s</i>          |
|--|-------------------------------------|---|-------------------------------|
| Calvo Rodríguez, Marta M <sup>a</sup>    | mmcalvo@ifi.csic.es                 | Instituto de Ciencia y tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC)       | FUNCIOCA                      |
| Calzada Gómez, Javier                    | jcalzada@inia.es                    | Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) | PROCARTE                      |
| Cambero Rodríguez, M <sup>a</sup> Isabel | icambero@ucm.es                     | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                       | PROCARTE                      |
| Cañeque Martínez, Vicente                | Jubilado                            | Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) | FUNCIOCA                      |
| Carballo Santaolalla, José               | jcarballo@ictan.csic.es             | Instituto de Ciencia y tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC)       | NITRARED                      |
| Carbonell Izquierdo, Vicente Fco.        | vcarbonell@ainia.es                 | Centro Tecnológico ainia (ainia)  | DETRAPAT                      |
| Cárcel Carrión, Juan Andrés              | jcarcel@tal.upv.es                  | Universidad Politécnica de Valencia (UPV)                                     | PROCARTE, NITRARED y FUNCIOCA |
| Carramiña Esteban, Juan José             | carramin@unizar.es                  | Universidad de Zaragoza (UZ)  | DETRAPAT                      |
| Carrasco Manzano, Juan Atanasio          | Jubilado                            | Instituto de Ciencia y tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC)       | FUNCIOCA                      |
| Carraspiso Martínez, Ana Isabel          | acarrapi@unex.es                    | Universidad de Extremadura (UEX)  | NITRARED                      |
| Carreras Malonda, José Enrique           | jecarreres@ainia.es                 | Centro Tecnológico ainia (ainia)  | DETRAPAT                      |
| Castellari, Massimo                      | massimo.castelalri@irta.cat         | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | DETRAPAT                      |
| Claret Coma, Anna                        | anna.claret@irta.cat                | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED                      |
| Clemente Polo, Gabriela                  | gclemen@tal.upv.es                  | Universidad Politécnica de Valencia (UPV)                                     | NITRARED, FUNCIOCA            |
| Cofrades Barbero, Susana                 | scofrades@ictan.csic.es             | Instituto de Ciencia y tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC)       | FUNCIOCA                      |
| Comaposada Beringues, Josep              | josep.comaposada@irta.cat           | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED                      |
| Córdoba Ramos, Juan José                 | jcordoba@unex.es                    | Universidad de Extremadura (UEX)  | DETRAPAT                      |
| Córdoba Ramos, M <sup>a</sup> de Guía    | mdeguia@unex.es                     | Universidad de Extremadura (UEX)  | DETRAPAT                      |
| Dalmau Bueno, Antoni                     | antoni.dalmau@irt.cat               | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | DETRAPAT                      |
| del Olmo Sánchez, Ana                    | ana.olmo@inia.es                    | Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) | PROCARTE                      |
| Delgado Pando, Gonzalo                   | Finalizada su vinculación con ICTAN | Instituto de Ciencia y tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC)       | FUNCIOCA                      |
| Díaz López, Isabel                       | isabel.diaz@irta.cat                | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | FUNCIOCA                      |
| Escudero Portugués, Rosa                 | rosaescu@quim.ucm.es                | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                       | PROCARTE                      |
| Estévez García, Mario                    | mariovet@unex.es                    | Universidad de Extremadura (UEX)  | NITRARED                      |

| <i>Investigador</i>                       | <i>E-mail</i>               | <i>Organización</i>   | <i>Subproyecto/s</i> |
|---|-----------------------------|---|----------------------|
| Fabrega Romans, Emma                      | emma.fabregas@irta.cat      | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | PROCARTE             |
| Felipe Cuyas, Xavier                      | xavier.felipe@irta.cat      | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED             |
| Fernández Álvarez, Manuela                | manuela@vet.ucm.es          | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                       | NITRARED y PROCARTE  |
| Fernández García, Estrella                | fgarcia@inia.es             | Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) | PROCARTE             |
| Fernández Hospital, Xavier                | xfernand@vet.ucm.es         | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                       | NITRARED             |
| Font Furnols, Maria                       | maria.font@irta.cat         | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | PROCARTE             |
| Fuentes Pardo, Cristina                   | cfuentes@ub.edu             | Universitat de Barcelona (UB)   | PROCARTE             |
| Galán Trigo, Irene                        | irengt@gmail.com            | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                       | FUNCIOCA             |
| Gámez Losada, M <sup>a</sup> Carmen       | carmen307@hotmail.com       | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                       | FUNCIOCA             |
| Gañán Martínez-Ballesta, Mónica           | monicaganan@gmail.com       | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                       | PROCARTE             |
| García de Fernando Minguillón, Gonzalo D. | mingui@ucm.es               | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                       | PROCARTE             |
| García González, Carmen                   | cgarciag@unex.es            | Universidad de Extremadura (UEX)  | NITRARED             |
| García Iñiguez de Ciriano, Mikel          | mginiguezde@alumni.unav.es  | Universidad de Navarra (UN)   | FUNCIOCA             |
| García López, M <sup>a</sup> Luisa        | mlgarl@unileon.es           | Universidad de León (ULE)   | DETRAPAT             |
| García Márquez, Irene                     | ire-gm@hotmail.com          | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                       | PROCARTE             |
| García Pérez, José Vicente                | jogarpe4@tal.upv.es         | Universidad Politécnica de Valencia (UPV)                                     | PROCARTE, NITRARED   |
| García Regueiro, José Antonio             | joseantonio.garcia@irta.cat | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | FUNCIOCA y NITRARED  |
| García Sanz, M <sup>a</sup> Luisa         | mlgarci@vet.ucm.es          | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                       | FUNCIOCA             |
| Garriga Turón, Margarita                  | margarita.turón@irta.cat    | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | DETRAPAT y PROCARTE  |
| Gaya Sicilia, Pilar                       | pgaya@inia.es               | Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) | PROCARTE             |
| Gil Farre, Marta                          | marta.gil@irta.cat          | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | FUNCIOCA             |
| Gisbert Viguer, Marta                     | mgisbert@ainia.es           | Centro Tecnológico ainia (ainia)  | NITRARED             |
| Gispert Martinell, Marina                 | marina.gispert@irta.cat     | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED             |
| Gómez Lozano, Diego                       | dgomez@unizar.es            | Universidad de Zaragoza (UZ)  | DETRAPAT             |
| Gómez Salazar, Julián Andrés              | juangocero@hotmail.com      | Universidad Politécnica de Valencia (UPV)                                     | NITRARED             |
| Gonzalez Armangué, Joel                   | joel.gonzalez@irta.cat      | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED             |

| <i>Investigador</i>                 | <i>E-mail</i>                  | <i>Organización</i>   | <i>Subproyecto/s</i> |
|-------------------------------------|--------------------------------|---|----------------------|
| Gordillo Durán, Rubén               | rugodu@unex.es                 | Universidad de Extremadura (UEX)  | DETRAPAT             |
| Gou Botó, Pere                      | pere.gou@irta.cat              | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED             |
| Granado Lorenzo, Fernando           | fgranado.hpth@salud.madrid.org | Hospital Universitario Puerta de Hierro (HUPH)                                | FUNCIOCA             |
| Gratacós Curbasí, Marta             | marta.gratacos@irta.cat        | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED y FUNCIOCA  |
| Guàrdia Gasull, Dolors              | dolors.guardia@irta.cat        | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED             |
| Guerrero Asorey, Luis               | lluis.guerrero@irta.cat        | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED             |
| Guix Arnau, Susana                  | susanaguix@ub.edu              | Universitat de Barcelona (UB)   | PROCARTE             |
| Hereu Soms, Anna                    | anna.hereu@irta.cat            | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | DETRAPAT y PROCARTE  |
| Herraiz Carasa , Marta              | ifihc23@ifi.csic.es            | Instituto de Ciencia y tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC)       | FUNCIOCA             |
| Herrero Herranz, Ana M <sup>a</sup> | ana.herrero@ictan.csic.es      | Instituto de Ciencia y tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC)       | FUNCIOCA             |
| Hierro Paredes, Eva                 | hierro@vet.ucm.es              | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                       | NITRARED y PROCARTE  |
| Hortós Bahí, Maria                  | maria.hortos@irta.cat          | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | FUNCIOCA             |
| Iglesias Collar, Elsa               | eiglcl@unileon.es              | Universidad de León (ULE)   | DETRAPAT             |
| Jiménez Colmenero, Francisco        | fjimenez@ictan.csic.es         | Instituto de Ciencia y tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC)       | FUNCIOCA             |
| Jofré Fradera, Anna                 | anna.jofre@irta.cat            | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | DETRAPAT y PROCARTE  |
| León Sanz, Miguel                   | mleon@12o.es                   | Hospital 12 de Octubre  | FUNCIOCA             |
| Lloret Fortuny, Elsa                | elsa.lloret@irta.cat           | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED             |
| Lobo Cartagena, Fernando            | gestorali@unex.es              | Universidad de Extremadura (UEX)  | NITRARED y DETRAPAT  |
| Locatelli, Martina                  |                                | Universidad de Milán  | PROCARTE             |
| Lorente Lamas, María                | mlorente@ainia.es              | Centro Tecnológico ainia (ainia)  | NITRARED             |
| Lorés Guerrero, Alberto             | esebertus@gmail.com            | Universidad de Zaragoza (UZ)  | NITRARED             |
| Luque Caballero, María Isabel       | mluque@unex.es                 | Universidad de Extremadura (UEX)  | DETRAPAT             |
| Manzano Jiménez, Susana             | sumanzan@vet.ucm.es            | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                       | PROCARTE             |
| Martin Cáceres, Lourdes             | martinlu@unex.es               | Universidad de Extremadura (UEX)  | NITRARED             |
| Martín González, Alberto            | amartin@unex.es                | Universidad de Extremadura (UEX)  | DETRAPAT             |
| Martín Juárez, Belen                | belen.martin@irta.cat          | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | DETRAPAT y PROCARTE  |
| Martínez Suárez, Joaquín V.         | joaquin@inia.es                | Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) | PROCARTE             |
| Martinez Trias, Brigitte            | brigitte.martinez@irta.cat     | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED             |

| <i>Investigador</i>                      | <i>E-mail</i>               | <i>Organización</i>   | <i>Subproyecto/s</i>     |
|--|-----------------------------|---|--------------------------|
| Medina Fernández-Regatillo, Margarita    | mmedina@inia.es             | Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) | PROCARTE                 |
| Mir Figueras, Dolors                     | dolors.figueras@irta.cat    | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED                 |
| Monfort Bolívar, Josep M <sup>a</sup>    | josep.monfort@irt.cat       | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | DETRAPAT y PROCARTE      |
| Morcuende Sánchez, David                 | demorcuen@unex.es           | Universidad de Extremadura (UEX)  | NITRARED                 |
| Moreno Barber, Amelia                    | amoreno@ainia.es            | Centro Tecnológico ainia (ainia)  | DETRAPAT                 |
| Mulet Pons, Antoni                       | amulet@tal.upv.es           | Universidad Politécnica de Valencia (UPV)                                     | PROCARTE, FUNCIOCA       |
| Muñoz Moreno, Israel                     | israel.munoz@irta.cat       | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED                 |
| Navarro Blasco, Iñigo                    | inavarro@unav.es            | Universidad de Navarra (UN)   | FUNCIOCA                 |
| Navarro Fayos, M <sup>a</sup> Teresa     | mtnavarro@ainia.es          | Centro Tecnológico ainia (ainia)  | FUNCIOCA                 |
| Núñez Breña, Félix                       | fnunez@unex.es              | Universidad de Extremadura (UEX)  | DETRAPAT                 |
| Núñez Gutiérrez, Manuel                  | nunez@inia.es               | Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) | PROCARTE                 |
| Oliver Pratsevall, M <sup>a</sup> Angels | mariaangels.oliver@irta.cat | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | PROCARTE                 |
| Olmedilla Alonso, Begoña                 | bolmedilla@ictan.csic.es    | Instituto de Ciencia y tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC)       | FUNCIOCA                 |
| Ordóñez Pereda, Juan Antonio             | pereda@ucm.es               | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                       | COORDINADOR DEL PROYECTO |
| Ortuño Cases, Carmina                    | carorca1@upvnet.upv.es      | Universidad Politécnica de Valencia (UPV)                                     | PROCARTE                 |
| Otero Carballeira, Andrés                | andres.otero@unileon.es     | Universidad de León (ULE)   | DETRAPAT                 |
| Pérez Beriain, Teresa                    | tpberiaín@gmail.com         | Universidad de Zaragoza (UZ)  | NITRARED                 |
| Pérez Nevado, Francisco                  | fpen@unex.es                | Universidad de Extremadura (UEX)  | DETRAPAT                 |
| Petrón Testón, M <sup>a</sup> Jesús      | mjpgpetron@unex.es          | Universidad de Extremadura (UEX)  | NITRARED                 |
| Picón Gálvez, Antonia M <sup>a</sup>     | apicon@inia.es              | Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) | PROCARTE                 |
| Picouet, Pierre                          | pierre.picouet@irta.cat     | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED                 |
| Pinto Solé, Rosa M <sup>a</sup>          | rpinto@ub.edu               | Universitat de Barcelona (UB)   | PROCARTE                 |
| Realini Cujó, Carolina                   | carolina.realini@irta.cat   | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                      | NITRARED                 |
| Rodrigo Gil, Alejandro                   | arodrigo@ainia.es           | Centro Tecnológico ainia (ainia)  | DETRAPAT                 |
| Rodríguez Calleja, José M <sup>a</sup>   | jm.rcalleja@unileon.es      | Universidad de León (ULE)   | DETRAPAT                 |
| Rodríguez Jiménez, Alicia                | aliciarj@unex.es            | Universidad de Extremadura (UEX)  | DETRAPAT                 |
| Rodríguez Jovita, M <sup>a</sup> del Mar | marrodri@unex.es            | Universidad de Extremadura (UEX)  | DETRAPAT                 |
| Rodríguez Mínguez, Eva                   | minguez@inia.es             | Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) | PROCARTE                 |

| <i>Investigador</i>                             | <i>E-mail</i>                  | <i>Organización</i>   | <i>Subproyecto/s</i> |
|---|--------------------------------|---|----------------------|
| Rodríguez Salas, Lorena                         | lorena.rodriguez@ictan.csic.es | Instituto de Ciencia y tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) | FUNCIOCA             |
| Rodríguez Vargas, M <sup>a</sup> Rosa           | mrrodrig@ucm.es                | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                 | PROCARTE             |
| Romero de Ávila Hidalgo, M <sup>a</sup> Dolores | lolarh@vet.ucm.es              | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                 | PROCARTE             |
| Roncalés Rabinal, Pedro                         | roncales@unizar.es             | Universidad de Zaragoza (UZ)  | NITRARED             |
| Rota García, M <sup>a</sup> Carmen              | crota@unizar.es                | Universidad de Zaragoza (UZ)  | DETRAPAT             |
| Ruiz Carrascal, Jorge                           | jrui@unex.es                   | Universidad de Extremadura (UEx)  | NITRARED             |
| Ruiz-Capillas Pérez, Claudia                    | claudia@ictan.csic.es          | Instituto de Ciencia y tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) | FUNCIOCA             |
| Salvà Vila, Lluís                               | lluis.salva@irta.cat           | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                | GESTOR DEL PROYECTO  |
| Sanchez Climent, M <sup>a</sup> José            | mjsanchez@ainia.es             | Centro Tecnológico ainia (ainia)  | NITRARED             |
| Sanchez Molinero, Filiberto                     | filiberto.sanchez@irta.cat     | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                | NITRARED             |
| Sanchez Muniz, Francisco Javier                 | frasan@farm.ucm.es             | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                 | FUNCIOCA             |
| Sanjuán Martínez, Rosa                          | rsanjuan@ainia.es              | Centro Tecnológico ainia (ainia)  | NITRARED             |
| Sanjuán Pellicer, Neus                          | nsanjuan@tal.upv.es            | Universidad Politécnica de Valencia (UPV)                               | NITRARED             |
| Santamaría Blanco, Guillermo                    | ifigs02@ictan.csic.es          | Instituto de Ciencia y tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) | FUNCIOCA             |
| Santos Buelga, Jesús Ángel                      | j.santos@unileon.es            | Universidad de León (ULE)   | DETRAPAT             |
| Sárraga Escolano, Carmen                        | carmen.sarraga@irta.cat        | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                | NITRARED y FUNCIOCA  |
| Selgas Cortecero, M <sup>a</sup> Dolores        | selgar@ucm.es                  | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                 | FUNCIOCA             |
| Serra Dalmau, Xavier                            | xavier.serra@irta.cat          | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                | NITRARED             |
| Serrano Brocas, Carmen T.                       | cserrano@ainia.es              | Centro Tecnológico ainia (ainia)  | NITRARED             |
| Sola Alados, M <sup>a</sup> Teresa              | msolas@bio.ucm.es              | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                 | FUNCIOCA             |
| Soto Carrión, Ana M <sup>a</sup>                | ana.soto@gmail.com             | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                 | FUNCIOCA             |
| Tejada Sereno, Juan Florencio                   | jftejada@unex.es               | Universidad de Extremadura (UEx)  | NITRARED             |
| Timón Aranda, M <sup>a</sup> Luisa              | mltimon@unex.es                | Universidad de Extremadura (UEx)  | NITRARED             |
| Timón Aranda, M <sup>a</sup> Luisa              | mltimon@unex.es                | Universidad de Extremadura (UEx)  | NITRARED             |
| Tomás Fornés, David                             | dtomas@ainia.es                | Centro Tecnológico ainia (ainia)  | DETRAPAT             |
| Valero Pamplona, Angel                          | angel.valero@irta.cat          | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                | NITRARED y FUNCIOCA  |
| Velarde Calvo, Antoni                           | antoni.valarde@irta.cat        | Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)                | DETRAPAT             |
| Velasco Diego, Raquel                           | rvelasco@ucm.es                | Universidad Complutense de Madrid (UCM)                                 | PROCARTE             |

---

| <i>Investigador</i>       | <i>E-mail</i>      | <i>Organización</i>              | <i>Subproyecto/s</i>                        |
|---------------------------|--------------------|----------------------------------|---|
| Ventanas Barroso, Jesús   | ventanas@une.es    | Universidad de Extremadura (UEX) | COORDINADOR<br>DEL PROGRAMA<br>DE FORMACIÓN |
| Ventanas Canillas, Sonia  | sanvenca@unex.es   | Universidad de Extremadura (UEX) | NITRARED                                    |
| Viadel Crespo, Blanca     | bviadel@ainia.es   | Centro Tecnológico ainia (ainia) | FUNCIOCA                                    |
| Villegas Pascual, Beatriz | bvillegas@ainia.es | Centro Tecnológico ainia (ainia) | NITRARED                                    |
| Yangüela Martínez, Javier | jyangu@unizar.es   | Universidad de Zaragoza (UZ)     | DETRAPAT                                    |

*Participantes en la reunión anual de 2009 (Pamplona)*



*Participantes en la reunión anual de 2012 (Valencia)*





# APÉNDICE II

## Publicaciones

Este apéndice contiene la lista de capítulos de libro, artículos científicos y de divulgación publicados en relación al proyecto CARNISENUSA desde su inicio hasta la fecha de edición de este libro:

### Capítulos de libro

- Fernández, M., Hospital, X.F. y Hierro, E. (2011). Influencia de la concentración de nitratos y nitritos en la microbiota de los productos cárnicos crudos curados. En: "Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables" pág. 159-166. Ed: J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba, y J. Ventanas. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura, Cáceres. ISBN: 978-84-7723-949-9.
- Hierro, E., Hospital, X.F., Fernández, M., Villegas, B., Lorente, M., Sánchez, M.J., García, C., Calvario, J., Sánchez del Pulgar, J., Gratacós-Cubarsí, M. y García-Regueiro, J.A. (2011). Calidad sensorial de productos cárnicos madurados elaborados con distintas concentraciones de nitrificantes. En: "Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables" pág. 145-157. Ed: J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba, y J. Ventanas. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura, Cáceres. ISBN: 978-84-7723-949-9.
- C. Ortuño, R. Rocha, J. Bon, J.A. Cárcel, J. Benedito. (2011). Efecto de la temperatura de secado sobre la capacidad antimicrobiana de extractos de tomillo obtenido mediante fluidos supercríticos. En: "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" pág. 330. Ed: J.A. Ordóñez, Córdoba, y J. Ventanas, J., Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones. ISBN, ISSN: 978-84-7723-949-9.
- C. Ortuño, J. Bon, J. Benedito (2011). Obtención de extractos de tomillo (*Thymus zygis*) con capacidad antimicrobiana mediante fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos. En: "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" pág. 340. Ed: J.A. Ordóñez, Córdoba, y J. Ventanas, J., Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones. Ref. ISBN, ISSN: 978-84-7723-949-9.
- J. Benedito, M.I. Cambero, C. Ortuño, M.C. Cabeza, J.A. Ordóñez, and L. de la Hoz. (2011). Modelling Kinetics of sensory changes and shelf-life in e-beam treated cooked ham. En: "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" págs. 221-225. Ed: J.A. Ordóñez, Córdoba, y J. Ventanas, J., Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones. ISBN, ISSN: 978-84-7723-949-9.
- C. Ortuño, M. Martínez, A. Mulet, J. Benedito (2011). Efecto del estado de crecimiento en las cinéticas de inactivación de *Escherichia coli* usando CO<sub>2</sub> supercrítico. En: "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" págs. 335-339 Ed: J.A. Ordóñez, Córdoba, y J. Ventanas, J., Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones. ISBN, ISSN: 978-84-7723-949-9.
- Ordóñez, J.A. 2011. Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables (CARNISENUSA). En: "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" págs. 25-29. Eds.: J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba, y J. Ventanas, J. Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones. ISBN, ISSN: 978-84-7723-949-9.
- De la Hoz, L.; Cambero, M.I. y Ordoñez, J.A. (2011). Subproyecto PROCARTE: Uso de tecnologías emergentes para garantizar la seguridad alimentaria de productos cárnicos listos para su consumo (RTE). En: "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" págs. 55-61. Eds.: J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba, y J. Ventanas, J. Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones. ISBN, ISSN: 978-84-7723-949-9.
- Cabeza, C.; de la Hoz, L.; Cambero, M.I.; Velasco; García-Márquez, I; Manzano, S. y Ordoñez, J.A. (2011). Higienización y vida útil de alimentos listos para su consumo (RTE) Tratados con electrones acelerados. En: "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" págs. 167-177. Eds.: J.A. Ordóñez, Córdoba, y J. Ventanas, J. Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones. ISBN, ISSN: 978-84-7723-949-9.

- Cambero, M.I.; de la Hoz, L. Cabeza, C.; y Ordoñez, J.A. 2011. Empleo de técnicas espectroscópicas avanzadas (Raman, IRM electrones acelerados en productos derivados de miosistemas. En: "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" págs. 185-191. Eds.: J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba, y J. Ventanas, J. Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones. ISBN, ISSN: 978-84-7723-949-9.
- Fernández, M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A, y Hierro, E. 2011. Utilización de pulsos de luz para la descontaminación de productos cárnicos listos para su consumo. En: "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" págs. 179-183. Eds.: J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba, y J. Ventanas, J. Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones. ISBN, ISSN: 978-84-7723-949-9.
- Ordóñez, J.A., Cambero, M.I., García, M.L. and Cabeza, M.C. 2011. Hazard of Salmonella in the intact shell egg and its possible removal from it. En "Salmonella: Classification, Genetics and Disease Outbreaks". S. Monte and P. E. de Santos. Nova Science Publishers, Inc. New York.
- Aymerich T., Jofré A., Stollewerk K., Rubio R., Comaposada J., Garriga M. (2011). Improving fermented sausages production to meet consumer demands. En: "Libro de abstracts". Ed: TUBITAK-MAM 4th International Congress on Food and Nutrition and SAFE Consortium 3rd International Congress on Food Safety.
- Jiménez Colmenero F, Herrero A., Cofrades S., Ruiz-Capillas C. (2011). Handbook of Meat and Meat Processing / Meat and functional foods. Ed: John Wiley & Son, Inc. Cap. 11, 225-248.
- Ruiz-Capillas, C, Herrero, A.M., Jiménez-Colmenero, F (2011). Natural Antimicrobials in Food Safety and Quality / Reduction of Biogenic Amines in Meat and Meat Products. Ed: M. Rai y M. Chikindas, CAB International. Cap. 11, 154-166.
- Cofrades, S., López-López, I., and Jiménez Colmenero, F. (2011). Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology / Applications of seaweed in meat-based functional foods. Ed: Kim S-K, John Wiley & Son. Inc. Cap. 32, 491-499. ISBN 978-0-470-97918-1.
- Aymerich T., Garriga M., Monfort J.M. (2011). Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in fermented meat products. Woodhead publishing limited.
- Ansorena D., Astiasarán I., (2012). Formulations for Fermented Sausages with Health Attributes". En Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology, Second Edition. Ed: Y. H. Hui and E. Özgül . Evranuz. CRC Press 2012. Pages 623-636.
- Córdoba J.J., Aranda E., Córdoba M.G., Benito M.J. and M. Rodríguez. (2011). "Molecular detection of Clostridium" en: Molecular detection of human bacterial pathogen. Capítulo 33, Páginas: 367-376. Ed: Taylor and Francis. ISBN: 978-1-4398-1239-6
- Andrade M.J, Rodríguez M., Bermúdez E., Núñez F, Asensio M.A and Córdoba J.J. (2011). "Molecular detection of Debaryomyces" en: Molecular detection of human fungal pathogen. Capítulo 65, Páginas: 569-581. Ed: Taylor and Francis. ISBN: 978-14398-1240-2
- Ansorena, D., Navarro, I., García-Iñiguez de Ciriano, M., Berasategi, I., Astiasarán, I. Utilización de extractos vegetales con capacidad antioxidante en la elaboración de productos cárnicos ricos en ácidos grasos poliinsaturados. En: "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" págs. 113-120. Eds.: J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba, y J. Ventanas, J. Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones. ISBN, ISSN: 978-84-7723-949-9.
- Aguirre, J.S., Rodríguez, M.R, García de Fernando, G.D. (2011). Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de microorganismos supervivientes a tratamientos conservantes de los alimentos. En: Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables. Ordóñez, J.A., Córdoba, J.J. y Ventanas, J. (eds.). ISBN: 978-84-7723-949-9. Universidad de Extremadura. pp. 215-220.
- Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C. y Yangüela, J. (2011). Comparación de técnicas de muestreo en superficies de acero inoxidable contaminadas con *Listeria monocytogenes*. En: "Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables" pág. 81-84. Ed: J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba, y J. Ventanas. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura, Cáceres. ISBN: 978-84-7723-949-9.
- Jiménez Colmenero, F. 2011. Diseño y desarrollo de productos cárnicos funcionales. En " *Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables*", págs. 41-48. Eds: Ordóñez, J.A., Ventanas, J. y Córdoba, J.J. Universidad de Extremadura (Servicio de Publicaciones). Cáceres. ISBN: 978-84-7723-949-9.
- Cofrades, S., López-López, I., Ruiz Capillas, C., Jiménez Colmenero, F. 2011. Algas como ingrediente funcional en productos cárnicos: aspectos nutricionales y tecnológicos. En " *Productos cárnicos para el*

- siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables”, págs. 107-111. Eds: Ordóñez, J.A., Ventanas, J. y Córdoba, J.J. Universidad de Extremadura (Servicio de Publicaciones). Cáceres. ISBN: 978-84-7723-949-9.
- Jiménez Colmenero F., Herrero A., Cofrades S., Ruiz-Capillas C. (2012). Meat and functional foods. En “Handbook of Meat and Meat Processing” Ed: John Wiley & Son, Inc. Cap. 11, págs. 225-248.
- Ruiz-Capillas, C, Herrero, A.M., Jiménez-Colmenero, F (2011). Reduction of Biogenic Amines in Meat and Meat Products. En “Natural Antimicrobials in Food Safety and Quality”. Ed: M. Rai y M. Chikindas, CAB International. Cap. 11, 154-166.
- Cofrades, S., López-López, I., and Jiménez Colmenero, F. (2011). Applications of seaweed in meat-based functional foods. En: Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology. Eds: Kim S-K, John Wiley & Son. Inc. Cap. 32, 491-499. ISBN 978-0-470-97918-1.
- Sánchez-Muniz, F.J.; Benedí, J.; Bastida, S.; Olivero-David, R. y González-Muñoz, M.J. “Enzymes and thermally oxidized oils and fats”. Capítulo 5. En: “Frying of foods: Oxidation, Nutrient and Non-Nutrient Antioxidants, Biologically Active Compounds and High Temperatures, Second edition” CAT K10348, pp. 105-155. Boskou, D. and Elmadafa, I. Taylor and Francis Group LLC. (2011).
- Sánchez-Muniz, F.J.; Bocanegra, A.; Benedí, J. y Bastida, S. “Algae and cardiovascular health”. Parte II. Biological properties of algae and algal components. Capítulo 13. En: “Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals”. Ed: Domínguez H Woodhead Publishing. (con el editor).
- Sánchez-Muniz, F.J. y Bastida, S. “Lípidos”. Capítulo II.2 En: Módulo II. “Ingestas de energía, nutrientes, y otros componentes de la dieta. estatus”. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y Fundación Española de la Nutrición (FEN) Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y Fundación Española de la Nutrición (FEN). (2012). En prensa
- Jiménez-Colmenero, F & Delgado-Pando, G. Fibre-enriched meat products. En: *Wholegrain and fibre enriched foods: improving quality*. Delcour & Poutanen (Eds) Woodhead Publishing. (con el editor).
- Cofrades, S, Serdaroglu, M., Jiménez Colmenero, F. Design of foods and beverages containing whole algae. En: Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals. Domínguez (Ed). Woodhead Publishing (con el editor).
- Jiménez Colmenero, F. Chemistry and Physics of Comminuted Meat Products. Non-meat proteins. En: Encyclopedia of Meat Sciences. 2ª Ed. Elsevier: Oxford (con el editor).
- Nuñez M., Medina M. (2012). Elimination of pathogenic bacteria in cheese by high pressure processing. Handbook of Cheese in Health: Production, Nutrition and Medical Sciences. Wageningen Academic Publishers (in press).
- Guix, S., Bosch, A. and Pintó, R.M. Astrovirus taxonomy. En: Astrovirus research, S. Schultz-Cheery (Ed.). Elsevier (in press).
- López-Campos G, Martínez-Suárez J V, Aguado-Urda M, López-Alonso V (2012). Microarray detection and characterization of bacterial foodborne pathogens. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition Series. ISBN 978-1-4614-3249-4, 126 pág. Springer New York. Springer Science+Business Media, LLC 2012
- A. Bosch, S. Guix & R.M. Pintó. Epidemiology of Human Astroviruses. En: Astrovirus Research: Essential Ideas, Everyday Impacts, Future Directions. 2013. S. Schultz-Cherry (Ed.), Springer Science+Business Media, New York, 2013, pp 1-18, DOI 10.1007/978-1-4614-4735-1\_6.
- Cabeza, M.C. Pasteurización de tortilla española mediante ionización electrónica. En “Avances en Microbiología de Alimentos” Ed.: E. González-Fandos. Universidad de la Rioja
- Carballo J. (2011). Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables” págs. 135-138. Eds: Ordóñez, J.A., Ventanas, J. y Córdoba, J.J. Universidad de Extremadura (Servicio de Publicaciones). Cáceres. ISBN: 978-84-7723-949-9.
- Yangüela, J. (2011). Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables. Pág. 81-84. Eds: Ordóñez, J.A., Ventanas, J. y Córdoba, J.J. Universidad de Extremadura (Servicio de Publicaciones). Cáceres. ISBN: 978-84-7723-949-9.
- Herrero, A., Carmona P, Jiménez-Colmenero F, Ruiz-Capillas C. Application of vibrational spectroscopy to study protein structural changes in muscle and meat batter systems/ Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science. Ed: Li-Chan, E., Chalmers, J. y Griffiths P. John Wiley & Sons, Ltd. pp 315-328. 2010. ISBN: 978-0-470-74299-0.
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M. Mulet, A., Peña, R., Benedito, J. (2012). Ultrasonic enhanced microbial inactivation using supercritical carbon dioxide. Proceedings 2nd workshop on Food Safety. Valencia.
- Ruiz J. y Calvarro, J. (2011) Estudio de nitrosaminas en productos cárnicos mediante microextracción en fase sólida (SPME) Productos cárnicos para el siglo XXI: Seguros, nutritivos y saludables pp: 133-137. Servicio de Publicaciones UEx. (ISBN: 84-95872-57-9)

Carballo, J. (2012). Empleo de nitratos y nitritos en productos cárnicos. Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias. Editado por RACVE. Madrid (España). Volumen XX, número 20, pg. 101-120 (ISSN 1135-2795) (Depósito legal M-10.620-1995)

Carballo, J. (2013). Empleo de nitratos y nitritos en productos cárnicos. En Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias. Editado por RACVE. Madrid (España). Volumen XX, número 20, pg. 101-119 (ISSN 1135-2795)(Depósito legal M-10.620-1995).

### Artículos científicos

El número de publicaciones por año y con índice de impacto superior a 0,500 realizadas por el total de los investigadores del proyecto es el siguiente:

| Factor de impacto         | Número de publicaciones |           |           |           |           |           |           |           |          |           |          |           |            |            |
|---------------------------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|------------|------------|
|                           | 2008                    |           | 2009      |           | 2010      |           | 2011      |           | 2012     |           | 2013     |           | TOTAL      |            |
|                           | C                       | P         | C         | P         | C         | P         | C         | P         | C        | P         | C        | P         | C          | P          |
| 1er cuartil (> 1.579)     | 4                       | 10        | 5         | 34        | 10        | 32        | 20        | 41        | 0        | 51        | 0        | 39        | 39         | 207        |
| 2º y 3er cuartil (<1,578) | 11                      | 2         | 15        | 6         | 15        | 3         | 20        | 8         | 0        | 5         | 0        | 2         | 61         | 26         |
| <b>TOTAL</b>              | <b>15</b>               | <b>12</b> | <b>20</b> | <b>40</b> | <b>25</b> | <b>35</b> | <b>40</b> | <b>49</b> | <b>0</b> | <b>56</b> | <b>0</b> | <b>41</b> | <b>100</b> | <b>233</b> |

C: Comprometidas según consta en el Convenio de Ejecución firmado con el MEC.

P: Artículos publicados.

\* Publicadas, DOI, en prensa.

\*\* Enviados, en evaluación y en preparación.

### Publicaciones 2008

- Cáceres, E., García, M.L. and Selgas, M.D. 2008. Conventional and reduced-fat cooked meat sausages enriched with folic acid. *Fleischwirtschaft* 23 (5), 58-60.
- Cáceres, E., García, M.L. and Selgas, M.D. 2008. Effect of pre-emulsified fish oil – as source of PUFA n-3 – on microstructure and sensory properties of mortadella, a Spanish bologna-type sausage. *Meat Science* 80, 183-193.
- Calvo, M.M and Santa-María, G. 2008 Effect of illumination and chlorophylls on stability of tomato carotenoids. *Food Chemistry* 107, 1365-1370.
- Calvo, M.M., García, M.L. and Selgas, M.D. 2008 Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel. *Meat Science* 80, 167-172.
- Herrero, A.M., Carmona, P, Cofrades, S, Jiménez-Colmenero, F. 2008. Raman spectroscopic determination of structural changes in meat batters upon soy protein addition and heat treatment. *Food Research International* 41, 765-772.
- Herrero, A.M., Carmona, P, López-López, I., Jiménez-Colmenero, F. 2008. Raman spectroscopic evaluation of meat batter structural changes induced by thermal treatment and salt addition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 7119-7124.
- Hoz, L., Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Herrero, A. M. y J. A. Ordóñez. 2008. Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by E-beam irradiation. *Journal of Food Protection*. 71, 2001-2006.
- Jofré A., Aymerich T, Monfort J.M, Garriga M. 2008. Application of enterocins A and B, sakacin K and nisin to extend the safe shelf-life of pressurized ready to eat meat products. *European Food Research Technology* 228:159-162.
- Morales P., Calzada J., Ávila M., Nuñez M. 2008. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef by single-cycle and multiple-cycle high pressure treatments. *Journal of Food Protection* 71, 811-815.
- Olmo A., Morales P., Nuñez M. 2008. Bactericidal effect of lactoferrin and its amidated and pepsin digested derivatives on *Pseudomonas fluorescens*: influence of environmental and physiological factors. *Journal of Food Protection* 71, 2468-2474.

- Ruiz-Capillas, C. and Jiménez-Colmenero, F. 2008. Review: Determination of preservatives in meat products by flow injection analysis (FIA). *Food Additives and Contaminants: Part A*. 25 (10), 1167-1178.
- Valencia, I, O'grady, M.N., Ansorena, D., Astiasarán, I., Kerry, J.P. 2008. Enhancement of the nutritional status and quality of fresh pork sausages following the addition of linseed oil, fish oil and natural antioxidants. *Meat Science*. 80(4), 1046-1054.

### Publicaciones 2009

- Aguirre, J.S., Pin C., Rodríguez, M.R, García de Fernando G.D. 2009. Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. *Applied Environmental Microbiology* 75 (22), 6992-6997.
- Andrade, M.J. Rodríguez, M., Casado, E.M Bermúdez, E. and Córdoba J.J 2009. Differentiation of yeasts growing on dry-cured Iberian ham by mitochondrial DNA restriction analysis, RAPD-PCR and their volatile compound production. *Food Microbiology* 26(6), 578-86.
- Barba, C., Calvo, M.M., Herraiz, M. and Santa-María, G. 2009. Detection of radiolytic hydrocarbons by supercritical fluid extraction and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of irradiated cheese. *Food Chemistry* 114, 1517-1522.
- Bastida, S., Sánchez-Muniz, F, Olivero, R., Pérez-Olleros, L., Ruiz-Roso, B., Jiménez-Colmenero, F. 2009. Antioxidant activity of carob fruit extracts in cooked pork meat systems during chilled and frozen storage. *Food Chemistry* 116, 748-754.
- Bocanegra, A.; Bastida, S.; Benedí, J.; Ródenas S.; Sánchez-Muniz, F.J. 2009. Characteristics and Nutritional and Cardiovascular-Health Properties of Seaweeds. *Journal of Medicinal Food* 12, 236-258.
- Bocanegra, A; Bastida, S.; Benedí, J.; Nus, M.; Sánchez-Montero, J.M.; Sánchez-Muniz, F.J. 2009. Effect of seaweed and cholesterol-enriched diets on postprandial lipoproteinaemia in rats. *British Journal of Nutrition* 102,1728-1739.
- Cabeza, M.C., de la Hoz L., Velasco, R., Cambero, M.I. y Ordóñez, J.A. 2009. Safety and quality of ready-to-eat dry fermented sausages subjected to E-beam radiation. *Meat Science* 83, 320-327.
- Canales, A.; Bastida, S.; Librelotto, J.; Nus, M.; Benedí, J.; Sánchez-Muniz, F.J. 2009. Platelet aggregation, eicosanoid production and thrombogenic ratio in individuals at high risk consuming walnut-enriched meat. A cross-over, placebo-controlled study. *British Journal of Nutrition* 102, 134-141.
- Clemente G., Bon J., Benedito J., Mulet A. 2009. Desorption isotherms and isosteric heat of desorption of previously frozen raw pork meat. *Meat Science* 82, 413-418.
- Clemente, G., Bon, J., Sanjuán, N, Mulet, A. 2009. Determination of shrinkage function for pork meat drying. *Drying Technology* 27(3), 143-148.
- Fernández, M., Manzano, S., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A. y Hierro, E. 2009. Pulsed light inactivation of *Listeria monocytogenes* through different plastic films. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 1265-1267.
- Fernández-Martín, F. López-López, I., Cofrades, S., Jiménez Colmenero, F. 2009. Influence of adding Sea Spaghetti seaweed and replacing the animal fat with olive oil or a konjac gel on pork meat batter gelation. Potential protein/alginate association. *Meat Science* 83, 209-217.
- García, M.L., Calvo, M.M. and Selgas, M.D. 2009. Beef hamburguers enriched with lycopene using dry tomato peel as ingredient. *Meat Science* 83, 45-49.
- García-Iñiguez de Ciriano, M., García-Herreros, C., Larequi, E., Valencia, I., Ansorena, D. and Astiasarán, I. 2009.** Use of natural antioxidants from lyophilized water extracts of *borago officinalis* in dry fermented sausages enriched in  $\omega$ -3 PUFA, *Meat Science* 83, 271-277.
- González-Muñoz, M.J.; Bastida, S.; Jiménez, O.; Lorenzo de, C.; Vergara, G. y Sánchez-Muniz, F.J. 2009. The effect of dietary fat on the fatty acids composition and cholesterol content of the eggs from Hy-line and Warren hens. *Grasas y Aceites* 60, 350-359.
- Herrero, A.M, Carmona, P., Ordoñez, J.A., de la Hoz, L. y Cambero, M, L. I. 2009. Raman spectroscopy studies of electron-beam irradiated cold-smoked salmon. *Food Research International* 42, 216-220.
- Herrero, A.M., de la Hoz, L. Ordóñez, J. A., Castejon D. Romero de Avila, D., Cambero, M.I. 2009. Magnetic resonance imaging studies of the cold-set gelation on plasma powder and meat systems. *Food Research International* 42, 1362-1372.
- Herrero, A.M., Jiménez-Colmenero, F., Carmona, P. 2009. Elucidation of structural changes in soy protein isolate upon heating by Raman spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 711-717.

- Hierro, E., Manzano, S., Ordóñez, J.A., de la Hoz, L. y Fernández, M. 2009. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by pulsed light technology. *International Journal of Food Microbiology* 135, 125-130.
- Jofré A., Aymerich T., Grèbol N, Garriga M. 2009. Efficiency of high hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne microorganisms by challenge tests on convenience meat products. *LWT-Food Science and Technology* 42, 924-928.
- Librelotto, L., Bastida, S., Zulin-Botega, D., Jiménez-Colmenero, F. y Sánchez-Muniz, F. 2009. Effect of long frozen storage in the formation of triglyceride alteration compounds of pan-fried functional restructured beef steaks. *Meat Science* 81, 726-730.
- López-López, I., Bastida, S., Ruiz-Capillas, C., Bravo, L., Larrea, M.T., Sánchez-Muniz, F., Cofrades, S. Jiménez-Colmenero, F. 2009. Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Science* 83, 492-498.
- López-López, I., Cofrades, S., Jiménez-Colmenero, F. 2009. Low-fat frankfurters enriched with n-3 PUFA and edible seaweed: effects of olive oil and chilling storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics. *Meat Science* 83, 148-154.
- López-López, I., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. 2009. Design and nutritional properties of potential functional frankfurters based on lipid formulation, added seaweed and low salt content. *Meat Science* 83, 255-262.
- Medina M., Cabeza M.C., Bravo D.A., Cambero I., Montiel R., Ordóñez J.A., Núñez M., Hoz L. 2009. A comparison between E-beam irradiation and high pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: microbiological aspects. *Food Microbiology* 26, 224-227.
- Morales P., Calzada J., Rodríguez B., De Paz M., Nuñez M. 2009. Inactivation of *Salmonella* Enteritidis in chicken breast fillets by single-cycle and multiple-cycle high pressure treatments. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 577-581.
- Olmo A., Morales P., Nuñez M. 2009. Bactericidal effect of lactoferrin and its amidated and pepsin digested derivatives against *Pseudomonas fluorescens* in ground beef and meat fractions. *Journal of Food Protection* 72, 760-765.
- Pinto, R.M., Costafreda, M.I. and Bosch, A. 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Applied Environmental Microbiology* 75, 7350-7355.
- Rivas-Cañedo A., Fernández-García E., Nuñez M. 2009. Volatile compounds in fresh meats subjected to high pressure processing. Effect of the packaging material. *Meat Science* 81, 321-328.
- Rivas-Cañedo A., Fernández-García E., Nuñez M. 2009. Volatile compounds in dry-cured Serrano ham subjected to high pressure processing. Effect of the packaging material. *Meat Science* 82, 162-169.
- Rivas-Cañedo A., Nuñez M., Fernández-García E. 2009. Volatile compounds in Spanish dry-fermented sausage 'salchichón' subjected to high pressure processing. Effect of the packaging material. *Meat Science* 83, 620-626.
- Rodenas de la Rocha, S.; Sánchez-Muniz, F.J.; Gómez-Juaristi, M.; Larrea Marín, M.T. 2009. Trace elements determination in edible seaweeds by an optimized and validated ICP-MS method. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 330-336.
- Ruiz-Capillas, C. and Jiménez-Colmenero, F. 2009. Application of flow injection analysis for determining sulphites in food and beverages: A review. *Food Chemistry* 112, 487-493.
- Salazar, M.P., García, M.L., and Selgas, M.D. 2009. Short-chain fructooligosaccharides as potential functional ingredient in dry fermented sausages with different fat levels. *International Journal of Food Science and Technology* 44 (6), 1100-1107.
- Sánchez-Muniz, F.J., Bastida, S., Gutierrez-García, O., Carbajal, A. 2009. Olive oil-diet improves the statin effects with respect to sunflower oil-diet in men with increased cardiovascular risk. A preliminary study. *Nutrición Hospitalaria* 24, 333-339.
- Selgas, M.D., Garcia, M.L. and Calvo, M.M. 2009. Effects of irradiation and storage on physico-chemical and sensory properties of hamburguers enriched with lycopene. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 1983-1989.
- Selgas, M.D., Salazar, M.P. and García, M.L. 2009. Usefulness of calcium lactate, citrate and gluconate for calcium enrichment of dry fermented sausages. *Meat Science* 82, 478-480.
- Tomás D., Rodrigo A., Hernandez M., Ferrus M.A. 2009. Validation of Real-time PCR and enzyme-linked fluorescent assay-based methods for detection of *Salmonella* spp. in chicken feces samples. *Food Analytical Methods* 2:180-189

Zulim Botega, D.; Bastida S.; Marmesat, S.; Pérez-Olleros, L.; Ruiz-Roso, B.; Sánchez-Muniz, F.J. (2009). "Carob fruit polyphenols reduced tocopherol loss, triacylglycerol polymerization and oxidation in heated sunflower oil" *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86, 419-425.

### Publicaciones 2010

- Ananou, S., Garriga, M., Jofre, A., Aymerich, T., Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E. 2010. Combined effect of enterocin AS-48 and high hydrostatic pressure to control food-borne pathogens inoculated in low acid fermented sausages. *Meat Science*, 84(4), 594-600.
- Andrade, M.J., Córdoba, J.J., Casado, E., Rodríguez, M. 2010. Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage "salchichón". *Meat Science* 85, 256-264.
- Barba, C., G. Santa-Maria, G. Flores, M., Herraiz, M.M. Calvo 2010. Enantiomeric analysis of chiral compounds in irradiated foods using multidimensional gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 752-756.
- Berasategui I., Cuervo M., Ruiz de las Heras A., Santiago S., Martínez J.A., Atiasarán I., Ansorena D. 2010. The inclusion of functional foods enriched in fibre, calcium, iodine, fat-soluble vitamins and n-3 fatty acids in a conventional diet improves the nutrients profile according to the Spanish reference intake. *Public Health Nutrition* 14, 451-458.
- Cabeza M.C., Cambero I., Nuñez M., Medina M., de la Hoz L., Ordóñez J.A. 2010. Lack of growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in temperature abuse of E-beam treated ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Food Microbiology* 27, 777-782.
- Cabeza, M.C., Cárcel, J.A., Ordóñez, J. A., Cambero, M.I., de la Hoz, L., García, M.L. y Benedito, J. 2010. Relationships among selected variables affecting the resistance of *Salmonella enterica*, serovar Enteritidis against to the thermoultrasonication. *Journal of Food Engineering* 98, 71-75.
- Canales, A.; Benedi, J.; Bastida, S.; Corella, D.; Guillen, M; Librelotto, J.; Nus M.; Sánchez-Muniz, F.J. 2010. The effect of consuming meat enriched in walnut paste on platelet aggregation and thrombogenesis varies in volunteers with different apolipoprotein A4 genotype. *Nutrición Hospitalaria* 25, 746-754.
- Castejón, D., Villa, P., Calvo, M.M., Santa-Maria, G., Herraiz, M. and Herrera. A. (2010). H MAS NMR study of smoked Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Magnetic Resonance in Chemistry* 48, 693-703.
- Clariana, M. Gratacós-Cubarsí, M., Hortos, M., García Regueiro, J. A. y Castellari, M. (2010). Analysis of Seven Purine and Pyrimidine derivatives in Pork Meat Products by Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 4294-4299.
- Cofrades, S., López-López, I., Bravo, L., Ruiz-Capillas, C., Bastida, S., Larrea, M. T., Jiménez Colmenero, F. 2010. Nutritional and antioxidant properties of different brown and red spanish edible seaweeds. *Food Science Technology International* 12, 16, 361-370.
- Del Olmo A., Calzada J., Nuñez M. 2010. Antimicrobial effect of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives against *Salmonella enteritidis* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science* 93, 3965-3969.
- Del Olmo A., Morales P., Ávila M., Calzada J., Nuñez M. 2010. Effect of single-cycle and multiple-cycle high pressure treatments on the colour and texture of chicken breast fillets. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 441-444.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. 2010. Healthier lipid combination as functional ingredient influencing sensory and technological properties of low-fat frankfurters. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 859-870.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T., y Jiménez Colmenero, F. 2010. Healthier lipid combination oil-in-water emulsions prepared with various protein systems. An approach for the development of functional meat product. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 791-801.
- Galan, I., García, M.L., Selgas, M.D. 2010. Effect of irradiation on hamburguers enriched with folic acid. *Meat Science* 84, 437-443.
- García-Herreros C., García-Iñiguez de Ciriano M., Astiasarán I., Ansorena D. 2010. Antioxidant activity and phenolic content of water extracts of *Borago officinalis* L.: influence of plant part and cooking procedures. *International Journal of Food Science* 2(22), 156-164.
- García-Iñiguez de Ciriano, M., Larequi E., Rehecho S., Calvo M.I., Cavero R.Y., Navarro-Blasco I., Astiasarán I., Ansorena D. 2010. Selenium, iodine,  $\omega$ -3 PUFA and natural antioxidant from *Melissa officinalis* L.: a combination of components from healthier dry fermented sausages formulation, *Meat Science* 85, 274-279.

- García-Iñiguez de Ciriano, M., Larequi E., Rehecho S., Calvo M.I., Cavero R.Y., Navarro-Blasco I., Astiasarán I., Ansorena D. 2010. Effect of lyophilized water extracts of *Melissa officinalis* on the stability of algae and linseed oil-in-water emulsion to be used as a functional ingredient in meat products, *Meat Science* 85, 373-377.
- González-Muñoz, M.J.; Sánchez-Muniz, F.J.; Ródenas, S.; Sevillano, M.I.; María Teresa Larrea, M.T., and Bastida, S. 2010. Differences in metal and metalloid content in hair of normo and hypertensive postmenopausal women. *Hypertension Research* 33, 219-224.
- Granado-Lorencio, F., López-López, I., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Cofrades, S., Pérez-Sacristán, B., Delgado-Pando, G., Jiménez-Colmenero, F. 2010. Lutein-enriched frankfurter-type products: Physicochemical characteristics and lutein *in vitro* bioaccessibility. *Food Chemistry* 120, 741-748.
- Jiménez Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F. y Olmedilla-Alonso, B. 2010. Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. *Food Chemistry* 123, 959-967.
- Jiménez Colmenero, F., Ventanas, J., y Toldrá, F. 2010. Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet. *Meat Science* 84, 858-893.
- Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Pintado, T., Solas M. T. 2010. Technological and sensory characteristics of reduced/low-fat, low-salt frankfurters as affected by the addition of konjac and seaweed. *Meat Science* 84, 356-363.
- Jiménez-Colmenero, F., Herrero, A., Pintado, T., Solas, M. T. y Ruiz-Capillas, C. (2010). Influence of emulsified olive oil stabilizing system used for pork backfat replacement in frankfurters. *Food Research International* 43, 2068-2076.
- Jiménez-Colmenero, F., Pintado, T., Cofrades, S. y Ruiz-Capillas, C. 2010. Production variations of nutritional composition of commercial meat products. *Food Research International* 43, 2378-2384.
- López-López, I., Cofrades, S., Solas, M.T., Jiménez Colmenero, F. 2010. Frozen storage characteristics of low-salt and reduced-fat beef patties as affected by Wakame addition and replacing pork backfat with olive oil-in-water emulsion. *Food Research International* 43, 1244-1254.
- Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., Astiasarán, I., Piironen, V., Lampi, A.M. 2010. Determination of non-polar and mid-polar monomeric oxidation products of stigmaterol during thermo-oxidation. *Food Chemistry* 122, 277-284.
- Niños, L., Mulet, A., Ventanas, S., Benedito, J. 2010. Ultrasonic assessment of the melting behaviour in fat from Iberian dry-cured hams. *Meat Science* 85, 26-32.
- Olivero David, R., Bastida S., Schultz A., González-Torres L., González-Muñoz M.J., Sánchez-Muniz F.J., Benedí J. 2010. Fasting status and thermally oxidised sunflower oil ingestion affect the intestinal antioxidant enzyme activity and gene expression of male Wistar rats. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 58: 2498-2504.
- Olivero David, R., Gonzalez-Muñoz, M.J., Benedí, J., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F.J. 2010. Thermally-oxidized palm olein exposure increases triglyceride polymer levels in rat small intestine. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 970-976.
- Otaegui-Arrazola, A., Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D., Astiasarán, I. 2010. Oxysterols: a world to explore. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3289-3303.
- Romero de Ávila, M.D., Ordóñez, J.A., de la Hoz, L., Herrero, A.M., Cambero M. I. 2010. Microbial transglutaminase for cold-set binding of unsalted/salted pork models and restructured dry ham. *Meat Science* 84, 747-754.
- Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. 2010. Effect of an argon-containing packaging atmosphere on the quality of fresh pork sausages during refrigerated storage. *Food Control* 21, 1331-1337.
- Sano, D., Pinto, R.M. Omura, T. and Bosch, A. 2010. Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. *Environmental Science and Technology* 44, 808-812.
- Schultz, A., González-Torres, L.; Olivero David, R.; Bastida, S.; Benedí, J.; Sánchez-Muniz, F.J. 2010. Wakame and Nori in restructured meat included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in Wistar rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 65, 290-298.

### Publicaciones 2011

- Aguirre, J.S., Rodríguez, M.R, García de Fernando, G.D. 2011. Effects of electron beam irradiation on variability of the number of survivors and on duration of lag phase of four food-borne organisms. *International Journal of Food Microbiology* 149: 236-246.

- Alonso, R., Picón, A., Gaya, P., Fernández-García, E., Nuñez, M. 2011 Microbiological, chemical, and sensory characteristics of Hispánico cheese manufactured using frozen high pressure treated curds made from raw ovine milk. *International Dairy Journal* 21, 484-492.
- Arqués, J.L., Rodríguez, E., Nuñez, M., Medina, M. 2011. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. *Food Control* 22, 457-461.
- Benedito J., Cambero, M.I., Ortuño, C., Cabeza, M.C., Ordoñez J.A., de la Hoz, L. 2011. Modeling and optimization of sensory changes and shelf-life in vacuum-packaged cooked ham treated by E-beam irradiation. *Radiation*
- Berasategi I., Legarra S., García-Íñiguez de Ciriano M., Rehecho S., Calvo M.I., Yolanda Cavero R., Navarro-Blasco I., Ansorena D., Astiasarán I. 2011. High in omega-3 fatty acids? bologna-type sausages stabilized with an aqueous-ethanol extract of *Melissa officinalis*. *Meat Science* 88 (4), 705-711.
- Berasategi, I., Cuervo, M., Ruiz de las Heras, A., Santiago, S., Martínez, J.A., Astiasarán, I., Ansorena, D. 2011. The inclusion of functional foods enriched in fibre, calcium, iodine, fat-soluble vitamins and omega-3 fatty acids on a conventional diet improve the nutrient profile according to the Spanish reference intakes. *Public Health Nutrition* 14(3), 451-458.
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T. 2011. Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing. *Food Microbiology* 28(4):804-809.
- Burgos, J., de la Hoz, L., Cabeza, M.C., Cambero, I., Ordóñez, J.A. 2011. Viability of freeze-dried cultures of lactic acid bacteria after storage for thirty-four years. *Milchwissenschaft*. 66, 135-137.
- Cabeza, M. C. Cambero, M. I. de la Hoz, L. García, M. L., Ordóñez, J. A. 2011. Effect of the thermoultrasonic treatment on the eggshell integrity and their impact on the microbial quality. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (12) 111-117.
- Cambero, M. I. Cabeza, C., Ordóñez J. A., Hoz, L. 2011. E-beam treatment guarantees the safety and improves the shelf-life of mayonnaise potato salad (MPS). *Foodborne Pathogens Disease* (8) 221-229.
- Campos G., Robles L., Alonso R., Nuñez M., Picon A. 2011. Microbial dynamics during the ripening of a mixed cow and goat milk cheese manufactured using frozen goat milk curds. *Journal of Dairy Science* 94, 4766-4776.
- Canales, A., Sánchez-Muniz, F.J., Bastida, S., Librelotto, J., Nus, M., Corella, D., Guillen, M., Benedi, J. (2011). Effect of walnut-enriched meat on the relationship between VCAM, ICAM, and LTB4 levels and PON-1 activity in ApoA4 360 and PON-1 allele carriers at increased cardiovascular risk. *European Journal of Clinical Nutrition* 65:703-10.
- Clemente G., J. Bon, N. Sanjuan, A Mulet. 2011. Drying modeling of defrosted pork meat under forced convection conditions. *Meat Science* 88, 374-378.
- Cofrades, S., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Jiménez-Colmenero, F. 2011. Quality characteristics of low-salt restructured poultry with microbial transglutaminase and seaweed. *Meat Science* 87, 373-380.
- Cofrades, S., Salcedo, L., Delgado-Pando, G., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. 2011. Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry* 129, 429-436.
- Curiel, J. A., Ruiz-Capillas, C., de las Rivas, B., Carrascosa, A. V., Jiménez-Colmenero, F., Muñoz, R. 2011. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and enterobacteria isolated from fresh pork sausages packaged in different atmospheres and kept under refrigeration. *Meat Science* 88, 368-373.
- Del Olmo A., Calzada J., Nuñez M. 2011. Antimicrobial efficacy of lactoferrin, its amidated and pepsin-digested derivatives, and their combinations, on *Escherichia coli* O157:H7 and *Serratia liquefaciens*. *Letters in Applied Microbiology* 52, 9-14.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Rodríguez-Salas, L., Jiménez-Colmenero, F. 2011. A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté. *Meat Science* 88, 241-248.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T. Triki, M., Jiménez-Colmenero, F. 2011. Low-fat frankfurters formulated with a healthier lipid combination as functional ingredient: Microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation. *Meat Science* 89, 65-71.
- Encalada M.A., Hoyos K.M., Rehecho S., Berasategi I., García-Íñiguez de Ciriano M., Ansorena D., Astiasarán I., Navarro-Blasco I., Cavero R.Y., Calvo M.I. 2011. Anti-proliferative Effect of *Melissa officinalis* on Human Colon Cancer Cell Line. *Plant Foods for Human Nutrition* 66(4), 328.
- Fuentes C., Guix, S., Bosch A., Pintó, R.M. 2011. C-terminal nsP1a protein of human astrovirus is a phosphoprotein which interacts with the viral polymerase through the formation of a heterodimer. *Journal of Virology* 85: 4470-4479.

- Galán, I, García, M.L., Selgas, M.D. 2011. Effects of ionizing irradiation on quality and sensory attributes of ready-to-eat dry fermented sausages enriched with folic acid. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 469-477.
- Galán, I, García, M.L., Selgas, M.D. 2011. Irradiation is useful for manufacturing ready-to-eat cooked meat products enriched with folic acid. *Meat Science* 87, 330-335.
- Gámez, C., Calvo, M.M., García, M.L. and Selgas, M.D. 2011. Tomato powder as source of lycopene and fiber in meat products. *Italian Journal of Food Science* 23 (3), 260-269.
- Gámez, C., García, M.L. Selgas, M.D. and Calvo, M.M. 2011. Irradiation of ready-to-eat sausages containing lycopene. *Italian Journal of Food Science and Technology* 23, 261-268.
- Garde S., Arias R., Gaya P., Nuñez M. 2011 Occurrence of *Clostridium* spp. In ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates. *International Dairy Journal* 21, 272-278.
- Garde S., Avila M., Gaya P., Arias R., Nuñez M. 2011. Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150, 59-65.
- Gordillo, R., Córdoba, J.J., Andrade, M.J., Luque M. I., Rodríguez M. 2011. Development of PCR assays for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat products. *Meat Science* 88, 767-773.
- Gratacós-Cubarsí M., Sárraga C., Clariana M., Regueiro J.A., Castellari M. 2011. Analysis of vitamin B1 in dry-cured sausages by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and diode array detection. *Meat Science* 87(3), 234-8.
- Herrero, A., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. 2011. Olive oil-in-water emulsions stabilized with caseinate: elucidation of protein-lipid interactions by infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids* 25, 12-18.
- Herrero, A.M., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. 2011. Infrared spectroscopic analysis of structural features and interactions in olive oil-in water emulsions stabilized with soy protein. *Food Research International* 44, 360-366.
- Hierro E., Barroso E., de la Hoz L., Ordóñez J.A., Manzano S and Fernández M. (2011). Efficacy of pulsed light for shelf-life extension and inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat cooked meat products. *Innovative Food Science and Emerging Technology* 12. 275-281.
- López-López, I., Cofrades, S., Cañeque, V., Díaz, M. T., López, O. y Jiménez-Colmenero, F. 2011. Effect of cooking on the chemical composition of low-salt, low-fat wakame/olive oil added beef patties with special reference to fatty acid content. *Meat Science* 89, 27-34.
- Luque, M.I., Rodríguez, A., Andrade, M.J., Gordillo, R., Rodríguez M. y Córdoba, J.J. 2011. Development of a PCR protocol to detect patulin producing moulds in Food products. *Food Control* 22, 1831-1838.
- Martín, B., Garriga, M., Aymerich, T. 2011. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at Small-Scale Spanish Factories Producing Traditional Fermented Sausages. *Journal Food Protection* 74 (5), 812-815.
- Martínez, R. M., Barba, C., Calvo, M. M., Santa-María, G., Herraiz, M. 2011. Rapid recognition of irradiated dry-cured ham by on-line coupling of reversed phase liquid chromatography with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Food Protection* 74, 960-966.
- Mattison K., Corneau, N., Bergc, I., Bosch, A., Duizer, E., Gutiérrez-Aguirre, I., L'Homme, Y., Lucero, Y., Luo, Z., Martyres, A., Myrmel, M., O'Ryan, M., Pagotto, F., Sano, D., Svraka, S., Urzua U., Bidawid, S. 2011. Microarray for the confirmation and typing of norovirus RT-PCR products. *Journal of Virological Methods* 173: 233-250.
- Olivero-David, R., Paduano, A., Fogliano, V., Vitaglione, P., Bastida, S., González-Muñoz, M.J., Benedí, J., Sacchi, R., Sánchez-Muniz, F.J. 2011. Effect of thermally oxidized oil and fasting status on the short-term digestibility of ketolinoleic acids and total oxidized fatty acids in rats. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 59:4684-91.
- Olivero-David, R., Schultz-Moreira, A., Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., Bastida S., Benedí, J., Sanchez-Reus M.I., González-Muñoz, M.J., Sánchez-Muniz, F.J. 2011. Effects of Nori- and Wakame-enriched meats with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing Wistar rats. *British Journal of Nutrition* 106:1476-86.
- Rehecho, S., Hidalgo, O., García-Iñiguez de Ciriano, M., Navarro, I., Astiasarán, I., Ansorena, D., Cavero, R.Y., Calvo, M.I. 2011. Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. *LWT - Food Science and Technology* 44 (4), pp. 875-882.

- Rivas-Cañedo A., Juez-Ojeda C., Nuñez M., Fernández-García E. 2011. Effects of high pressure processing on the volatile compounds of sliced cooked pork shoulder during refrigerated storage. *Food Chemistry* 124, 749-758.
- Rivas-Cañedo A., Juez-Ojeda C., Nuñez M., Fernández-García E. 2011. Volatile compounds in ground beef subjected to high pressure processing. A comparison of dynamic headspace and solid-phase microextraction. *Food Chemistry* 124, 1201-1207.
- Rodríguez A., Rodríguez M., Luque M.I., Annemarie F. Justesen, Córdoba J.J. 2011. Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. *International Journal of Food Microbiology* 149, 226-235.
- Rodríguez, A., Luque, M.I., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Asensio, M.A. Córdoba J.J. 2011. Development of real-time PCR methods to quantify patulin-producing molds in food products. *Food Microbiology* 28 1190-1199.
- Ruiz-Capillas, C., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F. 2011. Biogenic amine formation in refrigerated fresh sausage "chorizo" keeps in modified atmosphere. *Journal of Food Biochemistry* doi:10.1111/j.1745-4514.2011.00550.x.
- Sano D., Perez-Sautu U., Guix S., Pintó R.M., Miura T., Okabe S., Bosch A. 2011. Quantification and genotyping of human Sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain. *Applied Environmental Microbiology* 1111-1114.
- Pérez-Sautu, U., Costafreda, M.I., Lite, J., Sala, R., Barrabeig, I., Bosch, A., Pintó R.M. 2011. Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005-2009: Circulation of newly emerging strains. *Journal of Clinical Virology* 52: 98-102.
- Vázquez-Velasco M., Esperanza Díaz L., Lucas R., Gómez-Martínez S., Bastida S., Marcos A., Sánchez-Muniz F.J. 2011. Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on CVD risk factors. *British Journal of Nutrition* 105:1448-52.
- Velasco, R., Ordoñez, J.A., Cabeza, M.C., de la Hoz, L., Cambero, M. I. 2011. Use of the E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese. *International Dairy Journal* (21) 493-500.

### *Publicaciones 2012*

- Aguirre, J., Bravo, M.C., Ordóñez, García de Fernando, G.D. 2012. The Poisson distribution is applied to improve the estimation of individual cell and micropopulation lag phases. *Advances in Microbiology* 2: 146-161.
- Aguirre, J., Ordóñez, J.A., García de Fernando, G.D. 2012. A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of *Bacillus cereus* inactivation and lag phase duration of surviving cells. *International Journal of Food Microbiology* 153, 444-452.
- Barba, C., Santa-María, G., Herraiz, M., Calvo, M.M. 2012. Rapid detection of radiation-induced hydrocarbons in cooked ham. *Meat Science* 90, 697-700.
- Barriuso, B., Otaegui-Arazola, A., Menéndez-Carreño, M., Astiasarán, I., Ansorena, D. 2012. Sterols heating: degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products. *Food Chemistry* 135, 706-712.
- Berasategi, I., Barriuso, I., Astiasarán, I., Ansorena, D. 2012. Stability of avocado oil during heating: comparative study to olive oil. *Food Chemistry* 132 (1), 439-446.
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T. 2012. Response surface methodology to investigate the effect of high pressure processing on *Salmonella* inactivation on dry-cured ham. *Food Research International* 45:1111-1117.
- Cambero, M. I., Cabeza, M.C., Escudero, R., Manzano, S., García-Márquez, I., Velasco, R., Ordóñez J.A. 2012. Sanitation of selected ready-to-eat (RTE) intermediate moisture foods (IMF) of animal origin by E-beam irradiation. *Foodborne Pathogens and Disease* 9, 594-599.
- Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Escudero, R., Manzano, S., García-Márque, I., Velasco, R., Ordoñez, J.A. 2012. Sanitation of selected ready-to-eat intermediate-moisture foods of animal origin by E-beam irradiation. *Foodborne Pathogens and Disease* 9, 594-599.
- Cambero, M.I., Cabeza M.C., Escudero R., Manzano S., Garcia-Márquez I., Velasco R., Ordóñez J.A. 2012. Sanitation of selected ready-to-eat (RTE) intermediate moisture foods (IMF) of animal origin by E-beam irradiation. *Foodborne Pathogens and Disease* 9, (7):594-9.
- Carmona, P., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F., Pintado, T., Herrero, A. M. 2012. Infrared study of structural characteristics of frankfurter formulated with olive oil-in-water emulsion stabilized with casein as pork backfat replacer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 12998-13003.

- Costafreda M.I., Ribes, E., Franch, A., Bosch A., Pintó, R.M. 2012. A single mutation in the glycoprotein A binding site of hepatitis A virus enhances virus clearance from the blood and results in a lower fitness variant. *Journal of Virology* 86: 7887-7895.
- De Alba, M., Bravo, D., Medina, M. 2012. High pressure treatments on the inactivation of *Salmonella* Enteritidis and the characteristics of beef carpaccio. *Meat Science* 92, 823-828.
- De Alba, M., Bravo, D., Medina, M., Park, S.F., Mackey, B.M. 2012. Combined effect of sodium nitrite with high pressure treatments on the inactivation of *Escherichia coli* BW25113 and *Listeria monocytogenes* NCTC 11994. *Letters in Applied Microbiology* 56, 155-160.
- De Alba, M., Montiel, R., Bravo, D., Gaya, P., Medina, M. 2012. High pressure treatments on the inactivation of *Salmonella* Enteritidis and the physicochemical, rheological and color characteristics of sliced vacuum-packaged dry-cured ham. *Meat Science* 91, 173-178.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M. 2012. Effect of lactoferrin and its derivatives, high hydrostatic pressure, and their combinations, on *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas fluorescens* in chicken fillets. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 13, 51-56.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M. 2012. Effect of lactoferrin and its derivatives against gram-positive bacteria in vitro and, combined with high pressure, in chicken breast fillets. *Meat Science* 90, 71-76.**
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Jiménez-Colmenero, F. 2012. Low-fat pork liver pâtés enriched with n-3 PUFA/konjac gel: dynamic rheological properties and technological behaviour during chilling storage. *Meat Science* 92, 44-52
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Jiménez-Colmenero, F. 2012. n-3 PUFA/konjac gel-enriched low-fat pork liver pate: lipid oxidation, microbiological properties and biogenic amine formation during chilling storage. *Meat Science* 92, 762-767
- Escudero, R., Margarita Valhondo, M., Ordoñez, J.A., Hoz, L., Concepción Cabeza, C.M., Velasco, R., Cambero, M.I. 2012. Electron spin resonance (ESR) spectroscopy study of dry-cured ham treated with electron-beam. *Food Chemistry* 133, 1530-1537.
- Fuentes C., Bosch, A., Pinto, R.M., Guix, S. 2012. Identification of human astrovirus genome-linked protein (VPg) essential for virus infectivity. *Journal of Virology* 2012, 86: 10070-10078.
- Galán, I., García, M.L., Selgas, M.D. 2012. Bioaccessibility of folic acid from ready-to-eat meat products using an in vitro static method. *Fleischwirtschaft* , 2, 54-56.
- García-Íñiguez de Ciriano, M., Berasategi, I., Navarro-Blasco, I., Astiasarán, I., Ansorena, D. 2012. Reduction of sodium and increment of calcium and  $\omega$ -3 PUFA in dry fermented sausages: effects on the mineral content, lipid profile and sensory quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (published on line – August 2012).
- García-Íñiguez de Ciriano, M., Larequi, E., Berasategi, I., Calvo, M.I., Cavero, R.Y., Navarro-Blasco, I., Astiasarán, I., Ansorena, D. 2012. A lyophilized Water Extract of *Melissa officinalis* L. as an Effective Natural Antioxidant during the Storage of Dry Fermented Sausages High in  $\alpha$ -Linolenic Acid and DHA. *Journal of Food Science and Engineering* 2, 56-63.
- Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C., Yangüela, J. 2012. Sponge versus mini-roller for the surface microbiological control of *Listeria monocytogenes*, total aerobic mesophiles and *Enterobacteriaceae* in the food industry. *Food Control* 27 (1), 242-247.
- Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C., Yangüela, J. 2012. Comparison of sampling procedures for recovery of *Listeria monocytogenes* from stainless steel food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 75, 1077-1082.
- Gómez, D., McGuinness, S., Reddington, K., O'Grady, J., Yangüela, J., Barry, T. 2012. Evaluation of a Novel *Listeria* Enrichment Broth Combined with a Real-Time PCR Diagnostics Assay for the Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in RTE Pork Products. *International Journal of Food Science and Technology* 48(5), 1103-1108.
- González-Torres, L., Churrua, I., Schultz, Moreira, A.R., Bastida, S., Benedí, J. Portillo, M.P., Sánchez-Muniz, F.J. 2012. Effects of restructured pork containing *Himantalia elongata* on adipose tissue lipogenic and lipolytic enzyme expression of normo- and hypercholesterolemic rats. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics* 2012;5:158-67
- Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T. 2012. High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 154 (3), 15:107-112.
- Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T., Bover-Cid, S. 2012. Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16: 305-315.

- Herrero A.M., Carmona P, Pintado, T, Jiménez-Colmenero F, Ruiz-Capillas, C. 2012. Lipid and protein structure analysis of frankfurters formulated with olive oil-in-water emulsion as animal fat replacer. *Food Chemistry* 135, 133-139
- Hierro, E., Gañán, M., Barroso, E., Fernández, M. 2012. Pulsed light treatment for the inactivation of selected pathogens and the shelf-life extension of beef and tuna carpaccio. *International Journal of Food Microbiology* 158, 42-48.
- Hospital, X.F., Hierro, E., Fernández, M. 2012. Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. *International Journal of Food Microbiology* 153, 395-401.
- Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., Herrero, A., Fernández-Martin, F., Rodríguez, L., Ruiz-Capillas, C. 2012. Konjac gel fat analogue for use in meat products: Comparison with pork fats. *Food Hydrocolloids*, 26, 63-72.
- Jiménez-Martín E., Ruiz, J., Pérez-Palacios, T., Silva, A., Antequera, T. 2012. Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for the Determination of Free Amino Acids as Their Dimethyl-tert-butylsilyl (TBDMS) Derivatives in Animal Source Food. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 60, 2456–2463.
- Linage B., Rodríguez-Calleja J.M., Otero A., García-López M.L., Santos J. 2012. Characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from tank and silo ewes' milk. *Journal of Dairy Science* 95: 1639-1644.
- Luque, M.I., Rodríguez, A., Andrade, M.J., Martín, A., Córdoba, J.J. 2012. Development of a PCR Protocol To Detect Aflatoxigenic Molds in Food Products. *Journal of Food Protection* 75, 85-94.
- Martin B., Garriga M., Aymerich, T. 2012. Pre-PCR treatment as a key factor on the probability of detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat meat products by real-time PCR. *Food Control* 27, 163-169.
- Montiel, R., Bravo, D., De Alba, M., Gaya, P., Medina, M. 2012. Combined effect of high pressure treatments and the lactoperoxidase system on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16, 26-32.
- Montiel, R., De Alba, M., Bravo, D., Gaya, P., Medina, M. 2012. Effect of high pressure treatments on smoked cod quality during refrigerated storage. *Food Control* 23, 429-436.
- Ortuño, C., Martínez Pastor, M.T., Mulet, A., Benedito, J. 2012. Supercritical carbon dioxide inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in different growth stages. *Journal of Supercritical Fluids* 63, 8-15.
- Ortuño, C., Martínez Pastor, M.T., Mulet, A., Benedito, J. 2012. An ultrasound-enhanced system for microbial inactivation using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 15, 31-37.
- Pérez-Palacios T., Ruiz, J., Ferreira, I.M., Petisca, C., Antequera, T. 2012. Effect of solvent to sample ratio on total lipid extracted and fatty acid composition in meat products within different fat content. *Meat Science* 91: 369-373.
- Pérez-Sautu, U., Sano, D., Guix, S., Kasimir, G., Pintó, R.M., Bosch, A. 2012. Human norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment, Spain. *Environmental Microbiology* 14: 494-502.
- Rivas-Cañedo, A., Juez-Ojeda, C., Nuñez, M., Fernández-García, E. 2012. Volatile compounds in low-acid fermented sausage “espetec” and sliced cooked pork shoulder subjected to high pressure processing. A comparison of dynamic headspace and solid-phase microextraction. *Food Chemistry* 132, 18-26.
- Rodríguez, A., Córdoba, J.J., Werning, M.L., Andrade, M.J., Rodríguez, M. 2012. Duplex real-time PCR method with internal amplification control for quantification of verrucosidin producing molds in dry-ripened foods. *International Journal of Food Microbiology* 153, 85-91.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Córdoba, J.J. 2012. Development of a multiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods. *International Journal of Food Microbiology* 155, 10-18.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Justesen, A.F., Córdoba, J.J., 2012. A comparative study of DNA extraction methods to be used in real-time PCR based quantification of ochratoxin A-producing molds in food products. *Food Control* 25, 666-672.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Martín, A., Córdoba, J.J. 2012. Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods. *Food Microbiology* 31:89-99.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Delgado, J., Córdoba, J.J. 2012. Presence of Ochratoxin A on the surface of dry-cured Iberian ham after initial fungal growth in drying stage. *Meat Science* 92, 728-734.

- Rodríguez-Lázaro D., Cook, N., Ruggeri, F., Sellwood, J., Nasser, A., Nascimento, M.S.J, D'Agostino, M., Santos, R., Saiz, J.C., Rzeżutka, A., Bosch, A., Gironés, R., Carducci, A., Muscillo, M., Kovač, K., Diez-Valcarce, M., Vantarakis, A., von Bonsdorff, C.H., de Roda Husman, A.M., Hernández, M., van der Poel, W.H.M. 2012. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiology Reviews* 36: 786-814.
- Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Herrero, A.M., Jiménez-Colmenero, F. 2012. Biogenic amine formation in low- and reduced-fat dry fermented sausages formulated with konjac gel. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 60, 9242-9248.
- Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Herrero, A.M, Rodríguez-Salas, L., Jiménez-Colmenero, F. 2012. Konjac gel as pork backfat replacer in dry fermented sausages: Processing and quality Characteristics. *Meat Science* 92, 144-150
- Sánchez del Pulgar J., Gazquez, A., Ruiz, J. 2012. Chemical, textural and histological features of sous-vide cooked pork meat as influenced by vacuum, cooking temperature and cooking time. *Meat Science* 90, 828-835.
- Sánchez-Muniz FJ. 2012. Dietary fiber and cardiovascular health. *Nutrición Hospitalaria* 27, 40-54.
- Sánchez-Muniz, F. J., Olivero-David, R., Medhi, T., Salcedo, L., González-Muñoz, M. J., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F., Benedi, J. 2012. Antioxidant activity of *Hypericum perforatum* L. extract in enriched n-3 PUFA pork meat systems during chilled storage. *Food Research International* 48, 909-915.
- Santorum, P., García, R., López V., Martínez-Suárez, J.V. 2012. Review. Dairy farm management and production practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in raw milk and beef. *Spanish Journal of Agricultural Research* 10, 360-371.
- Tortajada C., de Olalla, P., Diez, E., Pinto, R.M., Bosch, A., Perez, U., Sanz, M., Cayla, J., Group, S.W. 2012. Hepatitis A among men who have sex with men in Barcelona, 1989-2010: insufficient control and need for new approaches. *BMC Infectious Diseases* 12:11. (doi:10.1186/1471-2334-12-11).
- Triki, M., Jiménez-Colmenero, F., Herrero, A., Ruiz-Capillas, C. 2012. Optimization of a chromatographic procedure for determining biogenic amine concentrations in meat and meat products employing a cation-exchange column with a post-column system. *Food Chemistry* 130, 1066-1073.

### Publicaciones 2013

- Aguirre, J., Rodríguez, M.R., González, R., García de Fernando, G.D. 2013. E-beam irradiation affects the maximum specific growth rate of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Science and Technology* 48:382-386.
- Barba, C., Santa-María, G., Calvo, M.M. 2013. Recognition of irradiated boiled ham by direct introduction into multidimensional gas chromatography. *Food Chemistry* ( <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.004>).
- Barriuso, B, Astiasarán, I, Ansorena, D. 2013. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *European Food Research and Technology* 236 (1), 1-15.
- Canales, A., Sánchez-Muniz, F.J., Nus, M., Bastida, S., Librelotto, J., Guillen, M., Corella, D., Benedi, J. 2013. The antioxidant status response to low-fat and walnut paste-enriched meat differs in volunteers at high cardiovascular risk carrying different PON-1 polymorphisms. *Journal of the American College of Nutrition* 31, 194-205.
- Carballo, J., Andrade, S. 2013. Evolución de los nitros y nitritos durante la curación de salchichones con diferentes niveles de sales nitrificantes. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*. 33(1), 114-115.
- Cofrades, S. Antoniou, I., Solas, M. T., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F. 2013. Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems. *Food Chemistry* doi: 10.1016/j.foodchem.2013.02.097.
- De Alba, M., Bravo, D., Medina, M. 2013. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in dry-cured ham by high pressure treatments combined with biopreservatives. *Food Control* doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.043.
- Del Olmo A., Calzada J., Gaya P., Nuñez M. 2013. Proteolysis, Texture, and Sensory Characteristics of Serrano Hams from Duroc and Large White Pigs during Dry-Curing. *Journal of Food Science* 78, C416-C424.
- Delgado-Pando, G., Celada, P., Sánchez-Muniz, F., Jiménez-Colmenero, F., Olmedilla-Alonso, B. 2013. Effects of improved fat content of frankfurters and pâtés on lipid and lipoprotein profile of volunteers at increased cardiovascular risk. A placebo-controlled study. *European Journal of Nutrition* DOI 10.1007/s00394-013-0502-1.

- Eim, V., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A., Bon, J. 2013. Optimization of the functional effect of the carrot fibre in a dry fermented sausage (Majorcan sobrassada) using artificial neural networks. *Meat Science* DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.02.009
- Galán, I, García, M.L., Selgas, M.D. 2013. Effect of the storage time on the folic acid content of enriched ready-to-eat meat products. *Radiation Physics and Chemistry* (<http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.11.004>).
- Ganan, M., Hierro, E., Hospital, X.F., Barroso, E. and Fernández, M. 2013. Use of pulsed light to increase the safety of ready-to-eat cured meat products. *Food Control* 32, 512-517.
- García-Márquez, I, Cambero, M.I., Ordoñez, J.A. and Cabeza, C.M. 2013. Shelf-life extension and sanitation of fresh pork loin by E-beam treatment. *Journal of Food Protection* 75, 2179-2189. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-217
- García-Márquez, I., Narváez-Rivas, M., Gallardo, E., Cabeza, C.M., León-Camacho, M. 2013. Changes in phospholipids fraction of intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage. *Grasas y Aceites*, 64, 7 -14.
- García-Márquez, I., Ordoñez, J.A. M. Cambero, M.I., and Cabeza, C.M. 2013. Use of E-beam for shelf-life extension and sanitizing of marinated pork loin. *International Journal of Microbiology* doi:10.1155/2012/962846 (Published on-line)
- García-Marquez, I., Ordoñez, J.A., Cambero, M.I. Cabeza, M.C. 2013. Use of E-Beam for shelfLife extension and sanitizing of marinated pork loin. *International Journal of Microbiology* doi:10.1155/2012/962846.
- J. Rodríguez, G. Clemente, N. Sanjuán, J. Bon. 2013. Modeling drying kinetics of thyme (*thymus vulgaris*): theoretical and empirical models, and neural networks. *Food Science and Technology International* DOI: 10.1177/1082013212469614
- Jiménez-Colmenero, F. 2013. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International* 52, 64-74.
- Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., Herrero, A., Solas, M. T. y Ruiz-Capillas, C. 2013. Konjac gel for use as potential fat analogue for healthier meat product development: Effect of chilled and frozen storage. *Food Hydrocolloids*, 30, 351-357.
- Jiménez-Colmenero, F., Triki, M., Herrero, A.M, Rodríguez-Salas, L., and Ruiz-Capillas, C. 2013. Healthy oil combination stabilized in a konjac matrix as pork fat replacement in low-fat, PUFA-enriched, dry fermented sausages. *LWT - Food Science and Technology* 51, 158-163.
- Luque, M.I., Córdoba, J.J., Rodríguez, A., Núñez, F., Andrade, M.J. 2013. Development of a PCR protocol to detect ochratoxin A producing moulds in food products. *Food Control*, 29, 270-278.
- Martin, B., Raurich, S., Garriga, M., Aymerich, T. 2013. Effect of amplicon length in propidium monoazide quantitative PCR for the enumeration of viable cell of *Salmonella* in cooked ham. *Food Analytical Methods* 6:683-690.
- Montiel R., Cabeza M.C., Bravo D., Gaya P., Cambero I., Ordóñez J.A., Nuñez M., Medina M. 2013. A comparison between E-beam irradiation and high pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: colour, texture, safety and sensory characteristics. *Food Bioprocessing Technologies* DOI 10.1007/s11947-012-0954-y.
- Olmedilla-Alonso, B., Jiménez-Colmenero, F. & Sánchez-Muniz, F. 2013. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Science* <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.03.030>.
- Orgaz B, Puga C H, Martínez-Suárez J V, San Jose C. 2013. Biofilm recovery from chitosan action: a possible clue to understand *Listeria monocytogenes* persistence in food plants. *Food Control* 32, 484-489
- Ortuño, C., Martínez Pastor, M.T., Mulet, A., Benedito, J. 2013. Application of high power ultrasound in the supercritical carbon dioxide inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International* 51, 474-481.
- Poyato, C., Navarro-Blasco, I. Astiasarán, I, Ansorena, D. 2013. Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: effect of lipid composition and antioxidant polarity. *Food Research International* 51, 132-140.
- R.M. Pinto, D'Andrea, L., Perez-Rodriguez, F.J., Costafreda, M.I., Ribes, E., Guix, S., Bosch, A. 2013. Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines. *Future Microbiology*, 7: 331-346.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Núñez, F., Martín, A., Córdoba, J.J. 2013. Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. *Food Control*. (In press).

- Rodríguez, A., Werning, M.L., Rodríguez, M., Bermúdez, E., Córdoba, J.J. 2013. Quantitative real-time PCR method with internal amplification control to quantify cyclopiazonic acid producing molds in foods. *Food Microbiology*. En prensa. doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.001
- Roldán M., Antequera, T., Martín, A., Mayoral, A.I., Ruiz, J. 2013. Effect of different temperature-time combinations on physicochemical, microbiological, textural and structural features of sous-vide cooked lamb loins. *Meat Science* 93: 572-578.
- Salcedo-Sandoval, L., Cofrades, S., Ruiz-Capillas Pérez, C., Solas, M.T., Jiménez-Colmenero, F. 2013. Healthier oils stabilized in konjac matrix as fat replacers in n-3 PUFA enriched frankfurters. *Meat Science* 93, 757-766.
- Schultz-Moreira, A.R., García-Fernández, R.A., Bocanegra, A., Teresa Méndez, M., Bastida, S., Benedí, J., Sánchez-Reus, M.I., Sánchez-Muniz, F.J. 2013. Effects of seaweed-restructured pork diets enriched or not with cholesterol on rat cholesterolemia and liver damage. *Food and Chemistry Toxicology* 56, 223-230.
- Toledano, R. M., Martínez, R.M., Barba, C., Cortés, J. M., Calvo, M. M., Santa-María, G. and Herraiz, M. 2013. A quick method for identifying radiolytic hydrocarbons in low fat-containing food. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 479-484.
- Triki, M., Herrero, A. Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. 2013. Effect of preformed konjac gels, with and without olive oil, on the technological attributes and storage stability of merguez sausage. *Meat Science* 93, 351-360.
- Triki, M., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. 2013. Storage stability of low-fat sodium reduced fresh merguez sausage prepared with olive oil in konjac gel matrix. *Meat Science* 94, 438-446.
- Triki, M., Herrero, A.M, Rodríguez-Salas, L., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. 2013. Chilled storage characteristics of low-fat, n-3 PUFA-enriched dry fermented sausage reformulated with a healthy oil combination stabilized in a konjac matrix. *Food Control* 31, 158-165.
- Ruiz-Capillas, C., Carmona, P., Jiménez-Colmenero, F., Herrero, A.M. 2013. Oil bulking agents based on polysaccharide gels in met batters: A Raman spectroscopy study. *Food Chemistry* doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.043.
- Gratacós-Curbasí, M., Sárraga, C., Castellari, M., Guàrdia, M.D., García Regueiro, J.A., Arnau, J. 2013. Vitamins (B1, B2, B3 and B6) content and oxidative stability of Gastrocnemius muscle from dry-cured hams elaborated with different nitrifying salt contents and by two ageing times. *Meat Science* doi/10.1016/j.meatsci.2013.06.007.
- Gratacós-Curbasí, M., Sárraga, C., Castellari, M., Valero, A., García Regueiro, J.A., Arnau, J. 2013. Effect of pH<sub>24h</sub>, curing salts and muscle types on the oxidative stability, free amino acids profile and vitamin B2, B3 and B6 content of dry-cured ham. *Food Chemistry* 141, 3207-3214.

### Artículos de divulgación

- Calvo M.M., Gámez, M.C., García, M.L., Selgas, M.D. (2011). La piel de tomate como fuente de licopeno en productos cárnicos convencionales, listos para el consumo (RTE) y listos para cocinar (RTC). *Eurocarne*, 202, 88-100.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S. y Jiménez Colmenero, F. (2001). Combinación lipídica saludable como ingrediente funcional en el desarrollo de sistemas cárnicos tipo gel/emulsión, influencia sobre el perfil lipídico y propiedades tecnológicas. *Revista de Nutrición Práctica*, 15, 181-183.
- García de Fernando, G.D., Gañán, M, Rodríguez, M.R., Aguirre, J. (2011). Envasado de alimentos en atmósferas modificadas. *Alimentación, Equipos y Tecnología + Equipack*, 258: 44-49.
- García de Fernando, G.D., Gañán, M, Rodríguez, M.R., Aguirre, J. (2011). ¿Está exento de riesgos microbiológicos el envasado en atmósferas modificadas?. *Alimentación, Equipos y Tecnología + Equipack*, 264: 36-42.
- González, A. Rodríguez, M.R., Aguirre, J. García de Fernando, G.D. (2011). Efecto del tamaño de inóculo en la fase de latencia de *Listeria innocua* a temperaturas de refrigeración. *Reduca Serie Congresos Alumnos*, 3:1.
- Hospital, X.F., Hierro, E. y Fernández, M. (2012). Reducir los conservantes de los embutidos, ¿riesgo o beneficio? *ANICE* 115, 44-45
- Hoz, L., Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Jimenez, Velasco, R., Garcia-Márquez, I., Ordóñez, J.A. 2011. Eficacia de la aplicación de electrones acelerados para la eliminación de patógenos y ampliación de la vida útil en productos cárnicos listos para su consumo. *Cárnica* 2000, 329, 15 17 (2011)

- López-López, I., Cofrades, S. y Jiménez Colmenero, F. (2008). Productos cárnicos más saludables: estrategias tecnológicas para reemplazar grasa animal por otra de origen vegetal o marino. *Eurocarne*, 164, 83-93.
- Lorés A, Pérez-Berriain T y Roncalés P. Desarrollo del color y el flavor en jamones curados con y sin nitrificantes. Implicaciones en la seguridad alimentaria. *Eurocarne* 206, 44-49 (2012).
- Ordóñez, J.A., Cabeza, M.C., Cambero, M. I., de la Hoz L. Aplicación de electrones acelerados para eliminar los patógenos de productos cárnicos listos para su consumo (RTE). *Eurocarne* 197, 62-79. (2011).
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Bernáldez, V., Lozano, D., Córdoba, J.J. Desarrollo de métodos de PCR en tiempo real para la cuantificación de mohos productores de micotoxinas en productos cárnicos madurados. *Eurocarne*, 205, 116-125
- Ruiz-Capillas, C. y Jiménez Colmenero, F. (2008). Aplicación del análisis de inyección de flujo (FIA) a la determinación de nitratos y nitritos en productos cárnicos. *Eurocarne*, 171, 51-58.
- Ruiz-Capillas, C. y Jiménez Colmenero, F. (2009). Aplicación del análisis de inyección de flujo (FIA) a la determinación. sulfitos en alimentos. *Eurocarne*, 407, 108-112.
- Selgas, M.D., García, M.L., Galán, I., Soto, A.M., Gámez, M.C., Santa-María, G., Herraiz, M. and Calvo, M.M. (2011). Actividades del grupo UCM-CSIC realizadas en el marco del Proyecto Consolider-Ingenio 2010 (Subproyecto FUNCIOCA). *Cárnica* 2000, 4, 67-73.
- Soto, A.M., García, M.L. and Selgas, M.D. (2009). Productos cárnicos madurados enriquecidos con Glucinato-D-cálcico. *Revista de Ciencias Veterinarias* 3 (2), 41-50.

