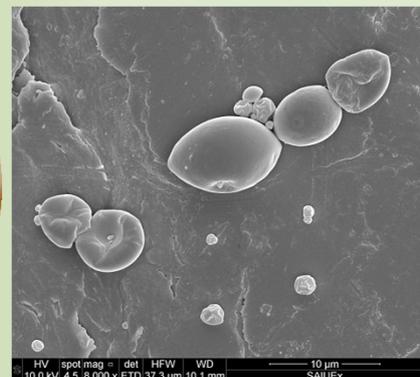


# PRODUCTOS CÁRNICOS SEGUROS, NUTRITIVOS Y SALUDABLES

RED DE EXCELENCIA CONSOLIDER PROCARSE



**Editores:**

**M. Núñez, F. Jiménez-Colmenero, J.J. Córdoba**





# **Productos Cárnicos Seguros, Nutritivos y Saludables**

---

## **RED DE EXCELENCIA CONSOLIDER PROCARSE**

**Cáceres, 4-5 de octubre de 2017**

Editores: M. Núñez, F. Jiménez-Colmenero, J.J. Córdoba

Edita: Red Consolider PROCARSE



Red de Excelencia CONSOLIDER  
PROCARSE AGL2014-51742-REDC



ISBN: 978-84-697-6357-5

Depósito Legal: CC - 317 - 2017

Impreso en España-Printed in Spain

Impresión: Comunica y Centro de Impresión

## Prólogo

La Red de Excelencia Consolider PROCARSE "Productos Cárnicos Seguros, Nutritivos y Saludables" (AGL2014-51742-REDC) se aprueba por Resolución de la Secretaría de Estado de Investigación de fecha 26 de noviembre de 2014 con un periodo de ejecución del 1-12-2014 al 30-11-2016. Posteriormente se solicita y concede una prórroga de un año de duración, hasta el 30-11-2017. Agradecemos al Ministerio de Economía y Competitividad la financiación recibida, que ha permitido llevar a cabo durante estos tres años la actividad de la Red.

La Red PROCARSE, al igual que las otras Redes de Excelencia Consolider, surge de un proyecto de investigación del Programa Consolider Ingenio 2010 del Ministerio de Ciencia e Innovación, en el que los principales grupos especializados en un determinado ámbito de investigación a nivel nacional, junto con empresas colaboradoras, se asocian para abordar unos objetivos ambiciosos de investigación y desarrollo que rebasan las capacidades individuales de los equipos. En nuestro caso, nace del proyecto Consolider CARNISENUSA "Productos Cárnicos para el siglo XXI: Seguros, nutritivos y saludables", coordinado por el Prof. Juan Antonio Ordóñez Pereda, que se desarrolló con gran éxito desde 2007 a 2013. Por causas ajenas a su voluntad, el Prof. Ordóñez no ha podido actuar como coordinador de esta Red PROCARSE, aunque ha inspirado y contribuido a muchas de las actividades de la misma haciéndose acreedor una vez más a nuestro agradecimiento.

En la Red PROCARSE han participado un total de 65 investigadores pertenecientes a siete Universidades (Barcelona, Complutense de Madrid, Extremadura, León, Navarra, Politécnica de Valencia y Zaragoza), tres Organismos Públicos de Investigación (CSIC, INIA e IRTA) y una Asociación de Investigación (AINIA).

Durante los tres años de duración de la Red PROCARSE hemos mantenido reuniones periódicas de los integrantes de la misma. Después de una reunión inicial de constitución de la Red en la Facultad de Veterinaria de Madrid, las siguientes reuniones se han celebrado en la Facultad de Veterinaria de León, el INIA de Madrid y la Facultad de Veterinaria de Cáceres. En estos encuentros hemos tenido ocasión de constatar los avances en investigación y desarrollo de los equipos de la Red así como de aprovechar las sinergias entre ellos para estructurar y poner en marcha nuevos proyectos de investigación sobre temas de interés para el sector cárnico, algunos de cuyos representantes han asistido también a nuestras reuniones.

Es de destacar la participación de los investigadores de la Red en el diseño y organización de dos importantes estrategias de investigación y desarrollo a nivel nacional. La primera de ellas es el Proyecto Listeria Cero, plasmado en un Convenio de Investigación entre el INIA, la Asociación Interprofesional del Cerdo Ibérico (ASICI) y la Asociación Interprofesional Porcino de Capa Blanca (INTERPORC). Sus objetivos son 1) la caracterización de las fuentes de contaminación de *L. monocytogenes* en las industrias cárnicas y la inactivación durante el proceso de elaboración del jamón curado, 2) la evaluación de los sistemas de eliminación de *L. monocytogenes* en instalaciones y productos mediante estrategias de agua electrolizada, fagos y bioconservación y 3) nuevas estrategias de eliminación de *L. monocytogenes* en jamón curado mediante tecnologías no térmicas de altas presiones e irradiación. En el proyecto Listeria Cero participan 5 equipos de investigación de la Red.

La segunda estrategia de investigación y desarrollo con una decisiva participación de los investigadores de la Red son los Grupos Operativos del Programa Nacional de Desarrollo Rural. En la primera fase, de constitución de los grupos operativos, se aprobó el Grupo Operativo sobre "Potenciación de los aspectos saludables de los productos cárnicos", estructurado en tres objetivos específicos: 1) estrategias sobre el

uso de nitratos y nitritos, 2) estrategias sobre el contenido en sodio y 3) estrategias sobre la grasa total. En este grupo operativo participan 7 equipos de investigación de la Red.

Además de impulsar y de tomar parte activa en estas dos estrategias de ámbito nacional, los equipos de investigación que forman parte de la Red PROCARSE han participado durante la vida de la misma (2014-2017) en un total de 66 proyectos y contratos de investigación, de ellos 6 proyectos internacionales, 17 proyectos nacionales, 13 proyectos autonómicos y 30 contratos de investigación.

Como fruto de estos proyectos y contratos, los equipos de investigación de la Red han publicado un total de 186 artículos científicos en JCR y de 93 artículos técnicos y de divulgación. Los investigadores han participado en numerosos congresos científicos y jornadas técnicas, en los que han presentado un total de 64 ponencias invitadas y de más de 200 comunicaciones orales y posters. Además han formado parte de los comités científicos y organizadores de muchos de estos congresos y han moderado sesiones de los mismos. Por lo que respecta al desarrollo tecnológico y transferencia de conocimiento a empresas, destaca la obtención de 4 patentes.

El sector cárnico es y va a continuar siendo durante muchos años la principal industria alimentaria de nuestro país. El afán innovador y la pujanza de las empresas cárnicas españolas es encomiable y, ciertamente, se ve favorecido y estimulado por la generación de conocimiento por parte de los equipos de investigación nacionales especializados en carne y productos cárnicos, muchos de ellos punteros a nivel mundial en sus respectivos campos.

La Red de Excelencia Consolider PROCARSE toca a su fin. Pero su espíritu va a persistir mucho tiempo. Los equipos de investigación que la han integrado encontrarán nuevas formas de mantener los estrechos vínculos generados durante el proyecto Consolider CARNISENUSA y la Red PROCARSE y de poder contribuir con los resultados de sus investigaciones al progreso del sector cárnico, en beneficio de la economía y de los consumidores de nuestro país.

Cáceres, a 4 de octubre de 2017

Manuel Núñez Gutiérrez

Coordinador de la Red PROCARSE

## Índice

<b>CALIDAD NUTRICIONAL Y SEGURIDAD QUÍMICA DE PRODUCTOS CÁRNICOS</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I. DESARROLLO Y APLICACIÓN DE SISTEMAS DE ESTRUCTURACIÓN DE ACEITES PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS FUNCIONALES</b> .....	3
I.1 Desarrollos en investigación .....	3
I.2 Producción científica más relevante .....	7
I.3 Congresos, Jornadas y Reuniones .....	11
<b>CAPÍTULO II. DESARROLLO DE INGREDIENTES FUNCIONALES ENRIQUECIDOS EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 Y ANTIOXIDANTES NATURALES: APLICACIÓN A PRODUCTOS CÁRNICOS</b> .....	13
II.1 Desarrollos en investigación .....	13
II.2 Producción científica más relevante .....	18
II.3 Congresos, Jornadas y Reuniones .....	19
<b>CAPÍTULO III. ESTRATEGIAS INNOVADORAS EN EL CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS CÁRNICOS: ASPECTOS SENSORIALES, NUTRICIONALES Y DE SALUD</b> .....	21
III.1 Desarrollos en investigación .....	21
III.2 Producción científica más relevante .....	28
III.2 Congresos, Jornadas y Reuniones .....	33
<b>CAPÍTULO IV. REDUCCIÓN DE SAL EN JAMÓN CURADO: ESTRATEGIAS BASADAS EN UN MEJOR CONTROL DE LA ABSORCIÓN DE SAL E IDENTIFICACIÓN DE DEFECTOS TEXTURALES PARA LA APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS PALIATIVOS.</b> .....	35
IV.1 Desarrollos en investigación .....	35
IV.2 Producción científica .....	39
IV.3 Congresos, Jornadas y Reuniones .....	42
<b>SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA EN PRODUCTOS CÁRNICOS</b> .....	45
<b>CAPÍTULO V. TIPOS PATÓGENOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> EN PEQUEÑOS RUMIANTES Y SU INFLUENCIA EN LA SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS DERIVADOS</b> .....	47
V.1 Desarrollos en investigación .....	47
V.2 Producción científica .....	50
<b>CAPÍTULO VI. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EN JAMÓN CURADO: EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL RIESGO Y ESTRATEGIAS DE ELIMINACIÓN BASADAS EN EL ENVASADO ACTIVO ANTIMICROBIANO</b> .....	51
VI.1 Desarrollos en investigación .....	51
VI.2 Producción científica más relevante .....	56
VI.3 Congresos, Jornadas y Reuniones .....	58
<b>CAPÍTULO VII. INACTIVACIÓN DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EN JAMÓN CURADO MEDIANTE TRATAMIENTOS DE BIOCONSERVACIÓN Y ALTAS PRESIONES</b> .....	61
VII.1 Desarrollos en investigación .....	61
VII.2 Producción científica más relevante .....	66
VII.3 Congresos, Jornadas y Reuniones .....	69

<b>CAPÍTULO VIII. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA SEGURIDAD DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS: REDUCCIÓN DEL CONTENIDO DE NITRIFICANTES Y APLICACIÓN DE PULSOS DE LUZ.....</b>	<b>73</b>
<b>VIII.1 Desarrollos en investigación .....</b>	<b>73</b>
<b>LÍNEA A: EFECTO DE LA REDUCCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRIFICANTES EN LA SEGURIDAD Y EL AROMA DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS CRUDOS CURADOS .....</b>	<b>73</b>
<b>LÍNEA B: APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE PULSOS DE LUZ PARA LA HIGIENIZACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS LONCHADOS .....</b>	<b>76</b>
<b>VIII.2 Producción científica .....</b>	<b>78</b>
<b>CAPÍTULO IX. APLICACIÓN DE ELECTRONES ACELERADOS A JAMÓN CURADO DESHUESADO Y PIEZAS CÁRNICAS REESTRUCTURADAS: ELIMINACIÓN DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>. DETECCIÓN DE MARCADORES DEL TRATAMIENTO.....</b>	<b>81</b>
<b>IX.1 Desarrollos en investigación .....</b>	<b>81</b>
<b>LÍNEA A: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ELECTRONES ACELERADOS EN JAMÓN CURADO DESHUESADO .....</b>	<b>82</b>
<b>LÍNEA B: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ELECTRONES ACELERADOS EN PIEZAS CÁRNICAS REESTRUCTURADAS CON AGENTES DE LIGAZÓN EN FRÍO.....</b>	<b>86</b>
<b>LÍNEA C: ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ELECTRONES ACELERADOS DE JAMONES CURADOS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....</b>	<b>88</b>
<b>LÍNEA D: PENETRACIÓN DE ELECTRONES ACELERADOS EN UN ALIMENTO FORMULADO CON DIVERSOS INGREDIENTES .....</b>	<b>89</b>
<b>IX.2 Producción científica .....</b>	<b>93</b>
<b>CAPÍTULO X. BIOCONTROL DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> Y MOHOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS .....</b>	<b>95</b>
<b>X.1 Desarrollo en investigación .....</b>	<b>95</b>
<b>X.2 Producción científica .....</b>	<b>101</b>
<b>X.3 Congresos, Jornadas y Reuniones .....</b>	<b>105</b>
<b>CAPÍTULO XI. CONTROL DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EN LA INDUSTRIA CÁRNICA.....</b>	<b>107</b>
<b>XI.1 Desarrollos en investigación .....</b>	<b>107</b>
<b>XI.2 Producción científica .....</b>	<b>110</b>
<b>XI.3 Congresos, Jornadas y Reuniones .....</b>	<b>111</b>
<b>CAPÍTULO XII. EVALUACIÓN Y CONTROL DEL RIESGO DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EN JAMÓN .....</b>	<b>113</b>
<b>XII.1 Desarrollos en investigación .....</b>	<b>113</b>
<b>XII.2 Producción científica .....</b>	<b>115</b>
<b>XII.3 Congresos, Jornadas y Reuniones .....</b>	<b>115</b>
<b>CAPÍTULO XIII. VIRUS DE LA HEPATITIS E: UN PROBLEMA EMERGENTE? .....</b>	<b>117</b>
<b>XIII.1 Desarrollos en investigación .....</b>	<b>117</b>
<b>XIII.2 Producción científica .....</b>	<b>121</b>

## **Sección A**

# **CALIDAD NUTRICIONAL Y SEGURIDAD QUÍMICA DE PRODUCTOS CÁRNICOS**



# Capítulo I. Desarrollo y aplicación de sistemas de estructuración de aceites para la obtención de productos cárnicos funcionales

F. Jiménez Colmenero, C. Ruiz-Capillas, S. Cofrades, A.M. Herrero, J. Carballo, M. Freire, T. Pintado.

*Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC). C/ José Antonio Novais, 10. 28040-Madrid.*

## I.1 Desarrollos en investigación

### I.1.1 Introducción

Por sus notables implicaciones en la salud y relativamente alta contribución a su nivel de ingesta, la mejora de aspectos tanto cuantitativos (reducción de grasa), como cualitativos (perfil de ácidos grasos) de los lípidos presentes en los productos cárnicos ha recibido gran atención en los últimos años. Tal mejora se aborda fundamentalmente mediante estrategias tecnológicas que posibilitan la sustitución (en mayor o menor medida) de la grasa animal habitualmente presente en el producto, por otra de características más acordes con las recomendaciones relativas a la salud; esto es, menor proporción de ácidos grasos saturados (AGS) y mayor de monoinsaturados (AGM) y/o poliinsaturados (AGP n-3, especialmente de cadena larga), mejor relación n-6/n-3 AGP y AGP/AGS, y a ser posible sin colesterol. Con tal propósito se han reformulado numerosos productos cárnicos empleando tanto aceites vegetales (oliva, lino, etc.), como de origen marino (pescado y algas), e incluso combinaciones de ellos. Su incorporación en la matriz cárnica se ha realizado empleando distintas estrategias, siendo las más habituales su adición directa o en forma de emulsiones de aceite-en-agua (O/W) utilizando distintos tipos de emulsionantes hidrofílicos (Jiménez-Colmenero, 2007. *Trends Food Sci. Technol.*, 18, 567-578). Sin embargo, por su composición estos materiales lipídicos son de naturaleza más bien líquida a temperatura ambiente, por lo que presentan unas propiedades físico-químicas que difieren notablemente de las de la grasa animal (sólida) a la que tiene el propósito de reemplazar. Esto supone que su aplicación en los procesos de reformulación de productos cárnicos plantea considerables desafíos tecnológicos, al condicionar los atributos de calidad de los nuevos alimentos.

En este contexto, recientemente se han propuesto nuevas estrategias de estabilización y estructuración de aceites para promover la formación de materiales plásticos que presenten propiedades de sólidos, similares a las de la grasa animal, y que además mantengan un perfil lipídico saludable (Jiménez-Colmenero et al., 2015). Este capítulo recoge un resumen de las actividades realizadas por nuestro grupo en relación con el desarrollo y caracterización de esos nuevos materiales lipídicos basados en la formación de agentes de carga, emulsiones simples y dobles estructuradas (hidrogelificadas) y oleogeles. Complementariamente, también se sintetizan diversos aspectos de su aplicación como sustitutos de grasa animal, en procesos de reformulación de varios productos cárnicos.

## I.1.2 Metodología

### Sistemas de estructuración de aceites

Aunque con distintos niveles de desarrollo y caracterización se han formulado tres tipos de sistemas de estabilización/estructuración de aceites para ser empleados a modo de análogos de grasa animal. Estos son: agentes de carga, emulsiones gelificadas y oleogeles (Fig. 1).

- **Agentes de carga.** - Se han obtenido mediante dispersión (por homogenización) de un gran número de gotas de aceite (combinaciones de oliva, lino y pescado) en una fase acuosa en la que se induce un proceso de gelificación de konjac en medio básico (Salcedo-Sandoval et al., 2015a, b).

- **Emulsiones gelificadas.** - Tanto emulsiones simples (aceite-en-agua, O/W) como dobles (agua-en-aceite-en-agua,  $W_1/O/W_2$ ) han sido estructuradas mediante hidrogelificación. Dependiendo de la naturaleza del sistema se han empleado distintos componentes en su elaboración. Como agentes emulsionantes hidrofílicos se han usado distintos materiales proteicos (caseinato sódico, aislado de proteína de soja, chíá, avena, etc.), mientras que como surfactante lipofílico en la preparación de la doble emulsión ha sido utilizado PGPR. Aceites de oliva, lino, perilla, etc., o combinaciones de ellos se han utilizado como fase lipídica de la emulsión. Adicionalmente se ha encapsulado hidroxitirosol y silicio en la fase acuosa interna ( $W_1$ ). La metodología de formación se puede separar según se ha realizado en una o dos fases. La elaborada en una única fase supone la incorporación de todos los ingredientes simultáneamente para ser sometidos a un proceso de homogenización que conduce a la obtención de una emulsión (O/W), para a continuación, y según la naturaleza del agente gelificante, dar lugar al proceso de gelificación que se produce pasado un cierto tiempo cuando el sistema se encuentra en reposo y permanece a una temperatura inferior a 5 °C (Pintado et al., 2015, 2016b). La preparación en dos fases supone realizar primeramente la formación de una emulsión (O/W o  $W_1/O/W_2$ , según el caso), para en una segunda etapa incorporar los agentes gelificantes que, como en el caso anterior, forman las estructuras de gel al cabo de cierto tiempo a temperatura inferior a 5 °C (Flaiz et al., 2016; Cofrades et al., 2017; Freire et al., 2017).

- **Oleogeles.** - Han sido elaborados combinando varios tipos de organogelificantes (etil celulosa, ceras de abeja o carnauba, mono y diacilglicéridos, ...) y de aceites (oliva, lino, girasol y mezcla de oliva, lino y pescado), mediante distintas condiciones de homogenización y calentamiento.

Teniendo en cuenta la naturaleza del sistema y su nivel de desarrollo, se ha llevado a cabo su caracterización básicamente en relación con aspectos nutricionales, estructurales y tecnológicos (Pintado et al., 2015; Salcedo-Sandoval et al., 2015a,b,c,d; Pintado et al., 2016b; Flaiz et al., 2016; Cofrades et al., 2017a, b; Fernández-Martin et al., 2017; Freire et al., 2017; Herrero et al., 2018)

### Reformulación de productos cárnicos

Los nuevos materiales lipídicos descritos se han empleado como sustitutos de grasa (reemplazando grasa animal en distintas proporciones) en procesos de reformulación de varios tipos de productos cárnicos (Fig. 1), entre los que cabe destacar:

- Agentes de carga en productos frescos (tipo hamburguesas) y tratados por el calor (salchichas tipo frankfurt) (Salcedo-Sandoval et al., 2015a, b, d).
- Emulsiones simples estructuradas en salchichas tipo frankfurt (Pintado et al., 2016a, c; Herrero et al., 2017), longaniza (Pintado et al., 2018) y pâté (pendiente de publicación).
- Emulsiones dobles en salchichas tipo frankfurt (Freire et al., 2016) y emulsiones dobles gelificadas en hamburguesas (Freire et al., 2017).
- Oleogeles en pâté (pendiente de publicación).

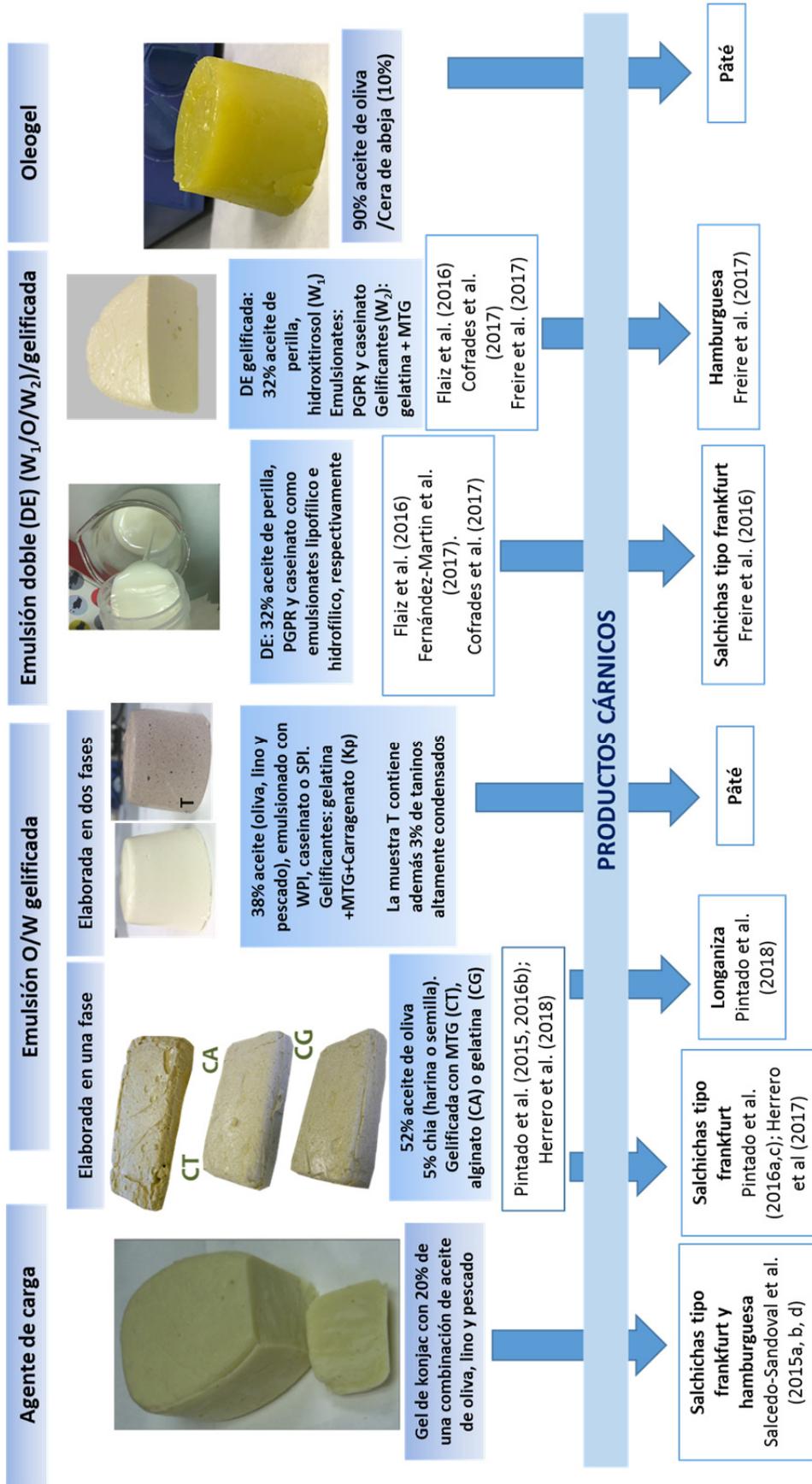


Figura 1. Ejemplos de los sistemas de estructuración de aceites elaborados y su aplicación en productos cárnicos. Transglutaminasa microbiana (MTG); aislado de proteína de suero (WPI) y de soja (SPI); polirricinoleato de poliglicerol (PGPR)

### I.1.3 Resultados y Discusión

#### Sistemas de estructuración de aceites

De acuerdo a su diseño y desarrollo, los nuevos materiales lipídicos han de ser contemplados en base a dos aspectos esenciales y diferenciadores, su composición y características estructurales.

A nivel de composición hay que destacar por un lado la presencia de cantidades variables (según la naturaleza del sistema) de distintos aceites (20% en los agentes de carga, entre 6-52% en las emulsiones O/W, 30% en las  $W_1/O/W_2$  y hasta el 90% en los oleogeles), seleccionados fundamentalmente por su composición en ácidos grasos, que no es modificada tras estos procesos de estructuración (Pintado et al., 2015; Pintado et al., 2016b; Flaiz et al., 2016; Cofrades et al., 2017). Esto supone que todos los sistemas presentan un contenido y perfil de ácidos grasos apropiado para dotar a los productos a los que se incorporen de características más acordes con las recomendaciones sobre salud que las que exhibe la grasa animal a la que va a sustituir. Por otro lado, hay considerar que estos sistemas además han sido formulados conteniendo un amplio abanico de otros compuestos bioactivos, entre los que caben destacar: hidroxitirosol, taninos altamente condensados, Si, Ca, Mg o fibra, entre otros, adicionados como tales o formando parte de ingredientes vegetales. Así por ejemplo, las emulsiones gelificadas en una única fase, basadas en el empleo de chía o avena, aceite de oliva (hasta 52%) y diferentes agentes gelificantes en frío, presentan una interesante composición a nivel de amino ácidos esenciales, ácidos grasos (p.e. oleico y linolénico), fibra dietética, tanto insoluble (principalmente en emulsiones con chía) (Pintado et al., 2015) como soluble ( $\beta$ -glucanos) en emulsiones con avena (Pintado et al., 2016b), minerales tales como el Ca, Fe o Mg en aquellas formuladas con chía (harina o semilla) (Pintado et al., 2015) o Mg y Mn en las elaboradas con avena (Pintado et al., 2016b). Además, algunos de los sistemas de estructuración permiten situar los compuestos bioactivos en localizaciones específicas (con implicaciones tecnológicas y funcionales) aprovechando la morfología y estructura compartimentalizada de la matriz. Este es el caso de las emulsiones  $W_1/O/W_2$  gelificadas (en su fase acuosa externa) empleando MTG y gelatina y conteniendo hasta 300 mg/100 g de hidroxitirosol (HXT) encapsulado en la  $W_1$  (Flaiz et al., 2016; Freire et al., 2017), o de emulsiones doble no gelificadas encapsulando Si (Cofrades et al., 2017).

El segundo aspecto esencial a nivel de diseño es que tales materiales presentan generalmente un estado sólido muy próximo a la de la grasa animal (Fig. 1), si bien sus características (reológicas, texturales, propiedades ligantes de agua y grasa, etc.) están estrechamente ligadas a la estrategia de estructuración y componentes del sistema (emulsionante, gelificante, compuesto encapsulado, etc.). En tal sentido se ha observado que las emulsiones  $W_1/O/W_2$  gelificadas (MTG y gelatina), conteniendo HXT (100 mg/100 g) encapsulado, mostraron un claro comportamiento de gel como lo demuestra que el modulo elástico ( $G'$ ) predomina sobre el modulo viscoso ( $G''$ ) con escasa dependencia de la frecuencia (Freire et al., 2017). De igual modo, se ha postulado que la estructura de las emulsiones (O/W) gelificadas (EG) de chía varía con la naturaleza del agente gelificante. Así, mientras las elaboradas con alginato y gelatina estarían constituidas fundamentalmente por una red polimérica con partículas de tamaño pequeño en su interior que favorece la formación de una estructura firme, las EG de chía que contienen MTG, presentarían una estructura en la que existiría una mayor presencia de gotas de emulsión agregadas que origina una menor firmeza (Pintado et al., 2015).

#### Desarrollo de productos cárnicos

Los nuevos materiales lipídicos obtenidos mediante procedimientos de estructuración de aceite se han empleado en procesos de reformulación de distintos productos cárnicos reemplazando (parcial o totalmente) la grasa animal habitualmente empleada. Las consecuencias de tales procesos han sido analizadas a distintos niveles. Un aspecto esencial radica en su composición que responde a la proporción

relativa de ingredientes empleados (y muy especialmente en la proporción de análogo incorporado) determinada por el diseño de producto y condiciones de procesado. Así, por ejemplo la sustitución de la totalidad del tocino por igual cantidad de EG en salchichas tipo frankfurt (Pintado et al., 2016 a, c; Herero et al., 2017), o su sustitución parcial (90%) en salchichas tipo longaniza (Pintado et al., 2018), favoreció su calidad aminoacídica, contenido lipídico (en especial de ácido linoléico-ALA, asociado a la incorporación de chía), presencia de fibra dietética y de minerales (Pintado et al., 2016 a, c; Pintado et al., 2018). Igualmente, cabe resaltar la presencia de ALA y HXT en hamburguesas elaboradas mediante sustitución parcial (66%) y total (100%) de grasa animal por emulsiones  $W_1/O/W_2$  gelificadas (con aceite de perilla como fase lipídica e hidroxitirosol encapsulado en la fase acuosa interna) (Freire et al., 2017).

En general los procesos de reformulación basados en el empleo de aceites estructurados mejoraron las propiedades ligantes de agua y grasa de los productos, fenómeno estrechamente ligado al comportamiento de estos materiales lipídicos. En cambio, su efecto sobre la textura estuvo condicionado por el tipo de producto, estrategia de estructuración y magnitud del cambio realizado. Dependiendo de diversos factores (tipo de producto, aceite estructurado, nivel de sustitución, etc.) la estrategia de reformulación presentó algunas limitaciones sensoriales, aunque generalmente los productos presentaron niveles de aceptabilidad apropiados. En todo caso resultan productos con adecuada viabilidad tecnológica, microbiológica y sensorial sin limitaciones adicionales en términos de seguridad y vida útil. Por otro lado, hay que destacar que debido a la presencia de distintos compuestos beneficiosos para la salud resulta posible dotar a muchos de estos alimentos de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables (Freire et al., 2016; Freire et al., 2017; Pintado et al., 2016 a, c; Pintado et al., 2018).

### I.1.4 Conclusiones

Las estrategias de estructuración de aceites ofrecen nuevas posibilidades de obtención de sustitutos de grasa animal con una composición (presencia de distintas concentraciones de aceites y de otros compuestos con beneficios para la salud), disposición estructural (con implicaciones tecnológicas y funcionales) y consistencia sólida (próxima a la de la grasa animal) que les hace especialmente apropiados para su empleo como sustitutos de grasa. En tal sentido su utilización en procesos de reformulación añade novedosas oportunidades de desarrollo de derivados cárnicos funcionales.

### I.1.5 Financiación

Proyectos AGL2014-53207-C2-1-R (MINECO); S2013/ABI-2913 (MEDGAN-CM) y 2014470E073 y 201470E056 (CSIC).

## I.2 Producción científica más relevante

### I.2.1 Artículos en revistas científicas

Cavalheiro, C. P., Ruiz-Capillas, C., Herrero, A.M., Jiménez-Colmenero, F., Ragagnin de Menezes, C., & Martins Fries, L.L. (2015). Application of probiotic delivery systems in meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 46, 120-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.09.004>

Celada, P., Delgado-Pando, G., Olmedilla-Alonso, B., Jiménez Colmenero, F., Ruperto, M., & Sánchez-Muniz, F. J. (2015). Impact of improved fat-meat products consumption on anthropometric markers and nutrient intakes of male volunteers at increased cardiovascular risk. *Nutrición Hospitalaria*, 32, 710-721. <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.32.2.9231>

- Celada, P., Sánchez-Muniz, F. J., Delgado-Pando, G., Bastida, S., Espárrago Rodilla, M., Jiménez-Colmenero, F., & Olmedilla-Alonso, B. (2016). Effects of improved fat meat products consumption on emergent cardiovascular disease markers of male volunteers at cardiovascular risk. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 72, 669-678. <http://dx.doi.org/10.1007/s13105-016-0505-5>
- Cofrades, S., Benedí, J., Garcimartin, A., Sánchez-Muniz, F., & Jiménez-Colmenero, F. (2017). A comprehensive approach to formulation of seaweed-enriched meat products: from technological development to assessment of healthy properties. *Food Research International*, 99, 1084-1094. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.029>
- Cofrades, S., Bou, R., Flaiz, L., Garcimartin, A., Benedí, J., Mateos, R., Sánchez-Muniz, F.J., Olivero-David, R. & Jiménez-Colmenero, F. (2017). Bioaccessibility of hydroxytyrosol and n-3 fatty acids as affected by the delivery system: simple, double and gelled double emulsions. *Journal of Food Science and Technology*, 54(7), 1785–1793. <http://link.springer.com/article/10.1007/s13197-017-2604-x>
- Cofrades, S., Bou, R., Gómez-Nieto, B., Procopio, J. R., Errabi, A. & Jiménez-Colmenero, F. (2017). Physicochemical properties and encapsulation of silicon in double emulsions for use as potential ingredient for healthier meat product development. *Journal of Food Science and Technology*, 53(11), 3884–3893. <http://link.springer.com/article/10.1007/s13197-016-2369-7>
- Fernández-Martín, F., Freire, M., Bou, R., Cofrades, S. & Jiménez Colmenero, F. (2017). Olive oil based edible W/O/W emulsions stability as affected by addition of some acylglycerides. *Journal of Food Engineering*, 196, 18-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.10.011>
- Flaiz, L., Freire, M., Cofrades, S., Mateos, R., Weiss, J., Jiménez-Colmenero, F., & Bou, R. (2016). Comparison of simple, double and gelled double emulsions as hydroxytyrosol and n-3 fatty acid delivery systems. *Food Chemistry*, 213, 49-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.005>
- Freire, M., Bou, R., Cofrades, S., Solas, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (2016). Double emulsions to improve frankfurters lipid content: impact of perilla oil and pork backfat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 900-908 <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7163>
- Freire, M., Bou, R., Cofrades, S. & Jiménez-Colmenero, F. (2017). Technological characteristics of cold-set gelled double emulsion enriched with n-3 fatty acids: Effect of hydroxytyrosol addition and chilling storage. *Food Research International*, 100, 298-305. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.047>
- Freire, M., Cofrades, S., Serrano-Casas, V., Pintado, T., Jiménez, M. J., & Jiménez-Colmenero, F. (2017). Gelled double emulsions as delivery systems for hydroxytyrosol and n-3 fatty acids in healthy pork patties. *Journal of Food Science and Technology*, <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-017-2860-9>
- Herrero, A. M., Ruiz-Capillas, C., Pintado, T., Carmona, P. & Jimenez-Colmenero (2017). Infrared spectroscopy used to determine effects of chia and olive oil incorporation strategies on lipid structure of reduced-fat frankfurters. *Food Chemistry*, 221, 1333-1339. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.022>
- Herrero, A.M., Ruiz-Capillas, C, Pintado, T., Carmona, P., & Jiménez-Colmenero, F. (2018). Elucidation of lipid structural characteristics of chia oil emulsion gels by Raman spectroscopy and their relationship with technological properties. *Food Hydrocolloids*, (aceptada).
- Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., Herrero, A. M. & Ruiz-Capillas, C. (2017). Implications of domestic food practices for the presence of bioactive components in meats with special reference to meat-based functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2017.1322937>
-

- Jiménez Colmenero, F., Salcedo-Sandoval, L., Bou, R., Cofrades, S., Herrero, A.M., & Ruiz-Capillas, C. (2015). Novel applications of oil-structuring methods as a strategy to improve the fat content of meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 44, 177-188.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.011>
- Pintado, T., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F., Pasqualin Cavalheiro, C., & Ruiz-Capillas. (2018). Chia and oat emulsion gels as new animal fat replacers and healthy bioactive sources in fresh sausage formulation. *Meat Science*, 135, 6-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.08.004>
- Pintado, T., Herrero, A.M., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. (2016a). Strategies for incorporation of chia (*Salvia hispanica*, L.) in frankfurters as a health-promoting ingredient. *Meat Science*, 114, 75-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.009>
- Pintado, T., Herrero, A., Jiménez-Colmenero, F. & Ruiz-Capillas, C. (2016b). Emulsion gels as potential fat replacers delivering  $\beta$ -glucan and healthy lipid content for food applications. *Journal of Food Science and Technology*, 53(12), 4336-4347. <http://link.springer.com/article/10.1007/s13197-016-2432-4>
- Pintado, T., Herrero, A.M., Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Carmona, P., & Jiménez-Colmenero, F. (2016c). Effects of emulsion gels containing bioactive compounds on sensorial, technological and structural properties of frankfurters. *Food Science and Technology International*, 22, 132-145  
<http://dx.doi.org/10.1177/1082013215577033>
- Pintado, T., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F., Carmona, P., & Herrero, A.M. (2015). Oil-in-water emulsion gels stabilized with chia (*Salvia hispanica* L) and cold gelling agents: technological and infrared spectroscopic characterization. *Food Chemistry*, 185, 470-478.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.024>
- Ruiz-Capillas, C., Tahmouzi, S., Triki, M., Rodríguez-Salas, L., Jiménez-Colmenero, F., & Herrero, A.M. (2015). Nitrite-free Asian hot dog sausages reformulated with nitrite replacers. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 4333-4341. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-014-1460-1>
- Salcedo-Sandoval, L., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (2015a). Konjac-based oil bulking system for development of improved-lipid pork patties: Technological, microbiological and sensory assessment. *Meat Science*, 101, 95-102.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.11.010>
- Salcedo-Sandoval, L., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2015b). Filled hydrogel particles as a delivery system for n-3 long chain PUFA in low-fat frankfurters: consequences for product characteristics with special reference to lipid oxidation. *Meat Science*, 110, 160-168.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.07.013>
- Salcedo-Sandoval, L., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Matalanis, A., McClements, J., Decker, E. A., & Jiménez-Colmenero, F. (2015c). Oxidative stability of n-3 fatty acids encapsulated in filled hydrogel particles and of pork meat systems containing them. *Food Chemistry*, 184, 207-213.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.093>
- Salcedo-Sandoval, L., Ruiz-Capillas, C., Cofrades, S., Triki, M., & Jiménez-Colmenero, F. (2015d). Shelf-life of n-3 PUFA enriched frankfurters formulated with konjac-based oil bulking agent. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 711-717. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.043>

### **I.2.2 Tesis Doctorales dirigidas**

Título: Agente de carga a base de konjac y partículas de hidrogel como nuevos sistemas de incorporación de aceites en productos cárnicos

Doctorando: J. Lorena Salcedo Sandoval

Directores: S. Cofrades, C. Ruiz-Capillas, A. y F. Jiménez Colmenero.

Facultad y Universidad: Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Año: 2015

Calificación: Sobresaliente *cum laude*

Título: Effect of dietary polyphenol-rich grape by-products on growth performance, some physiological parameters, meat and meat products quality in chickens

Doctorando: Maria Nardoia

Directores: D. Casamassima, A. Brenes Payà, y C. Ruiz-Capillas

Facultad y Universidad: Department of Agricultural, Environmental and Food Science. University of Molise (Italy).

Año: 2016

Calificación: 110/110 *cum laude*

Título: Efectos del consumo de productos cárnicos modificados en sujetos con sobrepeso y dislipemia

Doctorando: Paloma Celada Rodríguez

Facultad y Universidad: Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Directores: F. J. Sánchez-Muniz, B. Olmedilla Alonso y F. Jiménez Colmenero.

Año: 2017

Calificación: Sobresaliente *cum laude*

Título: Estrategias de reformulación de productos cárnicos más saludables basadas en la incorporación de emulsiones gelificadas en frío estabilizadas con chía (*Salvia hispanica*, L.) o avena (*Avena sativa*, L.).

Autor: Tatiana Pintado del Campo

Facultad: Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Directores: A. M. Herrero, C. Ruiz-Capillas y F. Jiménez Colmenero.

Fecha de lectura: Octubre, 2017

Calificación:

### **I.2.3 Libros/capítulos de libros**

Herrero, A. M., Carmona, P., Jiménez Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. 2015. Application of vibrational Spectroscopy to elucidate conformational changes promoted by thermal treatment in muscle-based foods. En: Reactions and Mechanisms in Thermal Analysis of Advanced Materials. Chapter 19. Pages: 467-482. Ed: Scrivener Publishing LLC, Co-published John Wiley & Son, Inc

Jiménez Colmenero, F., Herrero, A. M., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C. 2016. Meat: Eating quality and preservation. En: Encyclopedia of Food and Health. Vol. 3. Chapter 453. Pages: 685-692. Ed: Oxford: Academic Press

Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F 2016. Determination of Nitrates and Nitrites. En: Flow Injection Analysis of Food Additives. Chapter 7. Pages: 135-152. Ed: CRC Press. Taylor & Francis Group.

Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F 2016. Determination of sulfites. En: Flow Injection Analysis of Food Additives. Chapter 8. Pages: 153-166. Ed: CRC Press. Taylor & Francis Group.

Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F 2016. Determination of Biogenic Amines. En: Flow Injection Analysis of Food Additives. Chapter 35. Pages: 667-682. Ed: CRC Press. Taylor & Francis Group.

Bou, R., Cofrades, S., Jiménez-Colmenero, F. 2017. Fermented meat sausages. En: Fermented Foods in Health and Disease Prevention. Chapter 10. Pages: 203-235. Ed: Academic Press.

Herrero, A.M., Carmona, P., Jiménez-Colmenero, F., Ruiz-Capillas, C. 2017. Vibrational spectroscopy for quality assesment of meat. En: Poultry Quality Evaluation. Chapter 10. Pages: 247-276. Ed: Woodhead Publishing. Elsevier Ltd.

### I.3 Congresos, Jornadas y Reuniones

#### I.3.1 Ponencias invitadas

Ponente: F. Jiménez Colmenero.

Ponencia: Productos cárnicos funcionales: oportunidades y desarrollo

Congreso: I Congreso Internacional de Conservación para la Industria Agroalimentarias. CIN CIA.

Lugar y fecha: Universidad de Nariño. San Juan de Pasto. Colombia. 16-18 de marzo de 2016.

Ponente: C. Ruiz-Capillas

Ponencia: Productos cárnicos funcionales y sus implicaciones en aspectos de seguridad: Aminas Biógenas

Congreso: 2º Congreso Internacional: Fronteras en Biotecnología.

Lugar y fecha: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Torreón, (México), 24-26 octubre 2016

Ponente: F. Jiménez Colmenero

Ponencia: Estrategias para modificar el perfil lipídico en productos cárnicos funcionales.

Jornadas: I Jornadas sobre Tecnología de Alimentos de Origen Animal.

Lugar y fecha: Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense

Ponente: F. Jiménez Colmenero

Ponencia: Sistemas de estructuración y estabilización de aceites como estrategia para mejorar el perfil lipídico de los alimentos.

Congreso: IX Congreso CyTA – CESIA. Sesión. IV. Tecnologías emergentes. Nuevos avances en encapsulación (micro y nano).

Lugar y fecha: Madrid. 16-19 mayo 2017.

### **I.3.2 Actividades de organización de Congresos, Jornadas y Reuniones**

Congreso: XX National Congress, IX International Congress and XIV Biomedicine and Molecular Biotechnology Scientific meeting.

Lugar y fecha: Boca de Rio Veracruz, México, marzo 16-18, 2016.

Actividad: Miembro del Comité Científico (C. Ruiz-Capillas).

Congreso: The Food Factor I Barcelona Conference

Lugar y fecha: Barcelona. 2-4. Noviembre, 2016.

Actividad: Miembro del International Scientific Advisory Committee (F. Jiménez Colmenero).

## Capítulo II. Desarrollo de ingredientes funcionales enriquecidos en ácidos grasos omega-3 y antioxidantes naturales: aplicación a productos cárnicos

Iciar Astiasarán\*, Diana Ansorena Artieda\*, Maria Isabel Calvo<sup>#</sup>, Rita Yolanda Cavero<sup>§</sup>, Iñigo Navarro Blasco<sup>&</sup>.

*Universidad de Navarra. \*Dpto. Ciencias de la Alimentación y Fisiología; <sup>#</sup> Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica (Sección Farmacognosia); <sup>§</sup>Dpto. Biología Ambiental; <sup>&</sup> Dpto. Química.*

### II.1 Desarrollos en investigación

#### II.1.1 Introducción

La formulación de alimentos funcionales exige, en muchos casos, la adaptación de las condiciones tecnológicas en las que se incorporan los nuevos ingredientes durante el procesado de alimentos. Una de estas opciones es la utilización de sistemas de liberación comestibles, que incluyen emulsiones convencionales, multicapas, de partícula sólida y de partículas de hidrogel. Cada uno de estos sistemas de liberación tiene sus propias ventajas e inconvenientes, protección y distribución de los agentes funcionales, así como su coste, regulación y biocompatibilidad (McClements, 2007).

La actividad investigadora del grupo se ha centrado desde hace más de una década en aspectos relacionados con el desarrollo de ingredientes funcionales que mejoren la calidad nutricional y saludable de los productos cárnicos. En concreto, la actividad en este último periodo partió de una matriz alimenticia desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación, que consiste en un gel de carragenato que incorpora fracción lipídica en un 40%, y cuyas propiedades tecnológicas han sido valoradas satisfactoriamente tras su incorporación a productos cárnicos (Poyato et al., 2014; Poyato et al., 2015). Dicha matriz fue optimizada con el fin de sustituir a un ingrediente característico de los productos cárnicos: el tocino. Dicha sustitución permite de hecho mejorar una de los principales inconvenientes de estos productos desde el punto de vista nutricional y saludable: su perfil lipídico rico en ácidos grasos saturados y con una importante cantidad de colesterol. Además, el ingrediente no afecta a las propiedades tecnológicas ni de estabilidad ni sensorial del producto final.

#### II.1.2 Metodología

##### Diseño experimental:

La actividad se llevó a cabo en tres etapas:

- a) Desarrollo de un ingrediente funcional rico en omega-3 y óptimas propiedades tecnológicas y su aplicación a embutidos crudos curados tipo Chorizo de Pamplona.
- b) Desarrollo y aplicación en hamburguesas de un ingrediente de bajo valor energético y rico en PUFA-omega-3 de alto peso molecular.

c) Desarrollo y aplicación en hamburguesas de un ingrediente funcional de bajo valor energético y rico en PUFA-omega-3 de alto peso molecular y capacidad antioxidante elevada.

Los diseños de cada uno de los tres estudios, así como los materiales y métodos analíticos empleados se recogen en sendos trabajos (dos de ellos publicados y el tercero enviado para su publicación). En los siguientes apartados se resumen los principales resultados y conclusiones de los mismos.

### II.1.3 Resultados y Discusión

#### Utilización de aceite de lino en geles emulsionados optimizados como sustitutos de grasa en embutidos madurados (Alejandre et al., 2016)

Se prepararon geles emulsionados conteniendo 40% de aceite de lino, 1.5% de carragenato y 58.5% de agua. Una vez preparados los geles fueron incluidos como un ingrediente más en la elaboración de los embutidos, en concreto en la fase de mezclado-amasado. Se realizaron sustituciones del tocino (control 25% tocino) del orden de: 26,3%, 32,8% y 39,5%. Los productos resultantes presentaron porcentajes decrecientes en el contenido total de grasa, valor energético procedente de la grasa y valor energético total (tabla 1).

**Tabla 1: Composición general y valor energético de embutidos crudos curados reformulados.**

	Control	SUB 1 (26.3%)	SUB 2 (32.8%)	SUB 3 (39.5%)
Moisture (%)	29.29 (0.08)a	29.27 (0.36)a	30.86 (0.10)b	31.97 (0.11)c
Fat (%)	30.80 (0.32)c	28.92 (0.48)b	26.49 (0.18)b	25.20 (0.34)a
Protein (%)	22.07 (0.56)a	21.81 (0.12)a	22.47 (0.97)a	21.28 (0.04)a
Ash (%)	5.11 (0.46)a	6.12 (0.17)a	6.19 (0.18)a	5.88 (0.55)a
Carbohydrates (%)	12.73	13.88	13.99	15.67
Total energy value	1740 (14)c	1677 (18)bc	1601 (22)ab	1566 (12)a
Energy from fat (kJ/100)	1159 (12)c	1087 (18)b	997 (7)a	948 (11)a
Energy from fat (%)	67 (0.61)b	65 (0.31)ab	62 (0.67)a	61 (0.58)a
Fat reduction (%)	—	6	14	18
Energy value reduction	—	4	8	10

For each parameter, different small letters among percentages of substitution indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) based on post hoc Bonferroni test. Standard errors of the mean appear in parentheses.

El análisis de los parámetros relacionados con las potenciales declaraciones nutricionales que podían ostentar los productos desarrollados ofreció muy buenos resultados. Así, la declaración “alto en proteína” podría aplicarse a todos los productos (en este caso incluyendo el control), ya que en todos ellos el valor energético proporcionado por la proteína fue, al menos, el 20% del valor energético total del producto. En cuanto a los cambios en el perfil lipídico, hicieron que todos los productos modificados pudieran hacer gala de la declaración “fuente de omega-3” al aportar más de 0.3g de ácido alfa-linolénico por 100 g de producto y por 100 kcal. Además en el caso del producto correspondiente a la máxima sustitución, se podría utilizar también la declaración “alto contenido en omega-3” por contener más de 0.6g de ácido alfa-linolénico por 100 g y 100 kcal (en concreto 2,39 g ALA/100 g y 0,64g ALA/100 kcal).

El estudio incluyó medidas de índice de peróxidos y TBA, cuyos resultados pusieron de manifiesto la no existencia de problemas de oxidación en ninguno de los productos. Sin embargo, se observó un cierto incremento del hexanal, aunque no significativo, y un incremento del nonanal y de los aldehídos totales con el incremento del grado de sustitución del tocino por el gel emulsionado. Este incremento de los

aldehídos probablemente fue el responsable de ciertas notas extrañas detectadas en el análisis sensorial de los productos de máxima sustitución, que indicaron la no viabilidad sensorial de estos productos.

### **Hamburguesas bajas en grasa formuladas con sustitutos de grasa enriquecidos en ácidos grasos omega-3 (Alejandre et al., 2017)**

Este estudio se desarrolló en dos fases, una primera de optimización de la formulación del gel y de las condiciones de almacenamiento, y la segunda sobre su viabilidad en la aplicación para elaborar hamburguesas de bajo valor energético.

Se desarrolló una formulación de gel emulsionado que constituyese un ingrediente de bajo valor energético y a la vez fuese fuente significativa de ácidos grasos omega-3 de alto peso molecular (EPA y DHA). Además el ingrediente debía poseer características tecnológicas (dureza y sinéresis) aptas para ser utilizado como sustituto de grasa animal. Se optimizó la formulación teniendo en cuenta todas las variables citadas obteniendo finalmente un gel con 3% de carragenato y 1% de aceite de alga. El ingrediente resultante se caracterizó por valores del orden de 41,22N de dureza y 1,14% de sinéresis.

Una vez optimizado el gel se estudió su estabilidad, en un periodo de 31 días, en diferentes condiciones de almacenamiento: 4V (4°C y vacío), 25V (25°C y vacío), 4NV (4°C y no vacío) y 25NV (25°C y no vacío), confirmando que 4°C y vacío fueron las mejores condiciones para evitar la oxidación lipídica (tabla 2). El gel almacenado a 25°C y aire mostró a partir del séptimo día de almacenamiento pérdidas significativas de humedad (7,25% a los 31 días) y de dureza. También se observaron importantes cambios en parámetros instrumentales de medida de color a partir del día 7 en esas condiciones. Así mismo, el crecimiento de microorganismos mesófilos a 25°C fue mucho más importante, poniendo en evidencia la importancia de la temperatura durante el almacenamiento del gel.

**Tabla 2: TBARS (mg MDA/100 g gel) de emulsiones gelificadas, en diferentes condiciones (4 V, 4NV, 25 V y 25NV) y días (0, 7, 15 and 31) de almacenamiento.**

Conditions	Days of storage (Days)				SEM	P-value*		
	Day 0	Day 7	Day 15	Day 31		Condition	Day	C x Day
4V	0.33aA	0.54bC	0.53aC	0.49aB	0.01	0.000	0.000	0.000
4NV	0.33aA	0.57cC	0.60bC	0.52abB	0.02			
25V	0.33aA	0.52aB	0.58bB	0.54bBC	0.02			
25NV	0.33aA	0.53aB	0.70cC	0.81cD	0.03			

SEM: standard error of the mean. Small letters within the same time of analysis (same column) indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among storage conditions. Capital letters within the same condition (same row) indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among days of storage by post hoc Bonferroni test. V: vacuum; NV: not vacuum

\*Results from 2x2 factorial ANOVA.

Por último, se pasó a utilizar el ingrediente diseñado en la reformulación de hamburguesas de bajo valor energético en las que además se pretendía que contribuyesen a la ingesta de EPA y DHA en la dieta. El diseño experimental incluyó hamburguesas control de bajo valor energético (9% de grasa) y hamburguesas modificadas en las que se sustituyó totalmente la grasa por el ingrediente de bajo valor energético, proporcionando un producto con una cantidad total de grasa del orden del 2,6% (reducción del 70% respecto a las hamburguesas control) por lo que podrían calificarse como “bajas en grasa” (menos de 3 g/100g). Los análisis se realizaron tanto en muestras crudas como cocinadas.

El valor energético total se redujo en un 43% en las hamburguesas crudas y en un 37% en las cocinadas, por lo que se podrían aplicar declaraciones de “valor energético reducido” (reducción por encima del 30% respecto al producto de referencia).

En cuanto al perfil de ácidos grasos (tabla 3), se observó una reducción de AGS del 69%, por lo que se podría utilizar la declaración “grasa saturada reducida”. Obviamente, al reducirse de forma tan significativa el contenido en grasa total, también se redujeron las cantidades absolutas de PUFAs omega-6 y omega-3, estos últimos por la reducción de ácido alfa-linolénico. Sin embargo, se incrementaron las cantidades de EPA y DHA, disminuyendo la relación de omega-6/omega-3. Hay que recordar que una alta relación omega-6/omega-3 se correlaciona con la patogénesis de numerosos desórdenes como enfermedades cardiovasculares e incluso cáncer.

**Tabla 3: Perfil lipídico de las hamburguesas Control (C) y Modificadas (M) (mg / 100 g producto).**

	C Raw	C Cooked	M Raw	M Cooked	SEM	P-value
EPA	3.4 b	4.1 b	2.7 a	2.7 a	0.17	0.04
DHA	10.5 a	11.6 a	21.7 b	24.3 b	2.55	0.001
EPA+DHA	13.5 a	14.9 a	24.4 b	26.9 b	2.38	0.04
Omega-3	68.9 b	72.6 b	37.5 a	34.6 a	7.74	0.003
Omega-6	1108 b	1091 b	268 a	264 a	144	0.001
Omega-6/Omega-3	16.1 b	15.0 b	7.1 a	7.6 a	1.06	0.001
PUFA	1116 b	1239 b	357 a	303 a	147	0.001
SFA	3665 b	3530 b	1146 a	1102 a	477	0.001

SEM: standard error of the mean. Per each parameter, different letters in the same row indicate differences ( $P < 0.05$ ) based on post hoc Bonferroni test.

Por último, señalar que las hamburguesas modificadas presentaron puntuaciones en los test de aceptabilidad sensorial muy similar a las hamburguesas control bajas en grasa.

### **Aplicación de un extracto natural a un ingrediente bajo en grasa para incrementar la capacidad antioxidante de hamburguesas (Alejandre et al., enviada)**

El último trabajo desarrollado consistió en la adición de un extracto natural obtenido de ramas de *Prunus spinosa* L. al ingrediente de bajo valor energético elaborado con 1% de aceite de alga.

El extracto se obtuvo mediante extracción hidroalcohólica de los componentes con capacidad antioxidante presentes de forma significativa en dicha planta. La capacidad antioxidante del extracto se midió con técnicas espectrofotométricas (ABTS, DPPH y Compuestos Fenólicos totales). Además se pudieron identificar por HPLC algunos de los principales compuestos antioxidantes presentes (especialmente catequinas).

El extracto se incluyó en el gel emulsionado con el fin de aportarle una capacidad antioxidante que incrementase los potenciales beneficios del mismo. Una vez adicionado a las hamburguesas, se pudo observar que, además de los beneficios relacionados con la grasa, el valor energético y el perfil de ácidos grasos, las nuevas hamburguesas presentaban a su vez un incremento de su actividad antioxidante que se

pudo traducir en una menor intensidad de oxidación lipídica. Además, aunque no se ha podido probar en este trabajo, se podría esperar que la ingesta de estas hamburguesas conllevara la consiguiente ingesta de compuestos antioxidantes con los beneficios saludables subsiguientes.

### II.1.4 Conclusiones

1. Ingredientes funcionales elaborados con 40% de aceite de lino y 1,5% de carragenato pueden emplearse como sustitutos parciales de tocino en la formulación de embutidos crudos-curados, alcanzando un grado de sustitución máxima del 32,8% del tocino (para controles con 25% en la formulación y % de grasa total en torno al 30%).
2. Un gel emulsionado elaborado con 3% carragenato y 1 % de aceite de alga posee unas adecuadas propiedades tecnológicas para ser empleado como ingrediente funcional de bajo valor energético y enriquecido en omega-3. Sus condiciones óptimas de almacenamiento son bajas temperaturas (4°C) y vacío.
3. El ingrediente de bajo valor energético y enriquecido en omega-3 permite elaborar hamburguesas “bajas en grasa”, “valor energético reducido”, “grasa saturada reducida” y aceptables sensorialmente.
4. Es posible elaborar hamburguesas bajas en grasa y que aporten de forma simultánea compuestos bioactivos (ácidos grasos omega-3 y compuestos antioxidantes) que presenten a su vez buenas propiedades organolépticas.

### II.1.5 Financiación

La actividad desarrollada ha sido financiada a través de los siguientes proyectos de investigación:

1. Título del proyecto: Matrices alimentarias de origen vegetal con potencial actividad antioxidante sometidas a diferentes tecnologías: evaluación química y biológica

Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad- AGL2014-52636-P

Entidades participantes: Dpto. Ciencias de la Alimentación y Fisiología. Dpto Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Dpto. Biología Ambiental (Universidad de Navarra).

Duración, desde: Enero 2015                      Hasta: Diciembre 2017

Cuantía de la subvención: 145000€ / 3 años

Investigador responsable: M. Paz de Peña y Diana Ansorena

2. Título del proyecto: Desarrollo de un ingrediente funcional de bajo valor energético enriquecido en ácidos grasos omega-3 y antioxidantes naturales: aplicación a productos cárnicos

Entidad financiadora: Dpto. Industria-Gobierno de Navarra (PI032 OMEGA3)

Entidades participantes: Dpto. Ciencias de la Alimentación y Fisiología. Dpto Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Dpto. Biología Ambiental. (Universidad de Navarra).

Duración, desde: Enero 2016                      Hasta: Diciembre 2016

Cuantía de la subvención: 41969.63€

Investigador responsable: Diana Ansorena

3. Título del proyecto: Nueva gama de embutidos curados saludables con sabor tradicional

Entidad financiadora: Dpto. Industria-Gobierno de Navarra

Entidades participantes: Dpto. Ciencias de la Alimentación y Fisiología. Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Dpto. Biología Ambiental. (Universidad de Navarra)- Embutidos GOIKOA S.A.

Duración, desde: Septiembre 2017 HASTA: Diciembre 2019

Cuantía de la subvención: 67.898,66 €

Investigador responsable: Diana Ansorena

## II.2 Producción científica más relevante

### II.2.1 Artículos en revistas científicas

Barriuso, B., Ansorena, D., Calvo, M.I., Cavero, R.Y., & Astiasarán, I. 2015. Role of *Melissa officinalis* in cholesterol oxidation: antioxidant effect in model systems and application in beef patties. *Food Research International* 69, 133-140.

Barriuso, B., Ansorena, D., Poyato, C., Astiasarán, I. 2015. Cholesterol and stigmasterol within a sunflower oil matrix: Thermal degradation and oxysterols formation. *Steroids*, 99(B), 155-160.

Poyato, C., Astiasarán, I., Barriuso, B., & Ansorena, D. 2015. A new polyunsaturated gelled emulsion as replacer of pork back-fat in burger patties: Effect on lipid composition, oxidative stability and sensory acceptability. *LWT- Food Science and Technology*, 69(2), 1069-1075.

Ansorena, D., Poyato, C., Berasategi, I. García-Iñiguez de Ciriano, M., & Astiasarán, I. 2015. Desarrollo tecnológico de cárnicos más saludables. *Tecnifood*, Abril 2015, 36-39.

Barriuso, B., Mariutti, L.R.B., Ansorena, D., Astiasarán, I., & Bragagnolo, N. 2016. *Solanum sessiliflorum* (mana-cubiu) antioxidant protective effect towards cholesterol oxidation: influence of docosahexaenoic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(8), 1125-1131.

Alejandre, M., Poyato, C., Ansorena, D., & Astiasarán, I. 2016. Linseed oil gelled emulsion: a successful fat replacer in dry fermented sausages. *Meat Science*, 121, 107-113.

Alejandre, M., Passerini, D., Astiasarán, I., & Ansorena, D. 2017. The effect of low-fat beef patties formulated with a low-energy fat analogue enriched in long-chain polyunsaturated fatty acids on lipid oxidation and sensory attributes. *Meat Science*, 134, 7-13.

Alejandre M., Ansorena D., Poyato C., Berasategi I., García-Iñiguez de Ciriano M., Valencia I. & Astiasarán, I. 2017. Reformulación de derivados cárnicos con emulsiones de aceite de lino. *Eurocarne*, 256, 97-116.

Barriuso, B., Ansorena, D., & Astiasarán, I. 2017. Oxysterols formation: a review of a multifactorial process. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 169, 39-45.

Gayoso, L., Poyato, C., Calvo, MI, Cavero, RY, Ansorena, D., & Astiasarán, I. 2017. Volatiles formation in gelled emulsions enriched in polyunsaturated fatty acids during storage: type of oil and antioxidant. *Journal of Food Science and Technology*, 54(9), 2842-2845.

### II.2.2 Tesis Doctorales dirigidas

Título: Emulsions as delivery systems of unsaturated lipids: oxidative stability and applications - Emulsiones como vehículo de lípidos insaturados: estabilidad oxidativa y aplicaciones.

Doctorando: Dña. Candelaria Poyato Aledo

Directores: Iciar Astiasarán y Diana Ansorena

Facultad y Universidad: Facultad de Farmacia (Universidad de Navarra)

Año: 2015

Calificación: Sobresaliente *cum laude* (Doctorado Europeo)

## II.2.3 Libros/capítulos de libros

### Libros

Handbook of fermented meat and poultry. Second Edition. Editorial: Ed. Blackwell Publishing. Oxford, UK. EDS: Fidel Toldra (Editor), Y. H. Hui (Consulting Editor), Iciar Astiasaran (Associate Editor), Joseph Sebranek (Associate Editor), Regine Talon (Associate Editor). ISBN: 978-1-118-52269-1

### Capítulos de libros

Astiasarán, I &. Ansorena, D. 2015. Functional dry fermented sausages. En “Handbook of fermented meat and poultry”. Second Edition. Chapter 27. Pages: 241-250. Editorial: Ed. Blackwell Publishing. Oxford, UK. EDS: Fidel Toldra (Editor), Y. H. Hui (Consulting Editor), Iciar Astiasaran (Associate Editor), Joseph Sebranek (Associate Editor), Regine Talon (Associate Editor). ISBN: 978-1-118-52269-1

Ansorena, D., & Astiasarán, I. 2016. Fermented Foods: Composition and Health effects. En “Encyclopedia of Food and Health”. Chapter 285. Pages: 649-655. Editorial: Elsevier, Oxford. EDS: Caballero, B., Finglas, P., Toldrá, F. ISBN: 9780123849472

Astiasarán, I., Ansorena, D. 2016. Sausages and Comminuted Products: Dry Fermented Products. En “Encyclopedia of Food and Health”. Chapter 612. Pages: 728-733. Editorial: Elsevier, Oxford. EDS: Caballero, B., Finglas, P., Toldrá, F. ISBN: 9780123849472

## II.3 Congresos, Jornadas y Reuniones

### II.3.1 Ponencias invitadas

Ponente: Diana Ansorena

Ponencia: Is it possible to reformulate meat products to make them healthier?

Congreso / Jornada / Reunión: Jornada sobre investigación en carnes y productos cárnicos

Lugar y fecha: Gante (Bélgica), 27 Septiembre 2017.



## Capítulo III. Estrategias innovadoras en el control de calidad de productos cárnicos: aspectos sensoriales, nutricionales y de salud

S. Ventanas, L. Lorigo, M. Estévez, A. González-Mohino, T. Antequera, D. Caballero, T. Pérez-Palacios, D. Morcuende

*Tecnología y Calidad de Alimentos. Instituto Universitario de Investigación de Carne y Productos Cárnicos (IProCar). Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. 10003-Cáceres.*

### III.1 Desarrollos en investigación

#### III.1.1 Introducción

##### III.1.1.1 Nuevas técnicas de evaluación sensorial.

Los integrantes de esta línea de investigación han desarrollado diversas técnicas sensoriales innovadoras en el campo de la evaluación de la calidad sensorial de la carne y productos cárnicos. En este sentido, se ha avanzado en estos tres años en la aplicación de técnicas sensoriales dinámicas, como el Tiempo-intensidad (TI) que permite evaluar la modificación temporal de la intensidad de la percepción de diversos atributos sensoriales. Además, se ha implementado por primera vez la técnica sensorial “Sensación temporal dominante” (TDS). Además, se han aplicado dos técnicas sensoriales descriptivas rápidas y se han evaluado sus ventajas e inconvenientes como métodos de caracterización sensorial de productos cárnicos, en concreto el “Flash Profile” y el “Napping”. Finalmente, y de gran interés actual, hay que destacar la investigación centrada en la generación de perfiles emocionales asociados al consumo de alimentos así como el desarrollo de la metodología para la cuantificación de dichas emociones. En este sentido, se han generado los perfiles emocionales asociados al consumo de jamón ibérico y Serrano y actualmente se está trabajando en los perfiles emocionales generados por consumidores con necesidades específicas, en concreto con enfermos de cáncer tanto en productos cárnicos como en otros alimentos.

##### III.1.1.2 Caracterización de productos cárnicos mediante análisis de Imágenes de Resonancia Magnética (MRI)

El grupo de investigación TECAL viene estudiando la técnica de imagen de resonancia magnética (MRI) desde hace unos años como método no destructivo para el análisis de productos cárnicos, y más concretamente para el jamón y lomo Ibéricos. El procedimiento general de estos estudios se basa en tres bloques: adquisición de imágenes, análisis de imágenes y análisis de datos (Pérez-Palacios y cols., 2015). La mayoría de estudios realizados hasta ahora en productos cárnicos se han desarrollado utilizando i) escáneres de alto campo magnético (producen imágenes de una calidad muy alta, pero son caros y sus gastos de mantenimiento son

muy altos) para la adquisición de las imágenes, ii) algoritmos clásicos de texturas para analizar y extraer información computacional de las imágenes MRI, y iii) herramientas estadísticas tradicionales, como el coeficiente de correlación de Pearson y el análisis de componentes principales, para analizar los valores numéricos obtenidos del análisis de imágenes.

### **III.1.1.3 Oxidación de proteínas en alimentos y su impacto sobre la salud**

La influencia de los alimentos sobre la nutrición humana y sobre el estado de salud/enfermedad es un tema que preocupa enormemente a los consumidores. La carne procesada se ha identificado por la OMS como carcinogénica (Grupo 1) y su consumo asociado al cancer colorrectal (CCR) si bien los componentes de la carne potencialmente tóxicos, así como los mecanismos moleculares implicados se reconocen por la OMS como desconocidos. Se sabe bien, sin embargo, el papel que el estrés oxidativo in vivo tiene sobre diversos procesos patológicos como el CCR, enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento celular. Estudios recientes demuestran que la ingesta de lípidos oxidados promueve el estrés oxidativo in vivo, lo que provoca a su vez, alteraciones de los procesos fisiológicos. Las proteínas de los alimentos son también objetivo de los radicales libres, pero muchas de las reacciones bioquímicas implicadas, así como de las consecuencias de las mismas para el alimento y el consumidor se desconocen actualmente. Los productos procedentes de la oxidación de lípidos y proteínas se acumulan en el alimento durante su procesado, el almacenamiento posterior e incluso tras la ingesta del mismo: durante las tres fases de la digestión. De este modo, el tracto gastrointestinal y los órganos internos están expuestos al potencial efecto tóxico y mutagénico de estas especies. Actualmente, se desconoce por completo el desarrollo de reacciones de oxidación proteica durante las fases de la digestión y las consecuencias de dichas reacciones sobre procesos patológicos concretos. Sin embargo, estudios metabolómicos recientes ha identificado a varios productos de la oxidación proteica (ditirosinas y kinureninas) como clave en el estrés oxidativo luminal que tiene lugar durante la digestión de la carne roja, lo que sitúa a estos compuestos de forma plausible como potenciales agentes tóxicos y mutagénicos. Estos últimos años han sido testigos de un creciente interés en el uso de compuestos fenólicos en la dieta debido a su origen natural y a los diversos efectos biológicos que se les atribuyen. Los procesos bioquímicos que gobiernan los mecanismos de interacción entre estos fitoquímicos y las proteínas (de alimentos y de nuestros propios tejidos) son complejos y requieren un estudio pormenorizado. En este sentido, la flora intestinal también concentra mucho interés debido a los efectos beneficiosos que se le atribuye aun cuando se conoce poco sobre su influencia en el estrés oxidativo luminal y la posible protección frente a enfermedades intestinales. Es necesario dilucidar las interacciones a nivel molecular entre componentes de la dieta (incluyendo proteínas oxidadas) y la microbiota.

### **III.1.1.4 Antioxidantes naturales: caracterización y empleo en carne y productos cárnicos**

Los efectos negativos que tanto la oxidación lípidica como proteica tienen sobre la calidad y seguridad de los alimentos, obliga a los científicos y tecnólogos de alimentos a buscar fuentes de antioxidantes para evitar o minimizar la aparición de estas reacciones. La oxidación tiene lugar tanto en el animal vivo (con consecuencias para la calidad de la carne que se obtiene) como durante el procesado y almacenamiento de los alimentos. Es por ello que se hace imprescindible actuar tanto a nivel de la granja (estrategias antioxidantes ante-mortem) como directamente en el alimento (estrategias antioxidantes tecnológicas). Las primeras incluyen la utilización de aditivos

de carácter antioxidante como tocoferoles, carotenoides, aminoácidos azufrados, selenio...que una vez asimilados por el animal, actúan a nivel celular, inhibiendo las acciones de oxidación iniciadas por radicales libres. Las segundas incluyen una enorme variedad de opciones de envasado y de aplicación de aditivos alimentarios con efecto antioxidante que buscan reducir el impacto de las reacciones de oxidación directamente en el alimento. Tanto en unas estrategias como en otras, existe un creciente interés en el uso de antioxidantes de origen vegetal (habitualmente conocidos como antioxidantes naturales). El interés en estos compuestos se debe a su supuesta seguridad (dada su presencia de forma natural en plantas, frutas etc.), a su efectividad en sus muy diversas actividades biológicas (antioxidantes, antimicrobiana, antiinflamatoria, antiproliferativa...) y al hecho de que, en función de su origen, se favorece la economía circular, el uso de subproductos de la industria agrícola y por lo tanto, se llevan a cabo acciones que reduce la formación de residuos potencialmente tóxicos y de su re-utilización en el campo de la agroalimentación y de la tecnología alimentaria.

### **III.1.1.5 Microencapsulación de aceite de pescado**

Uno de los aspectos más comprometidos en la casi totalidad de los productos cárnicos es su perfil lipídico. Por ello se está investigando sobre la posibilidad de modificar su composición nutricional. Una de las estrategias es la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega-3 ( $\omega$ -3), y más específicamente de los ácidos grasos eicosapentaenoico (C20:5 n-3, EPA) y docosahexaenoico (C22:6 n-3, DHA), que son compuestos bioactivos con propiedades beneficiosas para la salud humana. El problema de la incorporación de estos AGPI  $\omega$ -3 es su alta susceptibilidad a la oxidación. Así mismo, la principal fuente de EPA y DHA es el aceite de pescado, cuya cantidad a añadir se ve limitada por el rechazo que causa en los consumidores la detección de aromas a pescado o a rancio en los alimentos enriquecidos. Una estrategia que se puede utilizar para resolver estos inconvenientes es la microencapsulación. Ante este planteamiento, hemos desarrollado microcápsulas de aceite de pescado a partir de diferentes tipos de emulsiones (simples, dobles y multicapa) mediante spray-drying. La caracterización y comparación de estos tres tipos de emulsiones y sus correspondientes microcápsulas parecen indicar que las microcápsulas procedentes de emulsiones multicapa son las más adecuadas para obtener una fuente estable de EPA y DHA (Jiménez-Martín y cols., 2014, 2015, 2016a). En estos trabajos no se llevó a cabo la homogeneización a alta presión de las emulsiones empleadas para elaborar las microcápsulas. Sin embargo, la homogeneización a alta presión parece ser una buena estrategia para mejorar la estabilidad de las emulsiones y la eficiencia de la microencapsulación (Mc Clements, 2009). Por otro lado, la información científica disponible sobre la aplicación de microcápsulas con fines de enriquecimiento en AGPI  $\omega$ -3 es escasa, con pocos referentes en la literatura científica de productos cárnicos.

### **III.1.2 Metodología**

#### **III.1.2.1 Nuevas técnicas de evaluación sensorial**

-Evaluar el efecto del contenido en grasa intramuscular, el contenido en sal y la aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH) en las características sensoriales de jamones curados Ibéricos y Serranos evaluados mediante técnicas descriptivas clásicas AQD® y descriptivas dinámicas, Tiempo-Intensidad (TI).

- Evaluar el efecto del sistema de alimentación y del contenido en sal sobre las características sensoriales de jamones ibéricos evaluados mediante técnicas descriptivas dinámicas: Tiempo Intensidad y “Sensación Temporal Dominante” (TDS).
- Evaluar el efecto de la sustitución de sal en lomos curados Ibéricos evaluados mediante técnicas descriptivas dinámicas (TI y TDS) y técnicas descriptivas rápidas (Perfil Flash).
- Emplear técnicas descriptivas rápidas, Napping, para describir diferencias sensoriales entre lomos de cerdo horneados a diferentes temperaturas y tiempos de cocinado.
- Desarrollo del perfil emocional en jamones curados, Ibéricos y Serranos.

### **III.1.2.2 Caracterización de productos cárnicos mediante análisis de Imágenes de Resonancia Magnética (MRI)**

- Evaluar el efecto de diferentes secuencias de adquisición de imágenes en un escáner MRI de bajo campo sobre las características de las imágenes de lomos ibéricos.
- Desarrollar nuevos algoritmos basados en fractales para analizar imágenes MRI de lomos ibéricos.
- Explorar diferentes técnicas de minería de datos que permitan estudiar la relación entre las características computacionales (extraídas de las imágenes MRI mediante los algoritmos) y los parámetros de calidad obtenidos a través de análisis físico-químicos y sensoriales.
- Obtener ecuaciones de predicción que permitan determinar parámetros de calidad de lomos de forma no destructiva, rápida, precisa y fiable.

### **III.1.2.3 Oxidación de proteínas en alimentos y su impacto sobre la salud**

- Dilucidar las reacciones y mecanismos bioquímicos implicados en la oxidación de proteínas humanas y de los alimentos.
- Conocer la naturaleza de las reacciones que tienen lugar durante el procesado y almacenamiento de los alimentos y dilucidar en qué medida las condiciones del procesado o los ingredientes/aditivos utilizados (nitritos, azúcares simples, sal...) pueden influir sobre la formación de compuestos potencialmente tóxicos
- Conocer el impacto de la ingesta de lípidos y proteínas oxidadas sobre la digestibilidad y el valor nutritivo de los alimentos
- Establecer la conexión entre la ingesta de alimentos oxidados y procesos patológicos concretos y entender los mecanismos moleculares implicados (con especial interés sobre productos de oxidación proteica y su papel sobre procesos inflamatorios y neoplasias intestinales)
- Desarrollar estrategias antioxidantes basadas en el uso en la dieta de fitoquímicos y probióticos con el objetivo de inhibir los riesgos para la salud asociados al estrés oxidativo.

### **III.1.2.4 Antioxidantes naturales: caracterización y empleo en carne y productos cárnicos**

- Buscar y caracterizar antioxidantes de fuentes vegetales diversas; Estudio de técnicas de extracción eficientes y seguras
- Aplicabilidad en diversos alimentos y efectividad frente a la oxidación de lípidos y proteínas. Influencia sobre parámetros sensoriales y aceptabilidad por parte del consumidor.
- Estudio de los mecanismos de interacción entre los compuestos bioactivos y los componentes de los alimentos para asegurar el efecto consistente y positivo de los antioxidantes desarrollados en las condiciones de elaboración, procesado, almacenamiento y consumo del alimento.

### **III.1.2.5 Microencapsulación de aceite de pescado**

- Optimizar el proceso de homogeneización de emulsiones de aceite de pescado para elaborar microcápsulas mediante spray-drying.

- Evaluar el efecto del enriquecimiento con microcápsulas de aceite pescado sobre las características de calidad de productos cárnicos.

### III.1.3 Resultados, Discusión y Conclusiones

#### III.1.3.1 Nuevas técnicas de evaluación sensorial

-Una reducción en el contenido en sal del 5.5 al 3.5% en el producto final no parece modificar la percepción dinámica sensorial (TI) del sabor salado en jamones Ibéricos con niveles de grasa intramuscular (GIM) entre el 8 y el 16%.

-Se ha aplicado por primera vez la técnica dinámica Sensaciones Temporales Dominantes (TDS) en la evaluación sensorial de jamón curado Ibérico. Ambas técnicas dinámicas, TI y TDS, aportan información coherente y complementaria, aunque el TDS implica un menor consumo de tiempo y muestra lo que significa una ventaja importante particularmente para la industria.

-Los atributos sensoriales generados mediante la técnica descriptiva rápida Flash Prolife (FP) ha permitido discriminar de forma satisfactoria lomos curados con diferentes niveles de sustitución de NaCl. FP se ha revelado como una interesante técnica para la obtención de un mapa sensorial de una forma rápida y efectiva.

-La técnica descriptiva rápida, Napping, se ha aplicado con éxito en la diferenciación de lomos de cerdo horneado en diferentes condiciones de temperatura y tiempo. Los atributos relacionados con la textura del producto fueron los más citados para diferenciar entre productos.

-Las emociones evocadas durante el consumo de jamón curado pueden agruparse en tres dimensiones asociadas: (1) al contexto habitual de consumo, (2) a las expectativas creadas antes del consumo y (3) a las percepciones generadas durante y tras el consumo del mismo. La aplicación por primera vez de la técnica dinámica TDS asociada a las emociones (TDE) ha permitido diferenciar desde una perspectiva emocional entre jamón ibérico vs. serrano/curado.

-Se está actualmente evaluando el estudio de las emociones asociadas al consumo de alimentos evaluando condicionantes como el escenario o contexto de consumo y centrándonos en poblaciones diana: pacientes con cáncer.

#### III.1.3.2 Caracterización de productos cárnicos mediante análisis de Imágenes de Resonancia Magnética (MRI)

La principal conclusión que se ha obtenido en esta línea de trabajo ha sido la siguiente: La propuesta de una metodología basada en el empleo de SE como secuencia de adquisición de MRI, GLCM o OPFTA como algoritmos de análisis de imágenes y MLR como técnica de minería de datos, para determinar características físico-químicas y atributos sensoriales de lomos Ibéricos de forma no destructiva con un alto grado de fiabilidad.

#### III.1.3.3 Oxidación de proteínas en alimentos y su impacto sobre la salud

-El estrés oxidativo tiene lugar a todos los niveles desde la granja hasta la mesa. Las aves de engorde (broilers) así como otros animales seleccionados para un crecimiento rápido son particularmente susceptibles al estrés oxidativo y se requiere la incorporación de elementos físico (control T<sup>a</sup>) o químicos (complementos dietéticos) para minimizar el efecto negativo que las reacciones de oxidación tienen sobre parámetros productivos y de calidad y seguridad de los alimentos que se obtienen.

-Las proteínas tanto humanas (plasma sanguíneo) como de alimentos (particularmente origen animal) son sumamente sensibles a la oxidación a través de mecanismos mediados por radicales libres como por azúcares simples con capacidad reductora (por ejemplo, glucosa). Los cambios que se inducen son variados, pero incluyen la formación de carbonilos, la formación de enlaces cruzados anómalos, la pérdida de triptófano y la de aminoácidos azufrados. La funcionalidad de estas proteínas también se ve

afectadas como consecuencia del daño oxidativo. Determinados compuestos fenólicos (catequinas del té) son capaces de inhibir cambios oxidativos en proteínas plasmáticas humanas en condiciones que simulan una hiperglucemia.

-El procesado de los alimentos (particularmente la congelación, el secado/deshidratación y salazonado) aumenta considerablemente los niveles de oxidación lipídica y proteica en el alimento. En algunos de los estudios llevados a cabo, se explica con precisión los mecanismos a través de los cuales determinados procesos tecnológicos y determinados aditivos alimentarios afectan a estas reacciones de oxidación.

-Los estudios llevados a cabo recientemente ponen de manifiesto que la ingesta de especies procedentes de la oxidación proteica (ácido aminoadípico, kinureninas y ditirosinas) y que se han demostrado presente en diversos alimentos, tienen influencia sobre la degeneración de tejidos internos en ratas de experimentación. En parte, los mecanismos fisiopatológicos implicados se han podido dilucidar.

### **III.1.3.4 Antioxidantes naturales: caracterización y empleo en carne y productos cárnicos**

-La dehesa extremeña es una fuente enorme de antioxidantes naturales que pueden ser utilizados tanto en la alimentación animal como en la elaboración de productos cárnicos de diversas especies como el cerdo, la ternera o el cordero.

-Concretamente frutas como *Crataegus* spp, *Rosa* spp. y diferentes variedades de bellota, poseen una gran variedad de compuestos bioactivos que tienen efectos antioxidantes y antimicrobianos claros sobre la carne. Esto permite mejorar la calidad de la misma y ampliar su vida útil durante un tiempo más prolongado. Esto es particularmente interesante en productos cárnicos listos para el consumo donde la acumulación de productos de oxidación es muy marcada debida al largo e intenso procesado.

-La alimentación de cerdos con subproductos del aguacate, mejora la calidad y estabilidad de los lípidos de la carne de cerdo y también protege a las proteínas y los pigmentos de la carne frente al estrés oxidativo. Estos efectos se han observado tanto en carne fresca como en carne sometida a procesos de cocinado.

-Otros elementos testados como las catequinas del té, los extractos fenólicos de la manzana o la salvia o el laurel, han tenido resultados prometedores.

### **III.1.3.5 Microencapsulación de aceite de pescado**

- Las emulsiones homogeneizadas a una presión de 1500Ba son más estables que las emulsiones sin homogeneizar u homogeneizadas a una presión de 700 Ba.

- La aplicación de altas presiones de homogeneización a emulsiones multicapa de aceite de pescado permite obtener microcápsulas con mejores características que cuando las emulsiones no fueron homogeneizadas.

- La microencapsulación de emulsiones multicapa-homogeneizadas de aceite de pescado es una estrategia útil y viable para enriquecer productos cárnicos en ácidos grasos  $\omega$ -3.

- La adición de microcápsulas de aceite de pescado, como fuente de EPA y DHA, permite la producción de nuggets de pollo y hamburguesas de cerdo con mayor protección de los AGPI  $\omega$ -3 y menor oxidación lipídica que cuando se adiciona directamente aceite de pescado a estos productos.

- Las características sensoriales y la aceptabilidad de los nuggets de pollo y hamburguesas de cerdo enriquecidos con AGPI  $\omega$ -3 no se modifican mediante la adición de microcápsulas de aceite de pescado.

### III.1.4 Financiación

#### - PROYECTOS:

Avance en el estudio de la microencapsulación de ácidos grasos omega-3 para enriquecer productos cárnicos.

IP: M<sup>a</sup> Trinidad Pérez Palacios. Duración: enero 2017-diciembre2019

*PROYECTOS I+D+I PARA JÓVENES INVESTIGADORES SIN VINCULACIÓN O CON VINCULACIÓN TEMPORAL PROGRAMA ESTATAL DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN ORIENTADA A LOS RETOS DE LA SOCIEDAD*

LA DEHESA EXTREMEÑA COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES NATURALES: NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA MEJORA DE LA VIDA COMERCIAL DE LA CARNE Y PREPARADOS CÁRNICOS (IB13132)

Investigador principal: David Morcuende Sánchez

Entidad financiadora: Gobierno de Extremadura (Decreto 121/2013 de ayudas destinadas a la realización de proyectos de investigación en los Centros Públicos de I+D+i de la Comunidad Autónoma de Extremadura). Duración: 31/07/2014 – 30/07/2016. Financiación recibida (en euros): 44110

“RESEARCH JOINT COLLABORATION ON LIPID AND PROTEIN OXIDATION IN MEAT AND MEAT PRODUCTS” Special Visiting Researcher - PVE (acronym of -Pesquisador Visitante Especial in portuguese)

Entidad financiadora: National Council for Scientific and Technological; Development of the Ministry of Science, Technology and Innovation (CNPq/MCTI; Brazil), nº 314656/2014-6

Duración: 01/01/2015 – 31/12/2017. Financiación recibida (en euros): 125255 euros

Investigador principal: Marta Suely Madruga (Paraiba University, Brazil) & Mario Estévez (Unex)

Optimización y control de la calidad tecnológica, nutricional y organoléptica del jamón serrano e ibérico” (CLASHAM-RTA-2010- 00029-C04-03) financiado por INIA (Instituto de Investigaciones Agrarias y Alimentarias).

“Programa FEDER-Innterconecta: Proyecto Innterbiocured (referencias116/13, 117/13 y 118/13)” finaciado por “Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI)”. Labpole (Large Animal Biopole). Financiado por FEDER, colabora MINECO.

Estudio de las emociones asociadas al consumo de alimentos en pacientes con necesidades específicas: bajo tratamiento de quimioterapia (IB16043) financiado por “Consejería de Economía e Infraestructuras” (Ayudas destinadas a la realización de proyectos de investigación en los Centros Públicos de I+D+i de la Comunidad Autónoma de Extremadura), Junta de Extremadura. Fondo Europeo de Desarrollo Regional, “Una manera de hacer Europa”.

#### - CONTRATOS CON EMPRESAS:

Optimización de las condiciones de cocinado de alimentos confitados mediante el control de tiempo-temperatura a través de un sistema de inducción de temperatura controlada

IP: M<sup>a</sup> Teresa Antequera Rojas. Duración: 1 enero 2015 - 31diciembre 2015

EMPRESA: BSH Electrodomésticos España

Desarrollo de modelos para monitorizar mediante nirs las condiciones de cocinado de carnes, pescados y vegetales.

IP: M<sup>a</sup> Teresa Antequera Rojas. Duración: 1 enero 2016 – 31 diciembre 2016

EMPRESA: BSH Electrodomésticos España

Viabilidad del uso de un prototipo de espectroscopía infraroja para determinar el punto óptimo de cocinado sous vide en carne y pescado

IP: M<sup>a</sup> Trinidad Pérez Palacios. Duración: 24 abril 2017- 23 abril 2018

EMPRESA: BSH Electrodomésticos España

Enriquecimiento en ácidos grasos w-3 y licopeno de patés y cremas

IP: M<sup>a</sup> Teresa Antequera Rojas. Duración: 1 junio 2016 - 31 mayo 2018

EMPRESA: IBERITOS

Supplementation with Mg as an innovative dietary means for increasing the oxidative stability of broiler tissues (UEx 096/16)

IP: Mario Estévez García

Entidad financiadora: TIMAB industries (France)

Duración: 10/2016-01/2017

Financiación recibida (en euros): 41.768

Estado del proyecto o contrato: concedido y ejecutado

- SUBVENCIONES:

“Instalación Piloto para desarrollar la certificación de jamó curado y otros productos cárnicos destinados a la exportación” IP: Jesús Ventanas Barroso

Entidad financiadora: FEDER-MICINN (ref: UNEX10-1E-402)

Cuantía de la subvención: 670.568,94€

## III.2 Producción científica más relevante

### III.2.1 Artículos revistas científicas

Non-destructive analysis of sensory traits of dry-cured loins by MRI-computer vision techniques and data mining. Daniel Caballero; Teresa Antequera; Andres Caro; Mar Ávila; Pablo G Rodríguez; Trinidad Pérez-Palacios. Journal of the Science of Food and Agricultural. 10.1002/jsfa.8132 AÑO: 2017

Optimization of MRI Acquisition and Texture Analysis to Predict Physico-chemical Parameters of Loins by Data Mining. Trinidad Pérez-Palacios; Daniel Caballero; Teresa Antequera; Maria Luisa Durán; Mar Ávila; Andres Caro. Food and Bioprocess Technology. 10.1007/s11947-016-1 AÑO: 2017

New Fractal Features and Data Mining to Determine Food Quality Based on MRI. D. Caballero, A. Caro, M. M. Ávila, P. G. Rodríguez, T. Antequera and T. Pérez IEEE LATIN AMERICA TRANSACTIONS. 15, 1777-1784 AÑO: 2017

Effect of Cooking Conditions on Quality Characteristics of Confit Cod: Prediction by MRI. Trinidad Pérez Palacios, Daniel Caballero, Sara Bravo, Jorge Mir Bel, Teresa Antequera International Journal of Food Engineering. DOI: 20160311 AÑO: 2017

Taste compounds and consumer acceptance of chicken soups as affected by cooking conditions. Trinidad Pérez-Palacios, Joana Eusebio, Silvina Ferro Palma, Maria João Carvalho, Jorge Mir-Bel, Teresa Antequera. International Journal of Food Properties. DOI: 10.1080/10942912.2017.1291678 AÑO: 2017

Data Mining on MRI Computational Texture Features to Predict Sensory Characteristics in Ham. Daniel Caballero; Teresa Antequera; Andres Caro; MLuisa Duran; Trinidad Pérez-Palacios. Food Bioprocess Technol. 9, 699 – 708 AÑO: 2016

- Enrichment of chicken nuggets with microencapsulated omega-3 fish oil: Effect of frozen storage on oxidative stability and sensory quality. Esterfanía Jiménez-Martín; Trinidad Pérez-Palacios; Jorge Ruiz; Teresa Antequera. *Food Bioprocess Technol.* 9, 285 - 297. AÑO: 2016
- Modeling salt diffusion in Iberian ham by applying MRI and data mining. Daniel Caballero; Andres Caro; Pablo G Rodríguez; MLuisa Duran; Mar Ávila; Ramón Palacios; Teresa Antequera; Trinidad Pérez-Palacios *Journal of Food Engineering.* 189, 115 - 122. AÑO: 2016
- Fatty acid composition in double and multilayered microcapsules of Omega-3 as affected by storage conditions and type of emulsions. Esterfanía Jiménez-Martín; Teresa Antequera; Adem Gharsallaoui; Jorge Ruiz; Trinidad Pérez-Palacios. *Food Chem.* 194, 476-486. AÑO: 2016
- Volatile compound profile of sous-vide cooked lamb loins at different temperature-time combinations. Mar Roldán; Teresa Antequera; José Sánchez del Pulgar; Trinidad Pérez-Palacios; Jorge Ruiz. *Meat Science.* 100, 52 – 57 AÑO: 2015
- A Rapid and Accurate Extraction Procedure for Analysing Free Amino Acids in Meat Samples by GC-MS. Trinidad Pérez-Palacios; Miguel Angel Barroso; Jorge Ruiz; Teresa Antequera. *International Journal of Analytical Chemistry.* Article ID 209214, 1-8. AÑO: 2015
- Including 3D-textures in a Computer Vision System to Analyze Quality Traits of Loin. Mar Ávila; Daniel Caballero; Maria Luisa Durán; Andrés Caro; Trinidad Perez-Palacios; Teresa Antequera. *LNCS.* 9163, pp. 456 – 465 AÑO: 2015
- Suitability of Using Monolayered and Multilayered Emulsions for Microencapsulation of  $\omega$ -3 Fatty Acids by Spray Drying: Effect of Storage at Different Temperatures. Esterfanía Jiménez-Martín; Adam Gharsallaoui; Trinidad Pérez-Palacios; Jorge Ruiz; Teresa Antequera. *Food Bioprocess Technol.* 8, pp. 100 – 111 AÑO: 2015
- Volatile compounds and physicochemical characteristics during storage of microcapsules from different fish oil emulsions. Esterfanía Jiménez-Martín; Adam Gharsallaoui; Trinidad Pérez-Palacios; Jorge Ruiz; Teresa Antequera. *Food Bioproducts Processing.* 96, 52 - 64. AÑO: 2015
- Salt and intramuscular fat modulate dynamic perception of flavour and texture in dry-cured hams. L. Lorigo, Estévez M., Ventanas, J., Ventanas, S. *Meat Science Volumen: 107*, Primera página: 39-48 Año: 2015
- Protein oxidation in processed meat: Mechanisms and potential implications on human health. Soladoye, O.P., Juárez, M.L., Aalhus, J.L., Shand, P., Estévez, M. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Volumen: 14*, Primera página: 106-122 Año: 2015
- Oxidative damage to poultry: From farm to fork. Estévez, M. *Poultry Science Volumen: 94*, Primera página: 1368-1378 Año: 2015
- Influence of the oxidation states of 4-methylcatechol and catechin on the oxidative stability of  $\beta$ -lactoglobulin. Jongberg, S., Utrera, M., Morcuende, D., Lund, M., Skibsted, L.H., Estévez, M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry Volumen: 63*, Primera página: 8501-8509 Año: 2015
- Role of phenolics extracting from *Rosa canina* l. on meat protein oxidation during frozen storage and beef patties processing. Utrera, M., Morcuende, D., Ganhão, R., Estévez, M. *Food and Bioprocess Technology Volumen: 8*, Primera página: 854-864 Año: 2015
- Comparative study between Serrano and Iberian dry-cured hams in relation to the application of high hydrostatic pressure and temporal sensory perceptions. Lorigo, L., Estévez, M., Ventanas, J., Ventanas, S.

LWT-Food Science & Technology Volumen: 64, Primera página: 1234-1242 Año: 2015

Effect of protein oxidation on the impaired quality of dry-cured loins produced from frozen pork meat. Lorigo, L., Ventanas, S., Akcan, T., Estévez, M. Food Chemistry Volumen: 196, Primera página: 1310-1314 Año: 2016

Underlying chemical mechanisms of the contradictory effects of NaCl reduction on the redox-state of meat proteins in fermented sausages. Lobo, F., Ventanas, S., Morcuende, D., Estévez, M. LWT-Food Science & Technology Volumen: 69, Primera página: 110-116 Año: 2016

Redox chemistry of the molecular interactions between tea catechins and human serum proteins under simulated hyperglycemic conditions. Özyurt, H., Luna, C., Estévez, M. Food & Function Volumen: 7 Primera página: 1390-1400 Año: 2016

Avocado waste for finishing pigs: impact on muscle composition and oxidative stability during chilled storage. Hernández-López, S., Rodríguez-Carpena, J.G., Lemus-Flores, C., Grageola-Nuñez, F., Estévez, M. Meat Science Volumen: 116 Primera página: 186-192 Año: 2016

The application of natural antioxidants via brine injection protects iberian cooked hams against lipid and protein oxidation. Armenteros, M., Morcuende, D., Ventanas, S., Estévez, M. Meat Science Volumen: 116 Primera página: 253-259 Año: 2016

Apple phenolics as inhibitors of the carbonylation pathway during in vitro metal-catalyzed oxidation of myofibrillar proteins. Rysman, T., Utrera, M., Morcuende, D., Van Royen, G., Van Weyenberg, S., De Smet, S., Estévez, M. Food Chemistry Volumen: 211, Primera página: 784-790 Año: 2016

Reporting the sensory properties of dry-cured ham using a new language: Time intensity (TI) and temporal dominance of sensations (TDS). Lorigo, L., Hort, J., Estévez, M., Ventanas, S. Meat Science Volumen: 121, Primera página: 166-174 Año: 2016

Antioxidant protection of proteins and lipids in processed pork loin chops through feed supplementation with avocado. Hernández-López, S., Rodríguez-Carpena, J.G., Lemus-Flores, C., Galindo-García, J., Estévez, M. Journal of Food Science and Technology (Mysore) Volumen: 53 Primera página: 2788-2796 Año: 2016

Effect of pre-cooking methods on the chemical and sensory deterioration of ready-to-eat chicken patties during chilled storage and microwave reheating. Ferreira, V., Morcuende, D., Madruga, M., Hernández-López, S., Silva, F., Ventanas, S., Estévez, M. Journal of Food Science and Technology (Mysore) Volumen: 53 Primera página: 2760-2769 Año: 2016

Effect of the cooking method (grilling, roasting, frying and sousvide) on the oxidation of thiols, tryptophan, alkaline amino acids and protein cross-linking in jerky chicken. Silva, F., Ferreira, V., Madruga, M., Estévez, M. Journal of Food Science and Technology (Mysore) Volumen: 53 Primera página: 3137-3146 Año: 2016

Underlying connections between the redox system imbalance, protein oxidation and impaired quality traits in pale, soft and exudative (PSE) poultry meat. Carvalho, R., Ida, E., Madruga, M., Martínez, S., Shimokomaki, M., Estévez, M. Food Chemistry Volumen: 215, Primera página: 129-137 Año: 2017

Antioxidant protection of cooked meatballs during frozen storage by whey protein edible films with phytochemicals from *Laurus nobilis* L. and *Salvia officinalis*. Akcan, T., Estévez, M., Serdaroglu, M. LWT-Food Science & Technology Volumen: 77 Primera página: 323-331 Año: 2017

Characterization of preserved meat from spent hen and broiler by salting and forced-air drying. Silva, F.A.P., Estévez, M.; Ferreira, V.C.S., Silva, S.A., Lemos, L.T.M., Ida, E.I., Shimokomaki, M., Madruga, M. S. *Journal of Food Processing and Preservation* Volumen: 41 Primera página: 13048 Año: 2017

Aroma profile and consumer liking of salted and dried chicken meat: Effects of desalting and cooking methods. Silva, F.A.P., Ferreira, V.C.S., Madruga, M. S., Estévez, M. *International Journal of Food Properties* Volumen: Primera página: Año: En prensa

Dietary protein oxidation: a silent threat to human health? Luna, C. Estévez, M. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* Volumen: 57, Primera página: 3781, Año: 2017

Antioxidant extracts from acorns (*Quercus ilex* L.) effectively protect ready-to-eat (RTE) chicken patties irrespective of packaging atmosphere. Ferreira, V.C.S., Morcuende, D., Hernández-López, S.H., Madruga, M. S., Silva, F.A.P., Estévez, M. *Journal of Food Science* Volumen: 82, Primera página: 622 Año: 2017

Influence of cooking methods and storage time on lipid and protein oxidation and heterocyclic aromatic amines production in bacon. Soladoye, O.P., Shand, P., Dugan, M.E.R., (...), Estévez, M., Juárez, M. *Food Research International* Volumen: 99 Primera página: 660-669 Año: 2017

Acorn (*Quercus* spp.) as a novel source of oleic acid and tocopherols for livestock and humans: discrimination of selected species from Mediterranean forest. Akcan, T., Gökçe, R., Asensio, M., Estévez, M., Morcuende, D. *Journal of Food Science and Technology (Mysore)* Volumen: 54, Primera página: 3050 Año: 2017

Hawberry (*Crataegus monogyna* Jacq.) extracts inhibit lipid oxidation and improve consumer liking of ready-to-eat (RTE) pork patties. Akcan, T., Estévez, M., Rico, S., Ventanas, S., Morcuende, D. *Journal of Food Science and Technology (Mysore)* Volumen: 54, Primera página: 1248 Año: 2017

Oxidative damage to food and human serum proteins: Radical-mediated oxidation vs. glyco-oxidation. Luna, C., Estévez, M. *Food Chemistry* Volumen:, Primera página: Año: en prensa

### III.2.2 Tesis Doctorales dirigidas

Desarrollo y optimización de microcápsulas de ácidos grasos poliinsaturados mediante spray-drying. Efecto de su incorporación sobre las características de calidad de precocinados cárnicos.

Doctorando: Estefanía Jiménez Martín.

Fecha de defensa: 20 de abril de 2016.

Doctorado Europeo.

Directores/as: Teresa Antequera, María Trinidad Pérez Palacios, Jorge Ruiz.

Algoritmos de extracción de características a partir de imágenes de resonancia magnética para evaluar parámetros de calidad en productos cárnicos.

Doctorando: Daniel Caballero Jorna.

Fecha de defensa: 29 de mayo de 2017.

Directores/as: Teresa Antequera, María Trinidad Pérez Palacios, Andrés Caro.

Evaluación sensorial de productos cárnicos derivados del cerdo ibérico: aplicación de técnicas dinámicas y descriptivas rápidas

Doctorando: Laura Lorigo Contreras

Directores: Sonia Ventanas y Mario Estévez

Universidad: Universidad de Extremadura  
Facultad / Escuela: Facultad de Veterinaria  
Año: 16-06-2016  
Calificación: Sobresaliente CUM LAUDE por unanimidad

“Meat from broiler and spent hen for the manufacture of a charqui-like product”  
Doctorando: Fábio Anderson Pereira da Silva  
Directores: Marta Madruga (Universidad Paraiba) y Mario Estévez (Unex).  
Universidad: Universidad Federal de Paraiba (Brasil)  
Facultad / Escuela: Centro de Tecnología  
Año: 26-02-2016  
Calificación: Sobresaliente

“Oxidação lipídica e proteica de um produto emulsionado tipo hambúrguer de frango”  
Doctorando: Valquíria Cardoso da Silva Ferreira  
Directores: Marta Madruga (Universidad Paraiba) y Mario Estévez (Unex).  
Universidad: Universidad Federal de Paraiba (Brasil)  
Facultad / Escuela: Facultad de Veterinaria  
Año: 1-08-2016  
Calificación: Sobresaliente

“Valor nutritivo de pasta de aguacate y su efecto en la estabilidad oxidativa y calidad sensorial de carne de cerdo”  
Tesis doctoral/Tesina Licenciatura: DOCTORAL (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT, MEJICO),  
Doctorando/Licenciado: Silvia Hortencia Hernández López  
Directores: German Rodríguez-Carpena (Universidad Nayarit) y Mario Estévez (Unex).  
Fecha de defensa pública: 19/09/2016  
Calificación: Sobresaliente

### III.2.3 Libros/capítulos de libros

-Daniel Franco, Teresa Antequera, Samantha Cristina de Pinho, Estefanía Jiménez, Trinidad Pérez-Palacios, Carmen Sílvia Fávoro-Trindade, José M. Lorenzo  
The Use of Microencapsulation by Spray-Drying and Its Application in Meat Products  
-LIBRO: STRATEGIES FOR OBTAINING HEALTHIER FOODS  
-EDITORES: JOSÉ MANUEL LORENZO RODRIGUEZ, FRANCISCO JAVIER CARBALLO GARCÍA  
-ISBN: 978-1-53612-185-8  
-AÑO: 2017

-M. Estévez  
-TÍTULO DEL LIBRO: New aspects of meat quality – from genes to ethics  
-EDITORIAL: ELSEVIER Ciudad/País: Oxford, Reino Unido  
-AÑO: 2017 I.S.B.N. 978-0-08-100593-4 Lugar de Depósito: Reino Unido  
-TÍTULO DEL CAPÍTULO: What’s new in meat oxidation?  
-PÁGINA INICIAL: 91 PÁGINA FINAL: 109

- Carvalho, R., Shimokomaki, M., Estévez, M.  
-TÍTULO DEL LIBRO: Poultry Quality Evaluation: Quality Attributes and Consumer Values  
-EDITORIAL: ELSEVIER Ciudad/País: Oxford, Reino Unido  
-AÑO: 2017 I.S.B.N. 978-0-08-100763-1 Lugar de Depósito: Reino Unido  
-TÍTULO DEL CAPÍTULO: Poultry meat color and oxidation  
-PÁGINA INICIAL: 133 Página final: 157

-M. Estévez, Li, Z., Soladoye, O.P., Van-Hecke, T.  
-TÍTULO DEL LIBRO: Advances in Food & Nutrition Research vol. 82  
-EDITORIAL: ELSEVIER Ciudad/País: Oxford, Reino Unido  
-AÑO: 2018 I.S.B.N. 978-0-12-811916-7 Lugar de Depósito: Reino Unido  
-TÍTULO DEL CAPÍTULO: Health Risks of Food Oxidation  
-PÁGINA INICIAL: 45 PÁGINA FINAL: 81

### III.2.4 Patentes

TÍTULO: EMULSIÓN Y MICROCÁPSULAS DE ACEITE DE PESCADO,  
PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE LAS MISMAS Y COMPOSICIÓN ALIMENTARIA QUE  
LAS CONTIENE

INVENTORES: MTrinidad Pérez Palacios; Estefanía Jiménez Martín; Jorge Ruiz Carrascal;  
MTeresa Antequera Rojas

ENTIDAD: Universidad de Extremadura

Nº DE APLICACIÓN: P201631590

PAÍS DE INSCRIPCIÓN: España

Fecha de registro: 15/12/2016

## III.2 Congresos, Jornadas y Reuniones

### III.2.1 Ponencias invitadas

T. Pérez Palacios, T. Antequera, J. Mir-Bel

Desarrollo de modelos para monitorizar mediante nirs las condiciones de cocinado de carnes, pescados y vegetales

*XII Jornada de los Grupos de investigación que colaboran con BSH Electrodomésticos España S.A. Zaragoza, España. 2017*

Estévez, M.

Oxidation and meat quality: Impact of Antioxidants

Congreso: 9th Advancia International Seminar Carácter (Nal./Internal.): Internacional

Lugar de celebración (Ciudad/País): Prague (Czech Republic)

AÑO: 2015

Estévez, M.

Dietary protein oxidation and its potential impact on health: scientific evidences

Congreso: 11th SLACA Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos Carácter (Nal./Internal.): Internacional

Lugar de celebración (Ciudad/País): Campinas (Brazil)

AÑO: 2015

Estévez, M.

Oxidation and poultry meat: effect of sulfur-amino acids

Congreso: 10th Advancia International Seminar Carácter (Nal./Internal.): Internacional

Lugar de celebración (Ciudad/País): Beijing, China

AÑO: 4th September 2016

Estévez, M.

Oxidación y calidad de carne: impacto de los antioxidantes

Congreso: XXX Jornadas Técnicas Indukern Carácter (Nal./Internal.): Nacional

Lugar de celebración (Ciudad/País): Madrid y Barcelona, España AÑO: 10-03-2016/11-03-2016

Estévez, M.

Meat Quality and Oxidative Issues

Congreso: First Webminar by Adisseo Carácter (Nal./Internal.): Internacional

Lugar de celebración (Ciudad/País): Paris, Francia AÑO: 12-10-2016

M. Estévez

Oxidative stress: from farm to fork

Congreso Phileo Global Poultry Symposium on Health and Management Carácter (Nal./Internal.): Internacional

Lugar de celebración (Ciudad/País): Sao Paulo, Brasil AÑO: 24-10-2016

Oxidative stress in animal production: impact on meat quality

Congreso: 4th Greek Congress of Veterinary Animal Production and Food Hygiene

Carácter (Nal./Internal.): Internacional

Lugar de celebración (Ciudad/País): Volos, Grecia AÑO: 14-05-2017

Estévez, M.

El jamón curado como componente de una dieta equilibrada. Visión científica

Congreso: IX Congreso Mundial del Jamon Curado (Nal./Internal.): Internacional

Lugar de celebración (Ciudad/País): Toledo AÑO: 08-06-2017

Estévez, M.

Novel insights into the role of food protein oxidation on consumer's health

Congreso: International Symposium of Food Nutrition and Health

Lugar de celebración (Ciudad/País): Dalian, China AÑO: 28-05-2017

Ventanas, S.

Meat or not Meat: the consumer perception.

Seminario: "Nutritionist: the final objective-producing desirable meat.

European Federation of Animal Science y Advancia Academy. Barcelona, Mayo 2017

Ventanas S.

Estudio de las emociones generadas durante el consumo de jamón curado.. Sesión 11. El Marketing aplicado al jamón. IX Congreso Mundial del Jamón Curado. Junio 2017, Toledo.

## Capítulo IV. Reducción de sal en jamón curado: estrategias basadas en un mejor control de la absorción de sal e identificación de defectos texturales para la aplicación de tratamientos paliativos.

P. Gou, E. Fulladosa, J. Arnau

*IRTA-Programa de Tecnología Alimentaria. 17121 Monells (Girona)*

### IV.1 Desarrollos en investigación

#### IV.1.1 Introducción

En los últimos años ha habido un esfuerzo importante para reducir la cantidad de sal en alimentos debido a los efectos adversos de un excesivo consumo de sodio sobre la hipertensión arterial (Kaplan, 2000; Am. J. Clin. Nutr. 71, 1020-1026). El contenido medio de sal en jamones curados actualmente está alrededor del 5%. La reducción del contenido de NaCl estaría en concordancia con la recomendación de la Organización Mundial de la Salud de reducir gradualmente la ingesta diaria de sal.

La reducción de sal en jamón curado plantea dos problemas principales: uno de seguridad, por el efecto reductor de la  $a_w$  que tiene la sal, y otro de aparición de defectos de textura, debido a un incremento excesivo de la proteólisis (Parolari et al., 1994; Meat Science 38, 117-122).

El contenido de sal no es homogéneo en los jamones elaborados por una misma empresa. Hay una distribución, con mayor o menor desviación, de los jamones con respecto a su contenido de sal. En muchos casos, la experiencia de muchos lotes de fabricación ha llevado a fijar los contenidos de sal en un valor medio tal que el riesgo microbiológico, ocasionado por un contenido excesivamente reducido de sal, sea bajo. Por tanto, cualquier reducción del contenido de sal hará aumentar este riesgo.

Una de las estrategias planteadas ha sido disminuir la desviación de contenidos de sal entre jamones antes de realizar la reducción del valor medio. Para ello, se ha planteado una clasificación de la materia prima acorde a su capacidad para absorber sal durante el salado (basada principalmente en el peso y el nivel de engrasamiento), para ajustar el tiempo de salado en cada clase. Sin embargo, esta clasificación no resuelve la variación de sal dentro de cada clase debida al propio proceso de salado. Hay factores difíciles de controlar (como la temperatura y humedad de la sal, tipo de corte, nivel de pulido y distribución de la grasa subcutánea de los jamones, la posición en el contenedor durante el salado, etc) que generan una variabilidad importante (García-Gil et al., 2011; Meat Science 90, 386-392). Por este motivo, durante los últimos años se ha planteado modificar el proceso de salado en función de la estimación on-line de la sal absorbida.

Sin embargo, con esta estrategia, a pesar de poder reducir el contenido de sal sin aumentar el riesgo microbiológico, no se ha resuelto totalmente el problema del incremento de la incidencia de jamones con textura defectuosa. La disponibilidad de métodos paliativos para aplicarlos a jamones defectuosos, como por ejemplo el tratamiento por alta presión (García-Gil et al., 2014; Innovative Food Science Emerging

Technologies 22, 63-69), facilita la reducción del contenido de sal en jamones, pero ello conlleva la necesidad de disponer métodos on-line y no destructivos para detectar los jamones con defectos de textura.

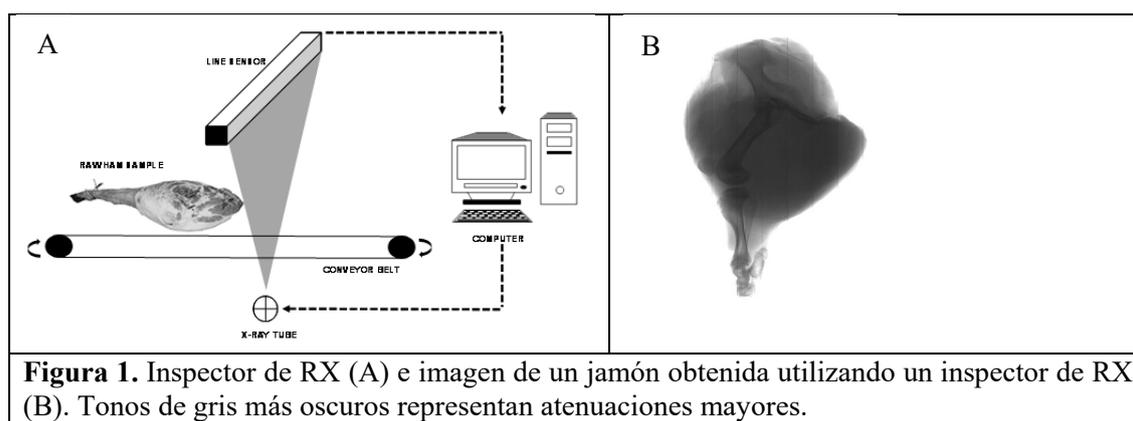
En este marco se han llevado a cabo estudios con el objetivo de:

- (1) Evaluar la capacidad de un inspector de Rayos X para el seguimiento no destructivo de la absorción de sal en jamones curados durante el salado.
- (2) Evaluar la capacidad de la metodología Laser backscattering imaging (LBI) para detectar de forma no destructiva el defecto de textura pastosa.

### IV.1.2 Metodología

#### Evaluación de la capacidad de un inspector de Rayos X para el seguimiento de la absorción de sal durante el salado

Se utilizó un inspector de rayos X comercial (Multiscan Technologies, S.L. Cocentaina, España). En cada jamón se determinó la atenuación de rayos X en tres condiciones (combinaciones de voltaje e intensidad eléctrica): 90 kV y 4 mA, 70 kV y 8 mA, 50 kV y 15 mA. Para cada jamón y condición de escaneo se obtuvo una imagen en dos dimensiones con los valores de atenuación (Figura 1).



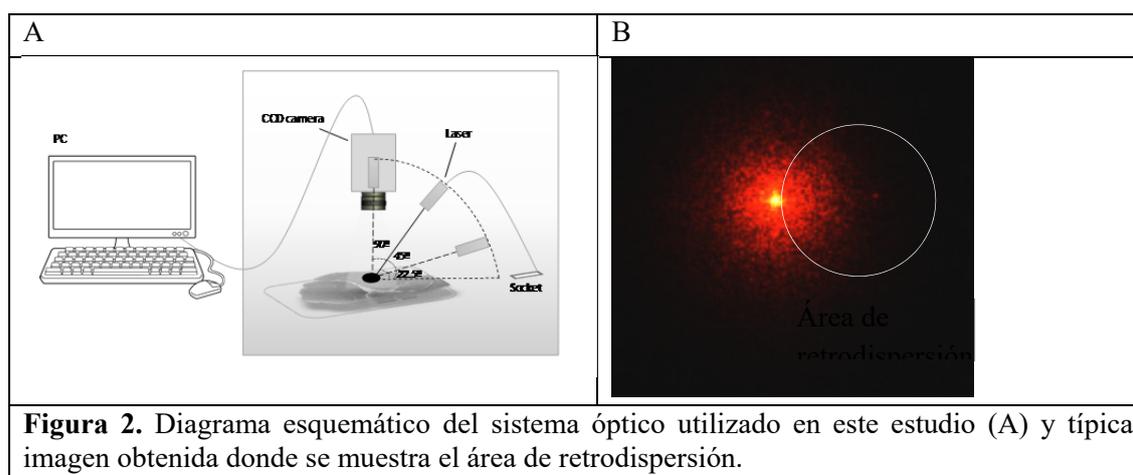
**Figura 1.** Inspector de RX (A) e imagen de un jamón obtenida utilizando un inspector de RX (B). Tonos de gris más oscuros representan atenuaciones mayores.

Se utilizaron 54 jamones de cruces de las razas Duroc, Large White y Landrace (Jamones Blancos). Los jamones fueron pesados y salados en pila durante 2, 4, 7, 11 o 16 días a 3 °C y 85% HR para obtener un amplio rango de valores de contenido de sal. Después del salado, los jamones fueron lavados con agua a 15 °C, pesados, escaneados con el Inspector de Rayos X y envasados al vacío. Después de 40 días, se deshuesaron, descortezaron y se picaron y homogenizaron conjuntamente los tejidos magro y graso. Esta pasta cárnica se utilizó para el análisis de sal por triplicado, siguiendo la metodología ISO 1841-2 (Meat and meat products. Determination of chloride content-part 2: Potentiometric method, Reference method, Geneva, International Organization for Standardization, 1996) y utilizando un valorador potenciométrico 785 DMP Titrino (Metrohm AG, Herisau, Suiza).

Para la construcción y validación del modelo predictivo para el contenido de sal, los jamones se dividieron en un grupo de calibración (2/3 de los jamones) y otro de validación (1/3 de los jamones), asegurando que cubran el mismo rango de valores de contenido de sal. Se ajustaron modelos de predicción utilizando el procedimiento REG de XLSTAT (Addinsoft, Paris, Francia). Como variables predictivas se utilizó el valor global de atenuación para cada jamón en cada una de las condiciones de adquisición utilizadas (90, 70 y 50 kV) dividido por el peso del jamón.

Evaluación de la metodología LBI para detectar textura pastosa en jamón

Se utilizó un sistema LBI desarrollado en el IRTA (Figura 2), que incluye dos fuentes láser de luz coherente monocromática con longitudes de onda de 532 nm (verde) y 635 nm (rojo) respectivamente, ambas con una potencia de 5 mW (Global Laser Tech, Gwent, UK). Las dos fuentes de láser se aplicaron por separado sobre la superficie de la muestra. Se adquirieron imágenes de 1280x960 píxeles con una cámara digital CCD (XCD-SX90CR, Sony, Japón), sensible a longitudes de onda entre 400 y 750 nm, de las áreas de luz retrodispersada formadas debido a la incidencia del haz (verde o rojo) sobre la muestra. En las imágenes se calcula el área de la superficie de la muestra donde se observa luz retrodispersada y la intensidad media de la luz retrodispersada en esta área.



**Figura 2.** Diagrama esquemático del sistema óptico utilizado en este estudio (A) y típica imagen obtenida donde se muestra el área de retrodispersión.

Se utilizaron muestras de 4x4x3 cm<sup>3</sup> del músculo *Biceps femoris* procedentes de 10 jamones. Cada muestra se partió en dos secciones de 1,5 cm de espesor y se inocularon 0,5 mL de un enzima proteolítico (Delvolase®, DSM Food Specialties, France) distribuidos sobre las superficies de corte. A continuación se volvieron a unir las dos secciones, para reconstituir la muestra inicial (de 3 cm de espesor. Las muestras se envasaron al vacío y se guardaron a 20 °C durante 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas, antes de ser analizadas. Se tomaron 4 imágenes de cada muestra con la fuente de luz situada a 20 cm de la superficie, siendo el haz perpendicular a la misma.

### IV.1.3 Resultados y Discusión

#### Evaluación de un inspector de Rayos X para el seguimiento de la absorción de sal

El modelo que mejor explica la absorción de sal durante el proceso de salado se obtuvo utilizando como variable predictora tan sólo la atenuación a 50 kV. El hecho de que con una sola energía pueda estimarse de forma satisfactoria la absorción de sal puede facilitar enormemente la implementación de esta tecnología en la industria, ya que la utilización de energías adicionales implica una inspección más lenta y encarece el equipo.

El ajuste obtenido para estimar el contenido de sal con este modelo con los 36 jamones del grupo de calibración fue muy bueno:  $R^2 = 0,94$  y error de ajuste (RMSEC) = 0,19%. La capacidad de predicción de este modelo también se mostró muy alta cuando se aplicó al grupo de jamones de validación:  $R^2 = 0,93$  y error de predicción (RMSEV) = 0,21%. Estos errores son claramente superiores a los errores analíticos obtenidos con métodos de referencia en el laboratorio (inferiores a 0,1%). Sin embargo, los análisis de

laboratorio son destructivos, no permiten analizar toda la producción y tienen el inconveniente de que a pesar de su gran precisión pueden no ser exactos, en el sentido que el muestreo puede causar un sesgo muy importante, a menos que se homogenice muy bien todo el jamón antes de ser muestreado. Teniendo en cuenta que la variación de los contenidos de sal en jamones después del proceso de salado puede ser importante (desviaciones superiores a 1 %), esta metodología con un error de predicción del orden de 0,2% puede ser útil en la industria para evaluar las modificaciones tecnológicas dirigidas a aumentar la homogeneidad de los jamones en cuanto a contenido de sal. También se ha evaluado esta tecnología para ajustar el proceso de salado (Fulladosa et al., 2015; Food Control 47, 37-42), utilizando la predicción de sal absorbida a los 4 días de salado y las ecuaciones de absorción de sal en función del tiempo desarrolladas previamente (Serra et al., 2010; Proceedings 6th ICoMST, 13-16). En este ensayo se consiguió reducir la desviación de los contenidos de sal del lote aproximadamente a la mitad respecto al salado estándar, así como reducir el contenido de sal medio en un 25%.

### Evaluación de la metodología LBI para detectar textura pastosa en jamón

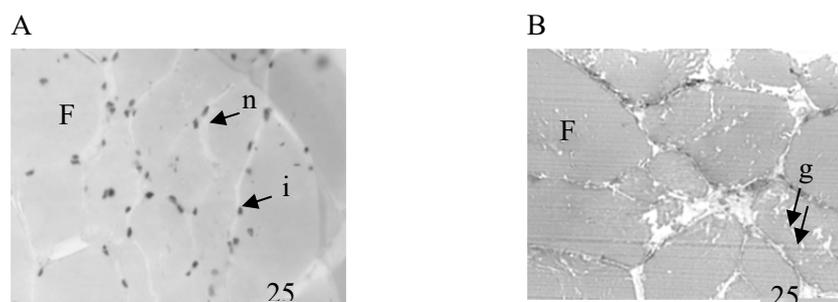
Los resultados indican que el láser rojo es más adecuado que el láser verde para el análisis de muestras de jamón curado ya que éstas produjeron una menor absorción de la luz. No se observó ningún efecto claro de la acción enzimática sobre el área de dispersión de la luz. Sin embargo, sí se redujo la intensidad de la luz dispersada a medida que actuaba el enzima (Tabla 1). Esta reducción no siguió una relación lineal con el tiempo de inducción, sino que hubo una reducción más importante durante las primeras horas. En concreto, se observó una relación lineal entre la intensidad media de la luz dispersada y el tiempo de inducción proteolítica durante las primeras 8 horas ( $R^2 = 0,94$ ).

**Tabla 1. Efecto del tiempo de acción de la enzima proteolítica en el área y la intensidad de luz retrodispersada (promedio  $\pm$  desviación estándar) utilizando el láser rojo (635 nm).**

Tiempo acción del enzima	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	24 h	48h
Área de dispersión (mm <sup>2</sup> )	2962 <sup>a</sup>	2873 <sup>ab</sup>	2909 <sup>ab</sup>	2677 <sup>d</sup>	2762 <sup>cd</sup>	2838 <sup>bc</sup>	2728 <sup>d</sup>
	$\pm 335$	$\pm 363$	$\pm 396$	$\pm 395$	$\pm 391$	$\pm 420$	$\pm 364$
Intensidad media de luz	40,1 <sup>a</sup>	39,3 <sup>b</sup>	39,2 <sup>b</sup>	38,6 <sup>bc</sup>	38,4 <sup>c</sup>	38,3 <sup>c</sup>	38,0 <sup>c</sup>
	$\pm 1,8$	$\pm 1,8$	$\pm 1,8$	$\pm 1,8$	$\pm 1,6$	$\pm 1,7$	$\pm 1,5$

<sup>abc</sup> valores dentro de una misma fila sin letras comunes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Durante la proteólisis ocurren modificaciones estructurales que producen la rotura y debilitamiento de la matriz cárnica, causando más espacios intramusculares y membranas celulares menos robustas (Larrea et al., 2007; Meat Science 76, 574-582). La Figura 3 ilustra las diferencias que se observan entre tejidos con un índice de proteólisis estándar (A) y elevado (B). Estos cambios estructurales podrían explicar la reducción de la intensidad de luz retrodispersada observada en las muestras con más proteólisis (Tabla 1).



**Figura 3.** Imágenes de microscopía óptica de muestras de jamón curado con un índice de proteólisis estándar (31%) (A) y elevado (47%). F; fibras musculares, n: núcleos, i: espacios intercelulares, g: agujeros.

Sin embargo, otros factores como el contenido de agua también influyen en estos parámetros (Fulladosa et al., 2017; Food Control 77, 235-242), dificultando la caracterización de las muestras comerciales (que tienen variaciones de composición).

### IV.1.4 Conclusiones

El modelo de predicción de la cantidad de sal absorbida por los jamones durante el salado con un inspector de rayos X tiene un error de predicción suficientemente bajo para poder ser utilizado en la industria para evaluar las modificaciones tecnológicas dirigidas a aumentar la homogeneidad de los jamones en cuanto a contenido de sal, o incluso, por su fácil incorporación a la línea de procesado, para ser utilizado para ajustar el proceso de salado.

La tecnología LBI podría tener potencial para detectar de manera no destructiva el defecto de textura pastosa en jamón curado, siempre y cuando se combine con otras tecnologías que ayuden a solucionar las interferencias que producen otros parámetros como el contenido de agua en la señal.

### IV.1.5 Financiación

INIA (Proyecto SOLTEXJAM, RTA2013-00030-C03-01)

Ministerio de Economía y Competitividad (PEJ-2014-A34573)

CDTI (Proyecto SMARTHAM, IDI- IDI-20150895)

COST Action FA1102

INTERREG SUDOE (SOE2/P1/E299)

Programa CERCA de la Generalitat de Catalunya

## IV.2 Producción científica

### IV.2.1 Artículos en revistas científicas

Comaposada, J., Gou, P., Marcos, B., & Arnau, J. 2015. Physical properties of sodium alginate solutions and edible wet calcium alginate coatings. *LWT-Food Science and Technology*, 64, 212-219.

Benet, I; Guàrdia, MD; Ibáñez, C; Solà, J; Arnau, J; Roura, E. 2015. Analysis of SPME or SBSE extracted volatile compounds from cooked cured pork ham differing in intramuscular fat profiles. *LWT-Food Science and Technology*, 60, 393-399.

Benet, I; Ibáñez, C; Guàrdia, MD; Solà, J; Arnau, J; Roura, E. 2015. Optimisation of stir-bar sorptive extraction (SBSE), targeting medium and long-chain free fatty acids in cooked ham exudates. *Food Chemistry*, 185, 75-83.

De Prados, M., Fulladosa, E., Gou, P., Muñoz, I., Garcia-Perez, J.V., & Benedito, J. 2015. Non-destructive determination of fat content in green hams using ultrasound and X-Rays. *Meat Science*, 104, 37-43.

Font-i-Furnols, M., Carabus, A., Pomar, C., Gispert, M. 2015. Estimation of carcass composition and cut composition from computed tomography images of live growing pigs of different genotypes. 2015. *Animal*, 9, 166-178.

- Fulladosa, E., Muñoz, I., Serra, X., Arnau, J., & Gou, P. 2015. X-ray absorptiometry for non-destructive monitoring of the salt uptake in bone-in raw hams during salting. *Food Control*, 47, 37-42.
- Fulladosa, E., De Prados, M., Garcia-Perez, J.V., Benedito, J., Muñoz, I., Arnau, J., & Gou, P. 2015. X-Ray absorptiometry and ultrasound technologies for non-destructive compositional analysis of dry-cured ham. *Journal of Food Engineering*, 155, 62-68.
- Gómez, J; Sanjuan, N; Bon, J; Arnau, J; Clemente, G. 2015. Effect of temperature on nitrite and water diffusion in pork meat. *Journal of Food Engineering*, 149, 188-194.
- Hospital, XF; Carballo, J; Fernandez, M; Arnau, J; Gratacos, M; Hierro, E. 2015. Technological implications of reducing nitrate and nitrite levels in dry-fermented sausages: Typical microbiota, residual nitrate and nitrite and volatile profile. *Food Control*, 57, 275-281.
- Magrinya, N; Terjung, N; Loeffler, M; Gibis, M; Bou, R; Weiss, J. 2015. Influence of fat addition on the antimicrobial activity of sodium lactate, lauric arginate and methylparaben in minced meat. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 86-94.
- Muñoz, I., Rubio-Celorio, M., Garcia-Gil, N., Guàrdia, M. D., & Fulladosa, E. 2015. Computer image analysis as a tool for classifying marbling: A case study in dry-cured ham. *Journal of Food Engineering*, 166, 148-155.
- Realini, C.E., Guardia, M.D., Diaz, I., Garcia-Regueiro, J.A., Arnau, J. 2015. Effects of acerola fruit extract on sensory and shelf-life of salted beef patties from grinds differing in fatty acid composition. *Meat Science*, 142, 146-152.
- Rubio-Celorio, M; Garcia-Gil, N; Gou, P; Arnau, J; Fulladosa, E. 2015. Effect of temperature, high pressure and freezing/thawing of dry-cured ham slices on dielectric time domain reflectometry response. *Meat Science*, 100, 91-96.
- Benet, I; Guardia, MD; Ibanez, C; Sola, J; Arnau, J; Roura, E. 2016. Low intramuscular fat (but high in PUFA) content in cooked cured pork ham decreased Mail lard reaction volatiles and pleasing aroma attributes. *Food Chemistry*, 196, 76-82.
- Font-I-Furnols, M; Carabus, A; Munoz, I; Candek-Potokar, M; Gispert, M. 2016. Evolution of testes characteristics in entire and immunocastrated male pigs from 30 to 120 kg live weight as assessed by computed tomography with perspective on boar taint. *Meat Science*, 116, 8-15.
- Fulladosa, E., Gou, P., & Muñoz, I. 2016. Effect of dry-cured ham composition on X-ray multi energy spectra. *Food Control*, 70, 41-47.
- Lloret, E; Fernández, A; Trbojevich, R; Arnau, J; Picouet, PA. 2016. Relevance of nanocomposite packaging on the stability of vacuum-packed dry cured ham. *Meat Science*, 118, 8-14.
- Marcos, B; Gou, P; Arnau, J; Comaposada, J. 2016. Influence of processing conditions on the properties of alginate solutions and wet edible calcium alginate coatings. *LWT-Food Science and Technology*, 74, 271-279.
- Martínez-Macipe, M; Rodríguez, P; Izquierdo, M; Gispert, M; Manteca, X; Mainau, E; Hernández, FI; Claret, A; Guerrero, L; Dalmau, A. 2016. Comparison of meat quality parameters in surgical castrated versus vaccinated against gonadotrophin-releasing factor male and female Iberian pigs reared in free-ranging. *Meat Science*, 111, 116-121.
- Mora-Gallego, H; Guàrdia, MD; Serra, X; Gou, P; Arnau, J. 2016. Sensory characterisation and consumer acceptability of potassium chloride and sunflower oil addition in small-caliber non-acid fermented sausages with a reduced content of sodium chloride and fat. *Meat Science*, 112, 9-15.

Resconi, VC; Keenan, DF; Barahona, M; Guerrero, L; Kerry, JP; Hamill, RM. 2016. Rice starch and fructo-oligosaccharides as substitutes for phosphate and dextrose in whole muscle cooked hams: Sensory analysis and consumer preferences. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 284-292.

Rubio-Celorio, M., Fulladosa, E., Garcia-Gil, N., & Bertram, HC. 2016. Spectroscopic approach to elucidate water distribution and protein interaction in dry-cured ham after high pressure processing. *Journal of Food Engineering*, 169, 291-297.

Fulladosa, E., Rubio-Celorio, M., Skytte, JL., Muñoz, I., & Picouet, P. 2017. Laser-light backscattering response to water content and proteolysis. *Food Control*, 77, 235-242.

### IV.2.2 Tesis Doctorales dirigidas

Título: Technologies to determine quality parameters and the effect of high pressure processing on dry-cured ham.

Doctorando: Marc Rubio Celorrio

Directores: Elena Fulladosa

Facultad y Universidad: Universitat de Girona

Año: 2015

Calificación: Cum laude / Mención Internacional

Título: Analytical and sensory evaluation of pork cooked ham volatiles: Variations related to meat lipid profiles.

Doctorando: Iu Benet

Directores: Maria Dolors Guàrdia

Facultad y Universidad: The University of Queensland (Australia)

Año: 2015

Calificación: *Cum laude*

Título: Evaluation of live growing pigs of different genotypes and sexes by means of computed tomography

Doctorando: Anna Carabús

Directores: Maria Font i Furnols

Facultad y Universidad: Universidad de Zaragoza

Año: 2015

Calificación: Cum laude / Premio Extraordinario de Doctorado / Mención Internacional

### IV.2.3 Libros/capítulos de libros

Guàrdia, M.D., Guerrero, L., Claret, A., & Arnau, J. 2017. Análisis sensorial en jamón curado. En Análisis Sensorial de los Alimentos. Páginas: 394-426. Ed: AMV Ediciones.

### **IV.3 Congresos, Jornadas y Reuniones**

#### **IV.3.1 Ponencias invitadas en Congresos, Jornadas y Reuniones**

Ponente: Luis Guerrero

Ponencia: Salud y comportamiento del consumidor: una nueva paradoja.

Congreso / Jornada / Reunión: Congreso CYTA/CESIA

Lugar y fecha: Badajoz, 7-10/04/2015

Ponente: Maria Dolors Guàrdia

Ponencia: ¿Qué es la calidad sensorial del jamón curado para el consumidor?

Congreso / Jornada / Reunión: VIII Congreso Mundial del Jamón

Lugar y fecha: Toulouse (Francia), 25-26/06/2015

Ponente: Luis Guerrero

Ponencia: Do we all perceive food-related wellbeing in the same way? Results from a cross-cultural study using a new wellbeing scale.

Congreso / Jornada / Reunión: 11th Pangborn Sensory Science Symposium

Lugar y fecha: Gothenburg (Suecia), 7-10/04/2015

Ponente: Elena Fulladosa

Ponencia: Laser backscattering imaging to determine proteolysis index and texture defects in dry-cured ham.

Congreso / Jornada / Reunión: FAIM IV: Fourth Annual Conference on Body and Carcass Evaluation, Meat Quality, Software and Traceability.

Lugar y fecha: Edinburg (UK), 22-23/09/2015

Ponente: Luis Guerrero

Ponencia: Generación de descriptores sensoriales con catadores entrenados mediante métodos no consensuales.

Congreso / Jornada / Reunión: Food Safety and Traditional Foods

Lugar y fecha: Muscat (Oman), Abril 2016

#### **IV.3.2 Actividades de organización de Congresos, Jornadas y Reuniones**

Congreso / Jornada / Reunión: VIII Congreso Mundial del Jamón Curado

Lugar y fecha: Toulouse, 25 al 26 de junio de 2015

Actividad: Miembro del Comité Científico (Jacint Arnau)

Congreso / Jornada / Reunión: I Jornada Interactiva de la Industria de la Carne en Cataluña

Lugar y fecha: Caldes de Montbuí, 9 de febrero de 2016

Actividad: Miembro del Comité Organizador (Jacint Arnau, Pere Gou)

Congreso / Jornada / Reunión: IX Congreso Mundial del Jamón Curado

Lugar y fecha: Toledo, 7 al 9 de junio de 2017

Actividad: Miembro del Comité Científico (Jacint Arnau)

Congreso / Jornada / Reunión: II Jornada Interactiva de la Industria de la Carne en Cataluña

Lugar y fecha: Vic, 30 de mayo de 2017

Actividad: Miembro del Comité Organizador (Jacint Arnau, Pere Gou)



## **Sección B**

# **SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA EN PRODUCTOS CÁRNICOS**



## Capítulo V. Tipos patógenos de *Escherichia coli* en pequeños rumiantes y su influencia en la seguridad alimentaria de los productos alimenticios derivados

A. Otero, J. Santos, T.M. López-Díaz, J.M. Rodríguez-Calleja

*Microbiología de los alimentos y seguridad alimentaria. Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. 24071-León.*

### V.1 Desarrollos en investigación

#### V.1.1 Introducción

Determinadas cepas de *Escherichia coli*, en particular las adscritas al grupo de las productoras de toxina Shiga (STEC) o al enteropatógeno (EPEC) son causa de diversas enfermedades humanas que, en buena parte de las ocasiones, se transmiten por los alimentos o por el agua. El reservorio de las primeras (STEC) está constituido principalmente por el ganado vacuno y por otros rumiantes. El reservorio principal de las cepas enteropatógenas (EPEC) está constituido por las personas portadoras. Sin embargo, cepas “atípicas” de EPEC (aEPEC), por su potencialidad patogénica, son consideradas patógenas emergentes y su reservorio principal está constituido por los animales cuyos productos se emplean en la alimentación humana.

Los objetivos de esta actividad investigadora han sido evaluar la importancia de determinados hábitats de la producción primaria de pequeños rumiantes (ovino, caprino) como fuente de cepas patógenas de *Escherichia coli* (tipos STEC, EPEC) y valorar la posible peligrosidad de dichas cepas mediante su serotipado, caracterización genética y mediante el establecimiento de sus relaciones filogenéticas.

#### V.1.2 Metodología

##### V.1.2.1 Toma de muestras

###### Producción ovina.

A lo largo de dos años se tomaron muestras de 388 granjas de ovejas productoras de leche ubicadas en Castilla y León localizadas en diez rutas de recogida de leche. En cada granja, se tomaron asépticamente muestras de 100 mililitros del correspondiente tanque de recogida de la leche de la explotación. Adicionalmente, en 10 de las granjas en las que previamente se había detectado la presencia de cepas STEC se tomaron, en dos períodos de tiempo (primavera y verano) muestras del aire (filtración de diez litros), del agua de los bebederos (250 mL), del pienso que se suministraba a los animales (25 g) y de las heces (mediante calzas estériles humedecidas con las que realizaba un recorrido por la granja). Detalles adicionales en Otero *et al.* (2017).

###### Producción caprina.

Durante dos años se tomaron muestras de 68 explotaciones de cabras (50-300 animales/explotación; razas Alpina y Murciana-Granadina; de carácter semi-intensivo) cuya leche se destinaba a la producción de queso. En cada granja, se tomaron asépticamente 100 ml del correspondiente tanque de almacenamiento de la leche. La toma se realizó en períodos distintos para cubrir las cuatro estaciones del año.

Adicionalmente, en cada una de dichas explotaciones se tomaron muestras del aire (filtración de 20 litros de aire), del agua de bebida (250 mL) y del pienso que se suministraba a los animales (25g).

### V.1.2.2 Determinaciones realizadas

#### Muestras de las explotaciones de ovino.

**Detección de toxina Shiga en leche.** Empleando la prueba en microplaca ProSpecT Shiga Toxin (Remel, Lenexa, KS, USA). Datos adicionales en Otero *et al.* (2017).

**Detección de genes *stx1* y *stx2* en muestras enriquecidas.** Mediante cultivo en TSB con 0,6% de extracto de levadura (TSB-YE) con incubación a 42°C durante 18h. Posterior extracción del ADN, realización de amplificación mediante PCR y posterior electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con lectura bajo la luz ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio (datos adicionales en Otero *et al.*, 2017).

**Detección y aislamiento de *Escherichia coli*.** Mediante enriquecimiento en TSB-YE, aislamiento en agar MacConkey con Sorbitol, Cefixima y Telurito (CT-SMAC) y en agar Enterohemolisina. Datos adicionales en Otero *et al.* (2017)

#### Caracterización de las cepas de *Escherichia coli*.

Genética. Presencia de genes *stx1*, *stx2*, *eae* (intimina), *eaex1* (variante  $\alpha 1$  de la intimina) y *hlyA* (enterohemolisina). En las cepas aisladas. Mediante amplificación por PCR y lectura adicional como se ha señalado previamente para los genes *stx1* y *stx2* en muestras enriquecidas. Datos adicionales en Otero *et al.* (2017).

Serológica. Aglutinación con partículas de latex (Dryspot) para identificar los serogrupos O157, O26, O91, O103, O111, O128 y O145. Técnicas de amplificación por PCR para la detección de los genes correspondientes a los antígenos O26, O45, O91, O103, O104, O111, O121, O128, O145, O146 y H7. Amplificación de un fragmento del gen *fliC*, purificación del DNA, secuenciación y comparación con las secuencias registradas en GenBank. Detalles adicionales en Otero *et al.* (2017).

#### Muestras de las explotaciones de caprino.

**Detección de genes *stx1*, *stx2* y *eae* en muestras enriquecidas.** Como se señaló previamente para las de ovino (*stx1* y *stx2*) y por un procedimiento similar para el gen *eae*. Detalles adicionales en Álvarez-Suárez *et al.* (2015).

**Detección y aislamiento de *Escherichia coli*.** Como se señaló previamente para las de ovino pero realizando el aislamiento únicamente en CT-SMAC.

#### Caracterización de las cepas de *Escherichia coli*.

Serológica. Aglutinación con partículas de latex (Dryspot) para identificar el serogrupo O157. Serotipificación por el Laboratorio Nacional de Referencia para *E. coli*. Detalles adicionales en Álvarez-Suárez *et al.* (2016).

Genética. Presencia de genes *stx1*, *stx2*, *eae* (intimina), plásmido pEAF, en las cepas aisladas. Mediante amplificación por PCR y lectura adicional como se ha señalado previamente para los genes *stx1* y *stx2* en muestras enriquecidas. Datos adicionales en Álvarez-Suárez *et al.* (2016).

Tipificación. Mediante MLST y PFGE. Datos adicionales en Álvarez-Suárez *et al.* (2016).

### V.1.3 Resultados y Discusión

#### Explotaciones de ovino

Prevalencia de toxina Shiga en leche de oveja. No se detectó en ninguna de las muestras analizadas.

Prevalencia de genes *stx* en leche de oveja y en las explotaciones de ovino. Un total de 176 de las 388 muestras presentaban uno o ambos genes (45,4%). Dicha prevalencia es alta en el contexto europeo. No se detectó ninguno de los genes en las muestras de aire y pienso, lo que refuerza la tesis de que ni el pienso ni el aire son vehículos de importancia significativa en la distribución de estas cepas. El 45% de

las muestras del agua de bebida presentaban alguno de los genes y en el 25% de las muestras de heces se detectó el gen *stx2*. La presencia en las heces se corresponde con hallazgos previos y el agua de bebida se ha señalado no sólo como un vehículo apropiado para la difusión de cepas de STEC en las explotaciones, sino también como un reservorio de las mismas, tesis a la que contribuyen también estos hallazgos.

**Cepas de STEC.** Se obtuvieron un total de 36 cepas a partir de la leche procedente de 24 granjas (prevalencia: 8,8%), dos de 20 muestras de agua (prevalencia: 10%) y nueve de 20 muestras de heces (prevalencia: 45%). La mayoría (72,3%) presentaban el gen *stx1*, y de ellas la mayoría (32 cepas) presentaban el subtipo *stx1c* y las otras dos el subtipo *stx1a* (y el gen *eae*). Todas salvo una presentaban el gen *hlyA*.

Cuatro cepas presentaron el gen *stx2* y mostraron el mismo perfil de genes (*stx2c*, *fliCh7*, *eae*, *eaer1*, *hlyA*) y fueron adscritas al serotipo O157:H7.

Nueve cepas presentaron los genes *stx1* y *stx2* y dos de ellas fueron serotipadas como O146:H21.

Salvo las seis cepas señaladas (cuatro como O157:H7, dos como O146:H21), el resto no fueron asignadas a serotipo.

La importante prevalencia de STEC hallada en la leche de oveja (superior a la señalada en otros estudios) puede atribuirse en parte al empleo de procedimientos de aislamiento sin empleo de antibióticos.

El aislamiento de *E. coli* O157:H7 en muestras de leche y de agua de bebida (con perfiles genéticos similares a los hallados en casos humanos) causa especial preocupación sanitaria. El serotipo O146:H21 también se ha relacionado con casos humanos.

### **Explotaciones de caprino.**

**Prevalencia de genes asociados a *Escherichia coli*.** En un 17,6% de las muestras de leche se amplificó alguno de los genes *stx1* y *stx2*, en un 5,9% se amplificaron los genes *stx* y *eae* y un 29,4% de las muestras amplificaron el gen *eae* pero no los *stx*

**Prevalencia de STEC y EPEC en leche de cabra.** Se aislaron 7 cepas de aEPEC y 9 de STEC de 13 muestras. De estas últimas, una pertenecía al serotipo O157, una cepa albergaba el gen *stx1*, cinco el gen *stx2* y tres ambos genes; cuatro de ellas, incluyendo la del serotipo O157 amplificaban el gen *eae*. La presencia de cepas STEC en leche de cabra es habitual. Sin embargo, las cepas aEPEC, aunque frecuentes en las heces del ganado caprino, no habían sido aisladas previamente con esta importante prevalencia en leche de cabra.

**Caracterización de cepas de *E. coli* aisladas de explotaciones de caprino.** De la caracterización de 25 cepas aEPEC (7 aisladas de leche de cabra, 15 de heces de las explotaciones, 3 del pienso) y de 19 cepas STEC (6 procedentes de leche de cabra, 8 de las heces, 3 del pienso y 2 del agua), los resultados más significativos fueron: (1) la mayoría de las cepas STEC albergan el gen *stx2* y seis poseían el gen *eae*, sugiriendo una potencial alta virulencia, (2) cuatro de las cepas STEC pertenecían al serotipo O157:H7 y dos de ellas se aislaron de la misma granja tanto de la leche como de las heces, lo que resalta la importancia de los pequeños rumiantes como reservorio de este tipo patógeno; todas las cepas del serotipo O157:H7 se agrupaban en el mismo completo clonal MLST y en el mismo grupo PFGE y poseían la variante  $\tau 1$  de la intimina, que se asocia con los serotipos de mayor virulencia, (3) dos de las cepas STEC se adscribieron al serotipo O5:HMN, siete al serotipo O146:H21 y tres al serotipo O166:H28, todos ellos habitualmente implicados en casos de enfermedades humanas; (4) una cepa de aEPEC se adscribió al serotipo O26:H11 y otra al serotipo O180:H2, ambas con otras características genéticas y epidemiológicas que sugieren que tienen un papel importante en los casos humanos; (5) el análisis filogenético separaba las cepas aEPEC de las STEC, pero la tipificación de los genes que se albergan en el locus del *barrido* de enterocitos (LEE) mostraba una importante similitud entre dichas cepas, lo que sugiere una proximidad en su carácter virulento.

#### V.1.4 Conclusiones

La leche de oveja puede constituir una fuente de STEC, pero la prevalencia media de los serotipos implicados en enfermedades humanas es baja. El ambiente de las explotaciones ovinas puede representar un reservorio importante de STEC.

Cepas de STEC y de EPEC pertenecientes a serotipos relacionados con graves enfermedades humanas (incluidos *E. coli* O157:H7, O5:HNM y O26:H11) se detectan con relativa frecuencia en leche de cabra y en las explotaciones caprinas.

Todo ello pone de manifiesto la importancia de las explotaciones de pequeños rumiantes como reservorios de cepas patógenas de *Escherichia coli* y la necesidad de incidir en las medidas higiénicas en la producción primaria para limitar su extensión

*Nota.-* Para bibliografía e información más detallada, véase apartado V.2.1.

#### V.1.5 Financiación

Ministerio de Economía y Competitividad, dentro del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (2008-2011), Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias. Proyecto AGL2011-26118.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto LE331A12-2.

Universidad de León. Plan propio de investigación.

### V.2 Producción científica

#### V.2.1 Artículos en revistas científicas

Álvarez-Suárez, M.-E., Otero, A., García-López, M.L., & Santos, J. 2015. Microbiological examination of bulk tank goat's milk in the Castilla y León Region in Northern Spain. *Journal of Food Protection*, 78, 2227-2232.

Álvarez-Suárez, M.-E., Otero, A., García-López, M.L., Dahbi, G., Blanco, J., Mora, A., Blanco, J. & Santos, J. 2016. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 148-154.

Otero, V., Sánchez, S., Herrera-León, S., Rodríguez-Calleja, J.M., Otero, A., García-López, M.L. & Santos, J. 2017. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bulk tank ewes' milk and sheep farm environment. *Small Ruminant Research*, 154, 110-114.

## Capítulo VI. *Listeria monocytogenes* en jamón curado: evaluación cuantitativa del riesgo y estrategias de eliminación basadas en el envasado activo antimicrobiano

S. Bover, T. Aymerich, A. Jofré, B. Martín, M. Garriga

*IRTA-Programa de Seguridad Alimentaria. 17121 Monells (Girona)*

### VI.1 Desarrollos en investigación

#### VI.1.1 Introducción

Los explotadores de las empresas alimentarias son los responsables de garantizar la seguridad de los alimentos que producen y comercializan, i.e. a través de un enfoque preventivo de autocontrol basado en la aplicación de medidas preventivas y estrategias de mitigación en el marco del APPCC. También son responsables de investigar y justificar científicamente el cumplimiento de las exigencias legales (i.e. criterios microbiológicos) y/o especificaciones exigidas por sus clientes, por ejemplo a través de una determinación formal (evaluación) del riesgo.

*Listeria monocytogenes* es el patógeno más relevante de los alimentos listos para el consumo (entre los que se incluye el jamón curado), frente al que se aplican diferentes políticas. En las directrices internacionales del *Codex Alimentarius* y en línea con la política a nivel europeo, i.e. Reglamento (CE) 2073/2005 y modificaciones, se establecen diferentes criterios microbiológicos en función de dos factores de riesgo, estableciendo un máximo de 100 ufc/g durante la vida útil de los productos no destinados a la población de riesgo (lactantes y usos médicos especiales), siempre que el explotador de la empresa alimentaria pueda demostrar su cumplimiento hasta el final de la vida útil del alimento frente a la autoridad competente. En cambio, en países como Estados Unidos prima la tolerancia cero, por lo que exigen ausencia de *L. monocytogenes* (en 25g). Esta política supone una barrera comercial (i.e. trabas a la exportación) de productos cárnicos curados típicos españoles, como así lo han manifestado las asociaciones empresariales del sector cárnico español.

En este marco, dentro de la iniciativa de investigación del proyecto *Listeria* cero del INIA y las interprofesionales INTERPORC y ASICI, se han llevado a cabo estudios con el objetivo de:

- (1) Evaluar cuantitativamente del riesgo asociado a la presencia de *Listeria monocytogenes* en jamón curado, desde la producción hasta el consumo
- (2) Evaluar el impacto de procedimientos biológicos basados en la aplicación de envasado activo antimicrobiano como sistemas de eliminación de *Listeria monocytogenes* en jamón curado.

#### VI.1.2 Metodología

Evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico

Se desarrolló un estudio de evaluación del riesgo asociado a la presencia de *L. monocytogenes* en jamón curado, desde la producción hasta el consumo, teniendo en cuenta las características representativas de

productos curados, concretamente jamón curado, y condiciones de elaboración y conservación representativas del mercado español.

La caracterización de factores extrínsecos, principalmente tiempo y temperatura, así como tipo de envase, asociados a los sistemas de producción (maduración, secado, loncheado, envasado,...), almacenamiento, distribución y venta del jamón curado se dilucidaron a partir de la información disponible proporcionada por parte de empresas, opinión de expertos, así como la complementación bibliográfica. El tratamiento y análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete informático de libre acceso R ([www.R-project.org](http://www.R-project.org)). Se estimó la probabilidad de ocurrencia asociada a una determinada concentración de *L. monocytogenes* en jamón curado, a partir de datos procedentes de la verificación de lotes y se aplicó un enfoque probabilístico mediante el uso de la función ALEATORIO de MS-Excel y la aplicación de la distribución binomial BINOMDIST.

La caracterización cuantitativa del comportamiento del patógeno durante la vida útil del jamón curado se llevó a cabo mediante ensayos de inoculación (*challenge test*), utilizando un cóctel de 4 cepas de *L. monocytogenes* proporcionadas por el INIA (EF 051005/37, EF 151105/2/A, EF 010207/24/A, EF 270406/1/A) pertenecientes a diferentes serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4 B, respectivamente), y la posterior modelización de los resultados obtenidos. Los ensayos se realizaron en dos tipos de jamón curado, Serrano e Ibérico de forma independiente, incluyendo 3 lotes independientes de merma alta, media y baja, respectivamente. El nivel de inóculo inicial considerado fue elevado (*ca.*  $10^6 - 10^7$  ufc/g) con el fin de monitorizar la supervivencia del patógeno a lo largo del tiempo y, en caso oportuno, poder cuantificar la inactivación en términos de reducciones logarítmicas, durante la conservación del producto. A partir de la información obtenida en las tareas anteriores, se construyó el modelo de evaluación de la exposición de *L. monocytogenes* por el consumo de jamón curado, siguiendo los principios y directrices reconocidos a nivel internacional (CAC, 1999; USDA, FSIS y EPA, 2012).

El modelo desarrollado parte de la asunción de que el proceso productivo del producto es eficaz para eliminar el riesgo asociado a la presencia de *L. monocytogenes* en el producto curado final (Medina, 2017. Reunión de Colaboración Público-Privada “Transferencia de resultados de proyectos INIA sobre *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos” Madrid, 4 Julio 2017). Sin embargo, los procedimientos de manipulación post-procesado, destinadas a la preparación de los formatos comerciales (e.g. deshuesado, loncheado, envasado, etc.) suponen un riesgo de recontaminación/contaminación cruzada (Giovannini et al. 2007. Food Control 18:789-799). El modelo pretende representar el comportamiento de *L. monocytogenes* en jamón curado a partir de la expedición del producto, teniendo en cuenta las características del producto (tipo Serrano e Ibérico,  $a_w$ ) y las condiciones de conservación razonablemente previsibles en cuanto a tiempo y temperatura durante toda la cadena de suministro. El comportamiento del patógeno en jamón curado (tipo Serrano e Ibérico) se estimó mediante la aplicación los modelos predictivos desarrollados a partir de los ensayos *challenge*. Para la caracterización del peligro, se utilizó el modelo de dosis-respuesta tipo exponencial y mediante procedimientos estocásticos basados en la simulación de Monte Carlo, del paquete informático @Risk, se estimó cuantitativamente la probabilidad de contraer listeriosis por el consumo de jamón curado por parte de la población sana adulta, así como por parte de población vulnerable (i.e. grupos de riesgo más susceptibles).

Estudio del impacto del envasado activo antimicrobiano

La actividad antilisteria de diferentes films antimicrobianos elaborados con diferentes antimicrobianos a nivel de laboratorio e industrial se llevó a cabo mediante ensayos *in vitro* y de inoculación (*challenge test*), utilizando un cóctel con las 4 cepas de *L. monocytogenes* proporcionadas por el INIA. Para los ensayos en jamón curado loncheado, los cultivos se adaptaron al frío 4 días a 8°C hasta alcanzar la fase estacionaria y se mezclaron para conseguir una concentración de  $10^6$  ufc/g.

Los films a escala de laboratorio se elaboraron en base a una matriz plástica biodegradable de polivinilalcohol (PVOH) al 13% p/v, a la cual se adicionaron por separado los antimicrobianos, enterocina A (extracto purificado por intercambio iónico CM Sephadex<sup>TM</sup> C-25, dializado y liofilizado) a razón de 9 µg/g (13.000 UA/g) y el LAE (etil-n<sub>6</sub>-lauroil-L-arginato) a partir de una preparación comercial Mirenat® (Vedeqsa, Grupo Lamirsa) a razón de 160-200 mg/kg en jamón curado. Los films industriales fueron preparados por una empresa del sector sobre plástico PRT (tereftalato de polietileno), al cual se adicionaron mediante la técnica del *coating* con un barniz en base a agua, los antimicrobianos nisina (Nisaplin, Larbus, 2,5%) (250 mg/kg), LAE (200 mg/Kg) y FARGO37 (un extracto crudo de un cultivo productor de pediocina de Activa Food Tech SA, Cornellà del Terri, Girona) (8 y 13%). Los films se mantuvieron envasados a temperatura ambiente hasta su uso.

La actividad antimicrobiana *in vitro* se realizó mediante el test de la gota en agar (Tagg et al, 1976. Bacteriological Reviews 40, 722-756) y según la Norma ISO22196 (2011).

Para estudiar el potencial antilisteria de los films activos en jamón curado se realizaron estudios de *challenge test*. Se utilizaron jamones curados comerciales con distinta actividad de agua 0,92; 0,89 y 0,92 que se lonchearon a 2 mm de grosor. El inóculo de *L.monocytogenes* se extendió sobre la loncha con un asa de Digralski hasta su adsorción, se colocó posteriormente el film antimicrobiano y se envasó al vacío en bolsas de PET/PE (estudios Graf) para el estudio de vida útil segura a 8°C y 12°C. Las muestras fueron analizadas en 10 puntos a lo larga de la vida útil considerada 6 meses. Cada uno de los puntos se muestreó por duplicado.

La a<sub>w</sub> se midió mediante el equipo Aqualab<sup>TM</sup> (serie 3, Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA). El pH se midió directamente con una sonda de penetración (52-32, Crison Instruments SA, Alella, Spain) conectada a un pH portátil (pH25, CRISON Instruments). Los recuentos de *L.monocytogenes* se realizaron en CLA (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England). La presencia/ausencia se realizó mediante enriquecimiento de la muestra en TSBYE a 37°C 48h y confirmación de la presencia del patógeno.

### VI.1.3 Resultados y Discusión

#### Evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico

Es destacable la relativa escasez de datos en relación a la prevalencia y niveles de *L. monocytogenes* en jamón curado, especialmente en comparación con la disponibilidad de información de otros tipos de productos cárnicos (e.g. fermentados, cocidos). Los datos disponibles en la literatura científica y los resultados de otros grupos de investigación involucrados en el proyecto Listeria cero, indican que los niveles de *L. monocytogenes* en jamón curado pueden considerarse relativamente bajos, tanto en términos de prevalencia como de concentración. Además, por sus características físico-químicas, el jamón curado no favorece el crecimiento de *L. monocytogenes*; al contrario, compromete la viabilidad del patógeno con efectos bactericidas dependientes de la a<sub>w</sub> y la temperatura de conservación. Cuanto menor es la a<sub>w</sub> del producto y más elevada es la temperatura de conservación (hasta temperatura ambiente), más intensa es la inactivación de *L. monocytogenes* durante la conservación del jamón curado loncheado envasado al vacío. Los resultados obtenidos indican que las diferentes tipologías de jamón curado y las condiciones de conservación ensayadas fueron listericidas además de listeriosáticas. Este efecto sugiere el potencial interés de diseñar y evaluar estrategias de minimización del riesgo orientadas a establecer unas condiciones favorables para la inactivación del patógeno en el producto acabado.

Según el modelo de evaluación cuantitativa de riesgo desarrollado, la probabilidad de contraer listeriosis por el consumo de jamón curado se estima muy bajo. Cuantitativamente se situaría en la categoría de

menor riesgo establecida en el estudio de la FDA/USDA (2003), *ca.* 1 caso por  $10^{15}$  raciones consumidas por la población sana.

La situación es notablemente diferente desde el punto de vista de cumplimiento de normativa, especialmente en mercados y sectores de requerimientos exigentes derivados de las políticas de tolerancia cero frente a la presencia de *L. monocytogenes*. En este caso el riesgo o probabilidad de que *L. monocytogenes* esté presente en jamón curado a niveles detectables no es despreciable. Para minimizar este riesgo los productores pueden valorar la aplicación de una variedad de estrategias centradas en la minimización de la contaminación (evitar y eliminar focos de contaminación) así como en la aplicación de tratamientos de letalidad.

### **Impacto del envasado activo antimicrobiano**

Los films antimicrobianos elaborados mediante la inclusión de la bacteriocina enterocina A o el surfactante LAE en base a PVOH licuado y fabricados a escala de laboratorio, mostraron actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *L.monocytogenes*. En films industriales con base de PET, sólo el que contenía LAE como recubrimiento (*coating*) presentó actividad antilisteria *in vitro*.

En jamón curado en lonchas, el envasado activo antimicrobiano con enterocina A fue el único que ejerció un efecto bactericida inmediato en jamón curado loncheado y envasado al vacío, reduciendo de forma inmediata los recuentos de *L.monocytogenes* en 1,5 logs. A los 17 días de conservación la reducción fue de 2 logs. Además el envasado antimicrobiano contribuyó a reducir la viabilidad de *L.monocytogenes* durante la vida útil del producto, aumentando en 2,4 veces la tasa de reducción de los recuentos del patógeno con respecto al producto jamón serrano control con una actividad de agua de 0,89. La enterocina A perteneciente al grupo de bacteriocinas IIa de las BAL está descrita como una de las más potentes del grupo de bacteriocinas anti-*Listeria*, definida por su menor concentración mínima inhibitoria (Eijsink et al., 1998. Applied and Environmental Microbiology 64, 3275-3281. Por el momento la enterocina A no está legislada como aditivo autorizado. Este tipo de envasado, por tanto, limitaría el riesgo asociado a la presencia de *L. monocytogenes* en jamón curado y podría ser considerado como tratamiento post-letalidad válido según los requerimientos de la Alternativa 1 para el control de *L. monocytogenes* según las directrices de la administración norteamericana (*Listeria rule*, 9 CFR 430.4). Ello permitiría al productor etiquetar su producto como “enhanced protection against *L.monocytogenes*”.

El envasado activo en base a PVOH que contenía LAE al máximo legal permitido (160 mg/kg de jamón curado) no registró una reducción inmediata de los recuentos de *L. monocytogenes* (<1 log) y por tanto no podría considerarse como tratamiento post-letalidad.

En estudios previos realizados por nuestro grupo investigador (Hereu et al., 2012, International Journal of Food Microbiology 154, 107-112), el comportamiento del patógeno en jamón curado fue similar al observado en este estudio y dependiendo de la actividad de agua (0,92 y 0,88). En estos productos, Hereu et al. (2012) observaron que la nisina directamente aplicada sobre el jamón curado loncheado ejerció una acción bactericida frente a *L. monocytogenes* de forma inmediata (-0,8 log reducción del patógeno en jamón curado de 0,92  $a_w$  y -1,24 log en el producto de 0,88) y siguió reduciendo los recuentos durante la vida útil, con una reducción total de -3 log al final del período de conservación. No obstante, los films de PVOH (13%) que contenían nisina a 200 AU/cm<sup>2</sup> no ejercieron un efecto significativo de reducción inmediata o a lo largo de la vida útil. Solo el producto con una mayor  $a_w$ , 0,92 consiguió a los 30 días de conservación una mayor reducción con respecto al control (Hereu et al., 2012). En este sentido, los films activos desarrollados en este proyecto con la enterocina A han sido mucho más eficaces para reducir los niveles de *L. monocytogenes*. La acción de los films con nisina realizados por Hereu et al (2012) a 60 días de conservación, serían comparables con los efectos observados en este estudio para los films activos con LAE-PVOH.

### VI.1.4 Conclusiones

La evaluación cuantitativa de riesgos desarrollada aporta evidencias científicas que avalan la seguridad del jamón curado en términos de salud pública, pudiéndose considerar un producto de muy bajo riesgo.

Sin embargo, en relación al cumplimiento normativo derivado de las políticas de tolerancia cero frente a la presencia de *L. monocytogenes*, la probabilidad de que el patógeno esté presente a niveles detectables no es despreciable. Por ello se deberían diseñar estrategias de minimización del riesgo centradas en evitar y eliminar los focos de contaminación, así como en la aplicación de tratamientos de letalidad.

El envasado activo elaborado a escala de laboratorio, se mostró muy prometedor como estrategia para la minimización del riesgo con respecto a *L.monocytogenes* en jamón curado, en especial con el antimicrobiano enterocina A. Aunque la enterocina A no está aprobada como aditivo alimentario, se presenta como una potencial alternativa per permitiría a los operadores económicos adoptar la Alternativa 1 de control de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado.

En los films a nivel industrial sería necesario mejorar la capacidad de interacción entre el antimicrobiano contenido en el envase activo y el producto para ejercer su actividad antimicrobiana.

### VI.1.5 Financiación

INIA-Servicio de asistencia técnica para estudios científicos sobre la *L.monocytogenes* del jamón curado. Expediente PA14/83 Lote 2 (2014-2016). “Caracterización de las fuentes de contaminación de *Listeria monocytogenes* en las industrias cárnicas e inactivación durante el proceso de elaboración del jamón curado. Evaluación del riesgo”. IP. IRTA: S. Bover-Cid.

Convenio de colaboración entre IRTA, ASICI e INTERPORC para desarrollar actividades en el marco del proyecto Listeria cero (2014-2016). “Evaluación de sistemas de eliminación de *L.monocytogenes* en instalaciones y productos mediante distintas estrategias (agua electrolizada, fagos y bioconservantes)”. IP IRTA: T. Aymerich. Coordinador: M. Medina (INIA).

Otros proyectos financiados relacionados con la temática de la Red Consolider SEGURPREDICT. INIA RTA2012-00030-00. (2013-2016). “Seguridad microbiológica en productos cárnicos cocidos listos para el consumo y mejorados nutricionalmente y/o tratados por altas presiones a través de la microbiología predictiva y la evaluación cuantitativa del riesgo”. IP. S.Bover-Cid

EFSA TENDER GP/EFSA/CONTAM/2013/03. (2013-2015). “Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in food “Grupos participantes: RIKILT – Wageningen UR, Wageningen, the Netherlands (coordinador), Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany, IRTA, Spain.

EFSA TENDER OC/EFSA/BIOCONTAM/2014/02. (2014-2016).“Closing gaps for performing a risk assessment on *L. monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: activity 2, a quantitative risk characterization on *L. monocytogenes* in RTE foods; starting from the retail stage”.UCO-IRTA, Coordinador: U. Córdoba (F. Perez Rodríguez). (IP IRTA: S-Bover-Cid)

EFSA TENDER (NP/EFSA/BIOCONTAM/2015/04). (2015-2016). “Closing gaps for performing a risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: activity 1, an extensive literature search and study selection with data extraction on *L. monocytogenes* in a wide range of RTE food” IRTA-UCO. Coordinador IRTA (S-Bover-Cid).

## VI.2 Producción científica más relevante

### VI.2.1 Artículos en revistas científicas

Garriga, M., Rubio, R., Aymerich, T., Ruas-Madiedo, P. 2015. Potentially probiotic and bioprotective lactic acid bacteria starter cultures antagonise the *Listeria monocytogenes* adhesion to HT29 colonocyte-like cells. *Beneficial Microbes* 6(3):337-343

Jofré, A., Aymerich, T., Garriga, M. 2015. Impact of different cryoprotectants on the survival of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei/paracasei* during long-term storage. *Beneficial Microbes* 6(3):381-386

Bover-Cid, S., Belletti, N., Aymerich, T., Garriga, M. 2015. Modeling the protective effect of  $a_w$  and fat content on the high pressure resistance of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham. *Food Research International*, 75,194-199.

Bover-Cid, Belletti, Aymerich T, Garriga M. 2016. Modelling the impact of water activity and fat content of dry-cured ham on the reduction of *Salmonella enterica* por alta presión hidrostática. *Meat Science* <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.09.014>

Latorre-Moratalla, M.L., Comas-Basté, O., Bover-Cid, S., Vidal-Carou, M.C. 2016. Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. *Food and Chemical Toxicology* 99:78-85.

### VI.2.2 Artículos técnicos

Bover-Cid, S.; Jofré, A.; Guàrdia, M.D.; Latorre-Moratalla, M.L.; Garriga, M. (2015). Hábitos de consumo y conservación de los productos cárnicos cocidos. Información relevante para una correcta evaluación y gestión del riesgo. *Eurocarne* 236 :74-80

Bover-Cid, S.; Garriga, M.; Aymerich, T. (2015). Manual de seguretat alimentària del sector carni porcí: com gestionar els principals perills [On Line]. Butlletí de l'Agència Catalana de Seguretat Alimentària. <<http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir3507/doc36228.html>> [Consulta: 6 octubre 2015]

Jofré, A., Bover-Cid, S (2015). Impacte de la reducció de sal en la vida útil segura dels productes carnis cuits El web del sector carni porcí (<https://www.carndeporc.cat>). Barcelona. On line publication: 19/01/2015

Jofré, A.; Bover-Cid, S. (2015) Recursos para la validación del procesado de alimentos mediante nuevas tecnologías (1) *Cárnica*2000 374:12-17

Jofré, A.; Bover-Cid, S. (2015) Validación del procesado por altas presiones (2). Caso práctico: jamón curado destinado a exportación a Estados Unidos. *Cárnica* 2000, 375:10-12

Aymerich T. (2016). Alternatives de descontaminació de canals porcines en escorxadors. Web del sector carni porcí (<https://www.carndeporc.cat>). Barcelona. On line publication: 20/06/2016

Bover-Cid, S., Jofré, A. Impacto de la temperatura de refrigeración en la vida útil y la seguridad de la carne de cerdo. La web de la carne de cerdo (<https://www.carne.3tres3.com>). Barcelona. On line publication: 29/03/2016

Castellari, M. Perills abiòtics en els productes carnis porcins. Web del sector carni porcí (<https://www.carndeporc.cat>). Barcelona. On line publication: 28/02/2016

Castellari, M., Picouet, P. Perills físics en els productes carnis porcins. Web del sector carni porcí (<https://www.carndeporc.cat>). Barcelona. On line publication: 23/05/2016.

- Garriga, M; Jofré, A. Embotis fermentats com a font de probiòtics? Web del sector carni porcí (<https://www.carndeporc.cat>). Barcelona. On line publication: 11/04/2016
- Jofré, A., Bover-Cid, S. Higienització del pernil curat llescat a través del processat per altes pressions. Validació del procés. Web del sector carni porcí (<https://www.carndeporc.cat>). Barcelona. On line publication: 09/05/2016
- Jofré, A., Bover-Cid, S. La “quarantena” com a mesura de control adicional per a la gestió del risc de Salmonella en productes carnis crus-curats. Web del sector carni porcí (<https://www.carndeporc.cat>). Barcelona. On line publication: 28/11/2016
- Jofre, A., Garriga, M. Bover-Cid, S. Estrategias para la gestión del riesgo asociado a *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado (2016) Eurocarne 251:53-57
- Castellari, M., Hortós, M. Residus d'antibiòtics i altres medicaments veterinaris en productes carnis porcins Web del sector carni porcí (<https://www.carndeporc.cat>). Barcelona. On line publication: 16/01/2017
- Castellari, M., Picouet, P. Peligros físicos en los productos cárnicos porcinos. La web de la carne de cerdo (<https://www.carne.3tres3.com>). Barcelona. On line publication: 16/01/2017
- Jofré, A., Bover-Cid, S. Higienización del jamón curado en lonchas a través del procesado por altas presiones. Validación del proceso (<https://www.carne.3tres3.com>). Barcelona. On line publication: 08/05/2017
- Castellari, M., Hortós, M. Peligros químicos en los productos cárnicos porcinos (<https://www.carne.3tres3.com>). Barcelona. On line publication: 23/05/2017
- Garriga, M. y Jofré, A. Sacar partido a las bacterias del ácido láctico en embutidos fermentados (2017) *Cárnica* 2000 388:28-34

### OTROS

- Mulder PPJ, López Sánchez P, These A, Preiss-Weigert A and Castellari M. (2015). Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in food. EFSA supporting publication 2015: EN-859, 114 pp. <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/859e>
- Jofré, A, Garriga, M, Aymerich, T, Pérez-Rodríguez, F, Valero, A, Carrasco, E, Bover-Cid, S. (2016) Closing gaps for performing a risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: activity 1, an extensive literature search and study selection with data extraction on *L. monocytogenes* in a wide range of RTE food (DOI: 10.2903/sp.efsa.2016.EN-1141) EFSA Supporting Publications:13 (12) pp184
- Pérez-Rodríguez, F, Carrasco, E, Bover-Cid, S, Jofré, A, Valero, A. 2017. Closing gaps for performing a risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: activity 2, a quantitative risk characterization on *L. monocytogenes* in RTE foods; starting from the retail stage. EFSA supporting publication 2017:EN-1252. 211pp.doi:10.2903/sp.efsa.2017.EN-1252

### VI.2.3 Capítulos de libro

- Garriga, M., Aymerich, T. (2015) The microbiology of fermentation and ripening. *In* Toldrá (editor). Handbook of fermented meat and poultry. 2<sup>nd</sup> edition. pp 107-115. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, West Sussex (UK).

Vidal-Carou, M.C., Teresa Veciana-Nogues, M., Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S. (2015) Biogenic Amines: Risks and Control. In Toldrá (editor). Handbook of fermented meat and poultry. 2nd edition. pp 413-428. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, West Sussex (UK).

Jofré, A.; Serra, X. (2016) Processing of Meat Products Utilizing High Pressure (p. 591-623). In High Pressure Processing of Food. Principles, Technology and Applications. Edited by Balasubramaniam, V.M., Barbosa-Cánovas, Gustavo V., Lelieveld, Huub L.M. ISBN 978-1-4939-3233-7. Springer-Verlag New York.

## VI.3 Congresos, Jornadas y Reuniones

### VI.3.1 Ponencias invitadas

Aymerich, T. Inici d'estudi sobre alternatives de descontaminació de canals. Certificació voluntària del control de salmonel·losi en escorxadors de porcí. Jornada Tècnica FIC. Vic, 4/5/2015

Aymerich, T. Optimització de la gestió de l'aigua mitjançant alternatives de descontaminació de canals porcines en escorxadors. Jornada INNOVACC. Monells 6/5/2015

Bover-Cid, S. & Garriga, M. Estudios de vida útil comercial y segura. El "challenge test" como herramienta clave. Ponencia en V Jornadas Calidad y Seguridad Alimentaria. ANALIZA Calidad. BCIN-Badalona, 15/10/2015.

Bover-Cid, S. Vida útil segura: reto emergente para la industria alimentaria II XII congreso de AECOC de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Mejorando el futuro, trabajando el presente. Madrid, 5/03/2015

Bover-Cid, S. Alimentos seguros hasta el consumo: el papel de los estudios de vida útil y la microbiología predictiva. II Congreso Canario de Seguridad Alimentaria. Organizado por el Colegio oficial de Veterinarios de Las Palmas. Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias, 13-14/11/2015.

Bover-Cid, S. ¿Cuáles son las tendencias y qué implica en nutrición, inocuidad, tecnologías relacionadas y futuro? Perspectivas y desafíos. IV Cumbre i III Expo Internacional Inofood, Santiago de Chile (Chile), 5-6/10/2015

Bover-Cid, S. Altas presiones y bioconservación como estrategia para el control de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumir. IV Cumbre i III Expo Internacional Inofood, Santiago de Chile (Chile), 5-6/10/2015

Bover-Cid, S. Inocuidad microbiológica ante cambios en ingredientes críticos. IV Cumbre i III Expo Internacional Inofood, Santiago de Chile (Chile), 5-6/10/2015

Bover-Cid, S. Recursos para evaluar y validar el impacto de nuevas tecnologías en la seguridad microbiológica de los alimentos. IV Cumbre i III Expo Internacional Inofood, Santiago de Chile (Chile), 5-6/10/2015

Castellari, M. Experiències en investigació i transferència. A: "Els antimicrobians: ús responsable a les granges". Organitzat per COVB (Col·legi Oficial de Veterinaris de Barcelona) i PORCAT. Barcelona, 29/05/ 2015

Castellari, M. MUSE-Tech: MULti SEnsor Technology for management of food processes. A: ANUGA FOOD TEC 2015, Forum 12 - EU funded food research projects. Cologne (Germany), 23/05/2015

Jofré, A. Áreas de procesado y equipamiento ¿una asignatura pendiente? II Congreso Canario de Seguridad Alimentaria. Organizado por el Colegio oficial de Veterinarios de Las Palmas. Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias, 13-14/11/2015.

Jofré, A., Aymerich, T., Garriga, M. Probiotic fermented sausages: Mith or reality? En: International 58th Meat Industry Conference “Meat Safety and Quality: Where it goes?”. Procedia Food Science 5 (2015):133-136. Zlatibor (Serbia). 4-7/10/2015.

Bover, S. Parlem de la vida útil a través de la microbiología predictiva. I Jornada interactiva de la indústria de la carn a Catalunya. Caldes de Montbui, 9/2/2016

Garriga, M. Perills biòtics: Reptes del present i futur en seguretat alimentària. I Jornada interactiva de la indústria de la carn a Catalunya. Caldes de Montbui, 9/2/2016

Bover, S. Estàndards per a la garantia de qualitat i seguretat microbiològica dels aliments tractats tèrmicament. Jornada tècnica. Aspectes clau dels tractaments tèrmics dels aliments. Monells, 9/06/2016

Garriga, M. Peligros biològics emergentes. Jornada “Soluciones para la detección rápida de microorganismes emergentes y biofilms”. Vic, 9/6/2016

Bover-Cid, S; Jofré, A; Garriga M. Estudios de vida útil: procedimientos al alcance de la industria alimentaria. XX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Retos y Avances en Microbiología de los Alimentos 2016. León, 14-16/09/2016

Bover-Cid, S; Jofré, A, Aymerich, T & Garriga M. Emerging non-thermal technologies to improve food safety. Case study: high pressure processing and biopreservation of meat products. 5th IUMS outreach programme on Food Safety and Mycotoxins. Yogyakarta (INDONESIA) 19-20/01/2017.

Bover-Cid, S; Jofré, A & Garriga M. Resources to assess and validate the impact of new preservation technologies as control measures in food industry. 5th IUMS outreach programme on Food Safety and Mycotoxins. Yogyakarta (INDONESIA) 19-20/01/2017.

Bover-Cid, S. Understanding the Behavior of *Listeria monocytogenes* in high pressure processed meat products: resources for process validation. IAFP European Symposium. S16. Ensuring Food Safety of Meat Products by Use of High Pressure Processing (HPP): From Recent Research Initiatives to Commercial Developments. Bruselas (BÉLGICA). 28-31/03/2017.

Bover-Cid, S. Herramientas útiles para la simplificación de la gestión del riesgo en jamón curado. IX Congreso Mundial del Jamón Curado. Toledo, junio 2017

### **VI.3.2 Actividades de organización de Congresos, Jornadas y Reuniones**

25<sup>th</sup> International ICFMH Symposium, Food Micro 2014: Food microbiology meets One Health  
Dublín (Irlanda), 2016

Miembro del Comité Organizador (Sara Bover)

10<sup>th</sup> International Conference on Predictive Modeling of Food (ICPMF10)  
Córdoba, Spain, 26-29 septiembre 2017

Miembro del Comité Organizador (Sara Bover)

3<sup>rd</sup> International Symposium on Fermented Meat  
Clermont –Ferrand (Francia), 27-29 de septiembre 2017  
Miembro del Comité Organizador (Teresa Aymerich)



## Capítulo VII. Inactivación de *Listeria monocytogenes* en jamón curado mediante tratamientos de bioconservación y altas presiones

R. Montiel, A. Pérez-Baltar, A. Serrano, D. Bravo, M. Medina

*Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA, Carretera de la Coruña km 7, 28040 Madrid.*

### VII.1 Desarrollos en investigación

#### VII.1.1 Introducción

*Listeria monocytogenes* es posiblemente el patógeno que más preocupa tanto a la industria como a los consumidores. Es una bacteria ubicua común en el ambiente de las industrias agroalimentarias y en maquinaria y utensilios insuficientemente higienizados. Puede multiplicarse en distintos tipos de alimentos incluso cuando se almacenan a temperaturas de refrigeración ( $<5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y es tolerante a condiciones de estrés que dificultan o impiden el crecimiento de otras bacterias. Puede persistir en el ambiente e instalaciones durante largos periodos debido a su capacidad de formar biofilms y resistir a la limpieza y desinfección.

*L. monocytogenes* causa listeriosis, una enfermedad de relativamente baja morbilidad pero con una elevada tasa de mortalidad. El 99% de los casos de listeriosis se asocian al consumo de alimentos contaminados, fundamentalmente alimentos listos para el consumo (RTE, del inglés ready-to-eat). Los últimos datos de la UE (EFSA 2016; EFSA Journal 14, 4634) indican 2206 casos de listeriosis en la UE durante el año 2015 y 270 muertes, con una tasa de 0.46 casos por cada 100000 habitantes, y una tendencia al aumento en el periodo 2008-2015.

La contaminación de los productos cárnicos en las plantas de procesado se atribuye principalmente a cepas de *L. monocytogenes* presentes en el ambiente que pueden llegar al producto durante el deshuesado, loncheado, envasado, etc. El Reglamento (CE) 1441/2007 establece un máximo de 100 ufc/g durante la vida útil de los productos no destinados a la población de riesgo. En otros países, como EEUU, el criterio de seguridad alimentaria para *L. monocytogenes* en alimentos RTE es de tolerancia cero (ausencia en 25 g). Esta política dificulta la exportación de productos cárnicos curados.

El jamón curado es considerado un alimento seguro gracias a las distintas barreras del proceso de elaboración que, en combinación, no permiten el crecimiento de patógenos como *L. monocytogenes*. Las más importantes son las sales añadidas durante el procesado que, entre otros efectos, disminuyen la actividad de agua ( $a_w$ ). Sin embargo, estos parámetros no son suficientes para la completa eliminación del patógeno cuando existe riesgo de contaminación por una manipulación incorrecta. Las altas presiones hidrostáticas (APH) y los tratamientos de bioconservación se emplean en el control post-proceso de patógenos en alimentos RTE. Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas y los aceites esenciales son bioconservantes considerados seguros. Con la combinación de APH y bioconservantes puede lograrse un efecto antimicrobiano superior que permitiría reducir la intensidad de los tratamientos.

Nuestro objetivo ha sido evaluar la actividad combinada de la APH con un extracto de enterocinas A y B o con timol en jamón curado loncheado contaminado con *L. monocytogenes* y conservado a 4 °C (temperatura de refrigeración) y a 12 °C (condiciones de abuso de temperatura) durante 30 d.

### VII.1.2 Metodología

Inoculación de *L. monocytogenes*: Las muestras de jamón curado loncheado se inocularon con una mezcla de 4 cepas de *L. monocytogenes* procedentes de una industria cárnica (Ortiz et al., 2010; Foodborne Pathog. Dis. 7, 1177-1184) antes de aplicar los tratamientos. Se prepararon muestras control sin inocular. Las muestras se dividieron en 6 grupos: control (no tratado), ENT (con enterocinas A y B), TIM (con timol), APH (con altas presiones), ENT+APH (con enterocinas A y B y altas presiones) y TIM+APH (con timol y altas presiones).

Tratamientos de bioconservación: Como productor de enterocinas A y B se utilizó la cepa *Enterococcus faecium* INIA TAB7 (Rodríguez et al., 2000; Int. Dairy J. 10, 7-15). Se preparó un extracto de enterocinas A y B que se añadió a la superficie del jamón a una concentración de 1054 UA/g. El timol se preparó en forma de extracto acuoso (125 mg/ml) y se añadió a una concentración de 1.25 mg/g.

Tratamientos de APH: Las muestras de jamón curado se presurizaron a 450 MPa durante 10 min en las instalaciones de Hiperbaric (Burgos).

Análisis: Se efectuaron las siguientes determinaciones: *L. monocytogenes* en CHROMagar *Listeria* (37 °C/48 h); microorganismos totales (TVC) en Plate Count Agar (30 °C/72 h); pH con un pH-metro Crison GLP22; la actividad de agua con un Aqualab Series 3 (Decagon); el color con un Chromometer CM-700 d (Konica Minolta) y la textura con un Instron 4301 (Instron) con una cuchilla Warner-Bratzler.

Los análisis microbiológicos se realizaron los días 1, 7, 15 y 30 después de la aplicación de los tratamientos. El resto de análisis, los días 1, 15 y 30.

Se realizaron dos ensayos independientes con muestras duplicadas y los resultados se analizaron mediante ANOVA y el test de Tuckey con el software SPSS Statistics 22.0.

### VII.1.3 Resultados y Discusión

Los niveles iniciales de *L. monocytogenes* en jamón control fueron de 6.60 y 6.67 log ufc/g a 4 y 12 °C, respectivamente. Un día después de la aplicación de los tratamientos, se registró con ENT una reducción de 2.54 y 2.95 unidades logarítmicas a 4 y 12 °C, respectivamente, mientras que el efecto antimicrobiano del TIM o las APH fue menor. La actividad de las APH se incrementó significativamente en combinación con ENT, con valores de *L. monocytogenes* 4.38 y 5.25 unidades logarítmicas inferiores al control, a 4 y 12 °C. Durante la refrigeración se comprobó un ligero descenso de los niveles del patógeno en jamón control y en el tratado con TIM o APH, y un incremento con ENT. El efecto antimicrobiano de la combinación ENT+APH fue sinérgico, consiguiendo reducciones de aproximadamente 3 unidades logarítmicas con respecto al control sin inocular al final del almacenamiento a las dos temperaturas. (Tabla 1).

Las enterocinas A y B del cultivo de *E. faecium* redujeron los niveles de *L. monocytogenes* en jamón curado más de 2 unidades logarítmicas, incluso en condiciones de abuso de temperatura de refrigeración. La actividad sinérgica de distintas bacteriocinas en combinación con APH ha sido demostrada con nisina en jamón cocido (Hereu et al., 2012; Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 16, 305-315) y con otras bacteriocinas en productos lácteos (Arqués et al., 2005; Int. Dairy J. 15, 893-900) y salmón ahumado (Montiel et al., 2013; J. Food Prot. 76, 1465-1465).

**Tabla 1. *L. monocytogenes* (log ufc/g) en jamón curado loncheado tratado con enterocinas A y B (ENT), timol (TIM), altas presiones (APH) y sus combinaciones**

		1 d	7 d	15 d	30 d
4 °C	Control	6.60 ± 0.11 <sup>dB</sup>	6.61 ± 0.05 <sup>eB</sup>	6.35 ± 0.03 <sup>dA</sup>	6.29 ± 0.03 <sup>dA</sup>
	ENT	4.06 ± 0.23 <sup>bA</sup>	3.67 ± 0.07 <sup>bA</sup>	4.88 ± 0.42 <sup>bB</sup>	4.21 ± 0.38 <sup>bA</sup>
	TIM	5.94 ± 0.05 <sup>cC</sup>	5.92 ± 0.11 <sup>cdBC</sup>	5.68 ± 0.03 <sup>cA</sup>	5.77 ± 0.11 <sup>cdAB</sup>
	APH	6.15 ± 0.06 <sup>cB</sup>	6.12 ± 0.12 <sup>dB</sup>	5.81 ± 0.09 <sup>cA</sup>	6.01 ± 0.05 <sup>dB</sup>
	ENT+APH	2.22 ± 0.38 <sup>aA</sup>	1.89 ± 0.16 <sup>aA</sup>	2.91 ± 0.39 <sup>aA</sup>	2.80 ± 1.44 <sup>aA</sup>
	TIM+APH	5.96 ± 0.01 <sup>cC</sup>	5.68 ± 0.21 <sup>cB</sup>	5.66 ± 0.05 <sup>cB</sup>	4.99 ± 0.11 <sup>bcA</sup>
12 °C	Control	6.67 ± 0.16 <sup>dB</sup>	6.53 ± 0.18 <sup>eAB</sup>	6.57 ± 0.04 <sup>dAB</sup>	6.33 ± 0.02 <sup>dA</sup>
	ENT	3.72 ± 0.24 <sup>bA</sup>	3.69 ± 0.06 <sup>bA</sup>	4.27 ± 0.27 <sup>bB</sup>	4.38 ± 0.33 <sup>bB</sup>
	TIM	6.09 ± 0.07 <sup>cdC</sup>	5.98 ± 0.03 <sup>dB</sup>	5.79 ± 0.14 <sup>cdAB</sup>	5.57 ± 0.16 <sup>cA</sup>
	APH	6.06 ± 0.05 <sup>cdA</sup>	5.85 ± 0.22 <sup>dA</sup>	5.96 ± 0.08 <sup>cdA</sup>	5.90 ± 0.12 <sup>cdA</sup>
	ENT+APH	1.42 ± 0.60 <sup>aA</sup>	1.75 ± 0.64 <sup>aA</sup>	2.13 ± 1.17 <sup>aA</sup>	3.25 ± 0.02 <sup>aA</sup>
	TIM+APH	5.48 ± 0.48 <sup>cAB</sup>	5.20 ± 0.21 <sup>cAB</sup>	5.53 ± 0.15 <sup>cB</sup>	4.88 ± 0.27 <sup>bA</sup>

Valores en la misma columna con diferente minúscula difieren significativamente ( $P < 0.05$ ) para una temperatura dada. Valores en la misma fila con diferente mayúscula difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

Los microorganismos totales experimentaron un ligero crecimiento en el jamón control almacenado a 4 °C, mientras que a 12 °C aumentaron más de 2 unidades logarítmicas. En el jamón tratado con ENT y TIM no se registraron diferencias con respecto al control durante el periodo de almacenamiento estudiado. Las APH, individualmente o en combinación con timol, mantuvieron los TVC por debajo de 3 unidades logarítmicas durante 30 y 15 d a 4 y 12 °C, respectivamente. El tratamiento combinado de ENT+APH redujo significativamente ( $P < 0.01$ ) los TVC y mantuvo sus niveles por debajo de 2 unidades logarítmicas durante todo el periodo estudiado a ambas temperaturas. Esta combinación podría aplicarse para extender la vida útil del jamón curado loncheado incluso en condiciones de abuso de temperatura (Tabla 2).

El pH del jamón control a las 24 horas del tratamiento fue de 5.74 y 5.54 a 4 y 12 °C, respectivamente, y se situó entre 5.55 y 5.76 en las muestras tratadas con ENT, TIM, APH y sus combinaciones. Durante el almacenamiento, el pH se mantuvo bastante estable en jamón control y aumentó ligeramente, con valores entre 5.71 y 5.93, en las muestras tratadas. Este incremento de pH en jamón curado presurizado se ha atribuido a desnaturalización de proteínas o a pérdida de protones por el tratamiento (Marcos et al., 2008; Food Control 19, 76-81). La  $a_w$  en jamón control a las 24 h fue de 0.873 y 0.868 a 4 y 12 °C, respectivamente, y únicamente las muestras tratadas con TIM+APH presentaron valores más altos ( $P < 0.05$ ) respecto al control sin tratar. Los valores de este parámetro se mantuvieron durante el periodo de almacenamiento a 4 y 12 °C, siendo más altos en las muestras tratadas a los 30 d (0.871-0.882). Sin embargo, las diferencias respecto al control no superaron cifras de 0.012 y 0.008 a 4 y 12 °C (valores no mostrados).

**Tabla 2. Microorganismos totales (log ufc/g) en jamón curado loncheado tratado con enterocinas A y B (ENT), timol (TIM), altas presiones (APH) y sus combinaciones**

		1 d	7 d	15 d	30 d
4 °C	Control	2.70 ± 0.31 <sup>bcA</sup>	3.49 ± 0.07 <sup>cA</sup>	3.15 ± 0.30 <sup>bA</sup>	3.42 ± 0.68 <sup>bA</sup>
	ENT	3.08 ± 0.10 <sup>bcA</sup>	3.59 ± 0.13 <sup>cb</sup>	3.35 ± 0.25 <sup>bAB</sup>	3.63 ± 0.12 <sup>bB</sup>
	TIM	3.47 ± 0.08 <sup>cA</sup>	3.32 ± 0.07 <sup>cA</sup>	3.52 ± 0.49 <sup>bA</sup>	3.79 ± 0.36 <sup>bA</sup>
	APH	2.23 ± 1.06 <sup>cbA</sup>	2.08 ± 0.15 <sup>bA</sup>	2.49 ± 0.58 <sup>abA</sup>	2.36 ± 0.57 <sup>aA</sup>
	ENT+APH	< 1.00 <sup>aA</sup>	< 1.00 <sup>aA</sup>	1.85 ± 0.00 <sup>ab</sup>	2.03 ± 0.05 <sup>aC</sup>
	TIM+APH	2.20 ± 0.17 <sup>bA</sup>	2.54 ± 0.62 <sup>bA</sup>	1.76 ± 0.40 <sup>aA</sup>	2.00 ± 0.00 <sup>aA</sup>
12 °C	Control	3.48 ± 0.42 <sup>cA</sup>	3.19 ± 0.48 <sup>cdA</sup>	5.02 ± 0.17 <sup>cb</sup>	5.46 ± 0.08 <sup>dB</sup>
	ENT	3.26 ± 0.07 <sup>bcA</sup>	3.96 ± 0.28 <sup>dB</sup>	4.99 ± 0.09 <sup>cC</sup>	5.04 ± 0.05 <sup>dC</sup>
	TIM	2.96 ± 0.25 <sup>bcA</sup>	4.08 ± 0.02 <sup>dB</sup>	4.65 ± 0.18 <sup>cC</sup>	5.34 ± 0.09 <sup>eD</sup>
	APH	1.59 ± 0.83 <sup>aA</sup>	1.59 ± 0.83 <sup>abA</sup>	2.04 ± 0.06 <sup>bA</sup>	3.84 ± 0.00 <sup>cA</sup>
	ENT+APH	2.42 ± 0.51 <sup>abB</sup>	< 1.00 <sup>aA</sup>	< 1.00 <sup>aA</sup>	1.77 ± 0.10 <sup>aAB</sup>
	TIM+APH	3.00 ± 0.34 <sup>bcAB</sup>	2.45 ± 0.17 <sup>bcA</sup>	2.34 ± 0.54 <sup>bA</sup>	3.58 ± 0.07 <sup>bB</sup>

TVC (0 h) 3.10 log ufc/g. Valores en la misma columna con diferente minúscula difieren significativamente (P<0.05) para una temperatura dada. Valores en la misma fila con diferente mayúscula difieren significativamente (P<0.05).

Los tratamientos de inactivación ensayados afectaron ligeramente al color del jamón curado. El valor de  $L^*$  no sufrió modificaciones en el producto a 4 °C, mientras que en las muestras presurizadas y conservadas a 12 °C se registró un aumento significativo (P<0.05) a los 30 d. El valor de  $a^*$  fue inferior (P<0.05) únicamente en el jamón tratado a los 30 d a 12 °C. El valor de  $b^*$  fue superior (P<0.05) en las muestras de 30 d y 4 °C cuando se añadió timol, y disminuyó (P<0.05) en las muestras presurizadas y mantenidas a 12 °C. El efecto de las APH en el color se relaciona con la intensidad del tratamiento, el valor de  $a^*$  desciende con el aumento de la presión, especialmente por encima de los 400 MPa (De Alba et al., 2013; Food Control 31, 508-513; Fuentes et al., 2010; Meat Sci. 85, 506-514), aunque el curado confiere una mayor estabilidad del color (Serra et al., 2007; Meat Sci. 75, 21-28) por el efecto protector del óxido nítrico que previene la oxidación de la mioglobina. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, los cambios en el color del jamón curado tratado apenas afectaron al aspecto visual del producto.

La textura del jamón resultó ligeramente modificada por los tratamientos. A 4 °C no se detectaron diferencias significativas en la fuerza al corte entre las muestras tras aplicar los tratamientos ni durante el periodo de conservación. A 12 °C, la fuerza al corte fue superior (P<0.05) en el jamón presurizado tras la aplicación del tratamiento, pero el valor fue disminuyendo durante la conservación de forma que no se observaron diferencias significativas entre las muestras a los 30 d. De acuerdo con nuestros resultados, la fuerza al corte aumentó con la APH a 450 MPa durante 10 min descendiendo durante la refrigeración, y el resto de los tratamientos apenas modificó la textura del jamón curado. En la Tabla 3 se recogen los datos de color (valor  $L^*$ ) y textura durante la conservación del producto.

**Tabla 3. Color ( $L^*$ ) y textura (fuerza al corte, N) en jamón curado loncheado tratado con enterocinas A y B (ENT), timol (TIM), altas presiones (APH) y sus combinaciones**

			1 d	15 d	30 d
$L^*$	4 °C	Control	34.18 ± 6.84 <sup>aA</sup>	36.47 ± 5.38 <sup>aA</sup>	35.01 ± 4.86 <sup>aA</sup>
		ENT	39.36 ± 5.16 <sup>aA</sup>	35.43 ± 4.98 <sup>aA</sup>	38.57 ± 6.80 <sup>aA</sup>
		TIM	36.85 ± 4.95 <sup>aA</sup>	34.67 ± 5.79 <sup>aA</sup>	36.93 ± 4.53 <sup>aA</sup>
		APH	37.12 ± 5.32 <sup>aA</sup>	36.52 ± 5.39 <sup>aA</sup>	37.78 ± 5.71 <sup>aA</sup>
		ENT+APH	38.04 ± 5.87 <sup>aA</sup>	38.03 ± 5.60 <sup>aA</sup>	39.45 ± 6.33 <sup>aA</sup>
		TIM+APH	38.76 ± 6.34 <sup>aA</sup>	36.93 ± 6.95 <sup>aA</sup>	38.93 ± 6.52 <sup>aA</sup>
	12 °C	Control	37.72 ± 5.80 <sup>aA</sup>	36.53 ± 6.65 <sup>aA</sup>	36.69 ± 6.77 <sup>aA</sup>
		ENT	35.69 ± 5.79 <sup>aA</sup>	32.82 ± 7.30 <sup>aA</sup>	37.20 ± 4.17 <sup>aA</sup>
		TIM	34.79 ± 4.97 <sup>aA</sup>	34.31 ± 5.68 <sup>aA</sup>	39.54 ± 3.80 <sup>abB</sup>
		APH	38.23 ± 6.09 <sup>aAB</sup>	36.86 ± 7.54 <sup>aA</sup>	42.19 ± 4.93 <sup>bB</sup>
		ENT+APH	38.69 ± 5.70 <sup>aA</sup>	36.10 ± 6.44 <sup>aA</sup>	39.53 ± 4.25 <sup>abA</sup>
		TIM+APH	38.87 ± 6.09 <sup>aA</sup>	36.40 ± 7.80 <sup>aA</sup>	39.51 ± 5.95 <sup>abA</sup>
Fuerza al corte	4 °C	Control	47.07 ± 8.17 <sup>a</sup>	47.94 ± 15.10 <sup>a</sup>	46.49 ± 7.56 <sup>a</sup>
		ENT	42.81 ± 8.59 <sup>a</sup>	47.11 ± 10.79 <sup>a</sup>	42.98 ± 10.27 <sup>a</sup>
		TIM	41.77 ± 9.57 <sup>a</sup>	39.27 ± 10.00 <sup>a</sup>	45.17 ± 4.37 <sup>a</sup>
		APH	51.53 ± 12.54 <sup>a</sup>	52.92 ± 15.95 <sup>a</sup>	44.03 ± 10.65 <sup>a</sup>
		ENT+APH	39.97 ± 14.49 <sup>a</sup>	40.38 ± 11.57 <sup>a</sup>	43.33 ± 14.52 <sup>a</sup>
		TIM+APH	42.65 ± 10.89 <sup>a</sup>	43.63 ± 12.77 <sup>a</sup>	43.86 ± 12.92 <sup>a</sup>
	12 °C	Control	40.64 ± 11.65 <sup>ab</sup>	41.76 ± 10.06 <sup>a</sup>	40.21 ± 11.80 <sup>a</sup>
		ENT	39.70 ± 13.83 <sup>a</sup>	40.82 ± 12.45 <sup>a</sup>	45.51 ± 14.45 <sup>a</sup>
		TIM	35.19 ± 8.65 <sup>a</sup>	39.73 ± 6.68 <sup>a</sup>	38.73 ± 11.05 <sup>a</sup>
		APH	53.89 ± 12.40 <sup>b</sup>	51.14 ± 8.15 <sup>a</sup>	47.12 ± 8.48 <sup>a</sup>
		ENT+APH	40.06 ± 15.90 <sup>a</sup>	42.80 ± 11.77 <sup>a</sup>	43.06 ± 12.77 <sup>a</sup>
		TIM+APH	37.70 ± 7.04 <sup>a</sup>	42.11 ± 9.58 <sup>a</sup>	38.86 ± 12.86 <sup>a</sup>

Valores en la misma columna con diferente minúscula difieren significativamente ( $P < 0.05$ ) para una temperatura dada. Valores en la misma fila con diferente mayúscula difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

#### VII.1.4 Conclusiones

Se comprobó el potente efecto anti-*Listeria* de las enterocinas A y B en jamón curado almacenado en condiciones de refrigeración correcta (4 °C) y con abuso de temperatura (12 °C). El timol y los tratamientos con altas presiones hidrostáticas aplicados individualmente fueron menos eficaces.

La actividad antimicrobiana de los tratamientos combinados de enterocinas A y B y altas presiones hidrostáticas fue sinérgica, por lo que se considera su potencial interés en caso de contaminación durante el procesado del jamón curado. Las características físico-químicas, el color y la textura del producto apenas resultaron afectadas por el tratamiento.

### VII.1.5 Financiación

RTA2013-00070-C03-01 y CON13-079

### VII.1.6 Otras actividades de investigación

Dentro del proyecto Listeria 0 “*Listeria monocytogenes* en las industrias cárnicas: caracterización de la contaminación y medidas de control” se abordaron las siguientes actividades:

- Caracterización de la contaminación por *L. monocytogenes* en la industria cárnica
- Inactivación de *L. monocytogenes* en el proceso de elaboración del jamón curado
- Inactivación de *L. monocytogenes* por altas presiones en jamón curado deshuesado entero
- Evaluación del efecto baroprotector de la baja actividad de agua del jamón sobre *L. monocytogenes*
- Evaluación de la respuesta al estrés de *L. monocytogenes* tras los tratamientos. Efecto en los factores de virulencia

Dentro del proyecto RTA2010-00029 “Optimización y control de la calidad tecnológica, nutricional y organoléptica de jamones serranos e ibéricos” se llevaron a cabo las siguientes actividades

- Se determinó la influencia de la composición química sobre la fracción volátil del jamón Serrano, comprobándose que el contenido en grasa intramuscular afectaba a 37 de los 100 compuestos volátiles detectados frente a 28 compuestos afectados por la concentración de sal, 27 por la relación sal en magro y 19 por la actividad de agua.
- Se determinó la influencia de tratamiento de altas presiones hidrostáticas sobre la fracción volátil del jamón Serrano con 21 compuestos volátiles afectados después de 5 meses en refrigeración, de los cuales 9 disminuyeron y 12 aumentaron con el tratamiento.
- Se determinó la influencia de la composición química sobre la fracción volátil del jamón Ibérico, comprobándose que el contenido en grasa intramuscular afectaba a 14 de los 122 compuestos volátiles detectados frente a solamente 2 compuestos afectados por la concentración de sal, 0 por la relación sal en magro y 2 por la actividad de agua.
- Se determinó la influencia de tratamiento de altas presiones hidrostáticas sobre la fracción volátil del jamón Ibérico con 34 compuestos volátiles afectados después de 5 meses en refrigeración, de los cuales 23 disminuyeron y 11 aumentaron con el tratamiento.

Las actividades arriba indicadas fueron realizadas por los siguientes miembros del grupo de investigación: R. Montiel, A. Pérez-Baltar, A. Serrano, D. Bravo, M. Medina, P. Gaya, S. Ortiz, J.V. Martínez, A. Peirotn, M. Nuñez, A. Picón, N. Martínez-Onandi, A. del Olmo, J. Calzada, J.L. Arqués, E. Rodríguez, I. Martín-Cabrejas.

## VII.2 Producción científica más relevante

### VII.2.1 Artículos en revistas científicas

Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., Medina, M. 2015. Reuterin, lactoperoxidase, lactoferrin and high hydrostatic pressure on the inactivation of food-borne pathogens in cooked ham. *Food Control*, 51, 122-128.

- De Alba, M., Bravo, D., Medina, M. 2015. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in dry-cured ham by combined treatments of high pressure and the lactoperoxidase system or lactoferrin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 31, 54-59.
- López-Alonso, V., Ortiz, S., Martínez-Suárez, J.V. 2015. Genome sequences of five disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two Iberian pork-processing plants. *Genome Announcements* 5, 3 pii: e00077-15. doi:10.1128/genomeA.00077-15.
- Arqués, J.L., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J.M., Medina, M. 2015. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *BioMed Research International*, Article ID 584183, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/584183>
- Del Olmo, A., Calzada, J., Gaya, P., Nuñez M. 2015. Proteolysis and flavor characteristics of Serrano ham processed under different ripening temperature conditions. *Journal of Food Science*, 80, C2404-C2412.
- Ortiz, S., López-Alonso, V., Rodríguez, P., Martínez-Suárez, J.V. 2016. The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork-processing plants: evidence from comparative genome analysis. *Applied Environmental Microbiology*, 82, 308-317.
- Martínez-Suárez, J.V., Ortiz, S., López-Alonso, V. 2016. Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, 7, UNSP 638
- Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., Peirotén, A., Medina, M. 2016. Reuterin, lactoperoxidase, lactoferrin and high hydrostatic pressure treatments on the characteristics of cooked ham. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35, 111-118.
- Fernández-Cruz, M.L., Martín-Cabrejas, I., Pérez Del Palacio, J., Gaya, P., Diaz-Navarro, C., Navas, J.M., Medina, M., Arqués, J.L. 2016. *In vitro* toxicity of reuterin, a potential food biopreservative. *Food and Chemical Toxicology*, 96, 155-159.
- Martínez-Onandi, N., Rivas-Cañedo, A., Nuñez, M., Picon, A. 2016. Effect of chemical composition and high pressure processing on the volatile fraction of Serrano dry-cured ham. *Meat Science*, 111, 130-138.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M. 2016. Lipolysis, lipid peroxidation and texture of Serrano ham processed under different ripening temperature conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 1793-1800.
- Martínez-Onandi, N., Rivas-Cañedo, A., Nuñez, M., Picon, A. 2016. Influence of physicochemical parameters and high pressure processing on the volatile compounds of Serrano dry-cured ham after prolonged refrigerated storage. *Meat Science*, 122, 101-108.
- Landete, J.M., Peirotén, A., Medina, M., Arqués, J.L. 2017. Labeling *Listeria* with anaerobic fluorescent protein for food safety studies. *Journal of Dairy Science*, 100, 1-5.
- Langa, S., Arqués, J.L., Medina, M., Landete, J.M. 2017. Coproduction of colicin V and lactic acid bacteria bacteriocins in lactococci and enterococci strains of biotechnological interest. *Journal of Applied Microbiology*, 122, 1159-1167.
- Martínez-Onandi, N., Castioni, A., San Martín, E., Rivas-Cañedo, A., Nuñez, M., Torriani, S., Picon, A. 2017. Microbiota of high-pressure-processed Serrano ham investigated by culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 298-307.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M. 2017. Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure and controversy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 3084-3103.

Martínez-Onandi, N., Rivas-Cañedo, A., Ávila, M., Garde, S., Nuñez, M., Picon, A. 2017. Effect of physicochemical characteristics and high pressure processing on the volatile compounds of Iberian dry-cured ham. *Meat Science*, 131, 40-47.

Martínez-Onandi, N., Rivas-Cañedo, A., Picon, A., Nuñez, M. 2017. Influence of compositional characteristics, high pressure processing and prolonged refrigerated storage on the volatile compounds of Iberian dry-cured ham. *Meat Science* 2017\_468.

### VII.2.2 Tesis Doctorales dirigidas

Título: Diversidad genética y persistencia ambiental de *Listeria monocytogenes* en dos plantas de procesado de carne de cerdo ibérico: influencia de la resistencia a desinfectantes de amonio cuaternario

Doctorando: Sagrario Ortiz Jareño

Directores: Joaquín V. Martínez-Suárez y Victoria López -Alonso

Facultad y Universidad: Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid

Año: 2015

Calificación: Sobresaliente *cum laude*

Título: Potencial probiótico de *Lactobacillus reuteri* y aplicación de la reuterina como bioconservante alimentario

Doctorando: Izaskun Martín Cabrejas

Directores: Margarita Medina y Juan L. Arqués

Facultad y Universidad: Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid

Año: 2016

Calificación: Sobresaliente *cum laude* (mención Doctor Internacional)

Título: Efecto de la composición y el tratamiento por altas presiones sobre el perfil de compuestos volátiles y la microbiota del jamón Serrano e Ibérico

Doctorando: Nerea Martínez Onandi

Directores: Antonia M<sup>a</sup> Picón y Manuel Nuñez

Facultad y Universidad: Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid

Año: 2017

Calificación: depositada, pendiente de lectura

### VII.2.3 Libros/capítulos de libros

Medina M. 2015. *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo: incidencia y estrategias de eliminación. En *Iniciación a la Investigación en Microbiología*. Págs. 51-60. Elena González-Fandos (Ed.) Logroño: Universidad de la Rioja. ISBN 978-84-606-8182-3SEM. Logroño.

### VII.3 Congresos, Jornadas y Reuniones

#### VII.3.1 Ponencias invitadas

Ponente: M. Medina

Ponencia: Caracterización de la contaminación por *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria

Congreso/Jornada/Reunión: VIII Congreso CYTA/CESIA

Lugar y fecha: Badajoz, 2015

Ponente: M. Medina

Ponencia: *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo: incidencia y estrategias de eliminación

Congreso/Jornada/Reunión: Curso de Iniciación a la Investigación en Microbiología

Lugar y fecha: Logroño, 2015

Ponente: M. Medina

Ponencia: Contaminación por *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria.

Congreso/Jornada/Reunión: Jornada HYPRED 3M

Lugar y fecha: Madrid, 2015

Ponente: M. Medina

Ponencia: Inactivación de *L. monocytogenes* en el proceso de elaboración del jamón curado.

Congreso/Jornada/Reunión: Jornada Proyecto Listeria Cero

Lugar y fecha: Madrid, 2015

Ponente: M. Medina

Ponencia: Evaluación de sistemas de eliminación de *L. monocytogenes* en instalaciones y productos mediante agua electrolizada y distintas estrategias de bioconservación. Otros bioconservantes.

Congreso/Jornada/Reunión: Jornada Proyecto Listeria Cero

Lugar y fecha: Madrid, 2015

Ponente: M. Medina

Ponencia: Presentación del Proyecto Listeria 0

Congreso/Jornada/Reunión: Jornada INTERPORC

Lugar y fecha: Madrid, 2016

Ponente: M. Medina

Ponencia: Altas presiones en seguridad microbiológica de alimentos

Congreso/Jornada/Reunión: I Jornadas sobre tendencias en tecnología de alimentos de origen animal.

Universidad Complutense de Madrid

Lugar y fecha: Madrid, 2017

Ponente: M. Medina

Ponencia: Inactivación de *Listeria monocytogenes* en jamón de cerdo blanco e ibérico

Congreso/Jornada/Reunión: IX Congreso Mundial del Jamón Curado

Lugar y fecha: Toledo, 2017

Ponente: M. Medina

Ponencia: Inactivación de *Listeria monocytogenes* en jamón de cerdo blanco e ibérico

Congreso/Jornada/Reunión: Reunión de colaboración público-privada sobre “Transferencia de resultados de proyectos INIA sobre *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos”

Lugar y fecha: Madrid, 2017

Ponente: R. Montiel

Ponencia: Eliminación de *Listeria monocytogenes* en jamón curado deshuesado mediante tecnologías no térmicas. Efecto en la respuesta al estrés y la virulencia

Congreso/Jornada/Reunión: Reunión de colaboración público-privada sobre “Transferencia de resultados de proyectos INIA sobre *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos”

Lugar y fecha: Madrid, 2017

Ponente: M. Medina

Ponencia: Inactivación de *L. monocytogenes* en jamón mediante procedimientos biológicos (bacteriocinas, ácidos orgánicos, aceites esenciales).

Congreso/Jornada/Reunión: Reunión de colaboración público-privada sobre “Transferencia de resultados de proyectos INIA sobre *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos”

Lugar y fecha: Madrid, 2017

Ponente: M. Medina

Ponencia: Caracterización de la contaminación por *L. monocytogenes* a lo largo de la cadena de producción en la industria cárnica.

Congreso/Jornada/Reunión: Reunión de colaboración público-privada sobre “Transferencia de resultados de proyectos INIA sobre *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos”

Lugar y fecha: Madrid, 2017

### **VII.3.2 Actividades de organización de Congresos, Jornadas y Reuniones**

Congreso / Jornada / Reunión: IX Congreso Mundial del Jamón Curado

Lugar y fecha: Toledo, 7 al 9 de junio de 2017

Actividad: Miembro del Comité Científico (Margarita Medina)

Congreso / Jornada / Reunión: Jornada proyecto Listeria Cero

Lugar y fecha: Madrid, 19 de noviembre de 2015

Actividad: Organizador (Margarita Medina)

Congreso / Jornada / Reunión: Reunión de colaboración público-privada sobre “Transferencia de resultados de proyectos INIA sobre *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos”

Lugar y fecha: Madrid, 4 de julio de 2017

Actividad: Organizador (Margarita Medina).



## Capítulo VIII. Estrategias para mejorar la seguridad de los productos cárnicos: reducción del contenido de nitrificantes y aplicación de pulsos de luz

M. Fernández, G. García de Fernando, E. Hierro, X.F. Hospital

*Grupo de Tecnología de los Alimentos de Origen Animal (TECNOLALIMA). Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid.*

### VIII.1 Desarrollos en investigación

#### Linea A: Efecto de la reducción de la concentración de nitrificantes en la seguridad y el aroma de los productos cárnicos crudos curados

##### VIII.A.1.1 Introducción

Pese a la larga tradición que tiene el uso de nitratos y nitritos en las carnes curadas, las relaciones entre dieta y salud -y en particular el papel de los nitritos en la formación de N-nitrosaminas- han motivado que las autoridades alimentarias hayan limitado las cantidades permitidas para el empleo de estos aditivos en la industria cárnica. Teniendo en cuenta, además, las recomendaciones de la OMS (IARC, 2015), y aunque existen otras fuentes más importantes de nitratos en la dieta, es posible que la Unión Europea plantee en un futuro una nueva reducción de las cantidades de nitrificantes que se pueden añadir a los productos cárnicos.

Ante esta situación, y dada la función que desempeñan los nitritos como antimicrobianos y antioxidantes, así como su papel en el desarrollo del color y el sabor y aroma, se hace necesario evaluar hasta qué niveles se podría reducir su uso sin que ello afecte a la seguridad microbiológica y a la calidad sensorial de los productos cárnicos.

##### VIII.A.1.2 Metodología

En este periodo se continuaron los estudios que se iniciaron en el ámbito del proyecto Consolider CARNISENUSA, en relación con el efecto de la disminución de la cantidad añadida de nitrificantes en la calidad y seguridad microbiológica y en el aroma de los productos crudos curados. Así, se ha valorado la evolución de la microbiota típica y la producción de toxina botulínica en embutidos reducidos en nitrificantes, así como su perfil de compuestos volátiles. También se ha estudiado el efecto de la reducción del contenido de nitratos y nitritos en la evolución de distintos microorganismos patógenos y de la microbiota causante de putrefacción en jamones curados.

Las cantidades de nitratos y nitritos utilizadas en estos estudios fueron las máximas permitidas por la legislación europea (Reglamento UE 1129/2011), y distintas reducciones comprendidas entre el 25 y el 75%, dependiendo del producto (Tabla 1).

Además del estudio de la evolución de la microbiota típica de los embutidos, se realizaron *challenge tests* en embutidos y jamones. En los estudios con *C. botulinum* en embutidos, se inocularon en la masa esporas de cepas de los Grupos I (proteolíticas) y II (no proteolíticas), a una concentración de 4 log/g, y se determinó la producción de toxina mediante un ensayo ELISA. En los jamones se inocularon, entre otros microorganismos, *Listeria innocua* (como subrogado de *Listeria monocytogenes*), *Proteus vulgaris* y *Serratia liquefaciens*. Estos microorganismos se inyectaron en distintos puntos del pernil (músculos *semimembranosus* y *biceps femoris*, y codillo) antes del salado.

El perfil de compuestos volátiles de los embutidos se estudió mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

**Tabla 1. Concentración de nitratos y nitritos (mg/kg) en los jamones y embutidos experimentales**

Jamón curado			Embutidos crudos curados	
Nitrato (KNO <sub>3</sub> )	Nitrito (NaNO <sub>2</sub> )	Ascorbato sódico	Nitrato (NaNO <sub>3</sub> )	Nitrito (NaNO <sub>2</sub> )
600	--	--	150*	150*
150	--	--	112,5	112,5
600	600	--	75	75
150	150	--	0	0
600	600	500		

\* CMP: Cantidad máxima permitida según la legislación europea

### VIII.A.1.3 Resultados y Discusión

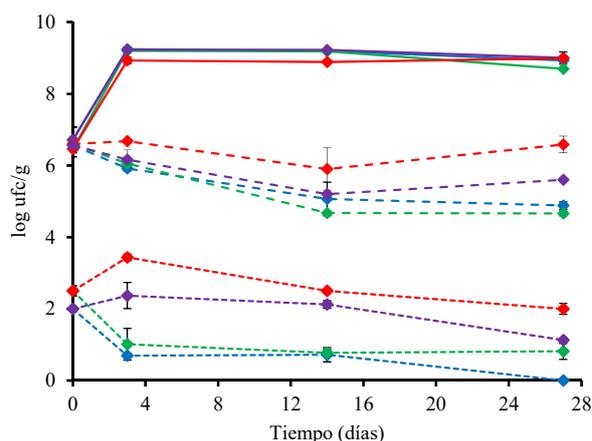
#### Estudios en embutidos crudos curados

No se detectó la producción de toxina en salchichón inoculado con *C. botulinum*, con ninguna de las concentraciones de nitrificantes estudiadas. La  $a_w$  inhibió desde el inicio del proceso a las cepas pertenecientes al Grupo II, a lo que tras la fermentación también contribuyó el descenso del pH a valores inferiores a 5,0. Por otra parte, aunque las condiciones iniciales de pH (5,6) y  $a_w$  (0,96) permitirían el crecimiento del Grupo I hasta los primeros 10-12 días de maduración, la combinación de estos parámetros con la temperatura y la microbiota competitiva impidieron o retrasaron la germinación de las esporas hasta que se alcanzaron los valores límite de pH y  $a_w$ .

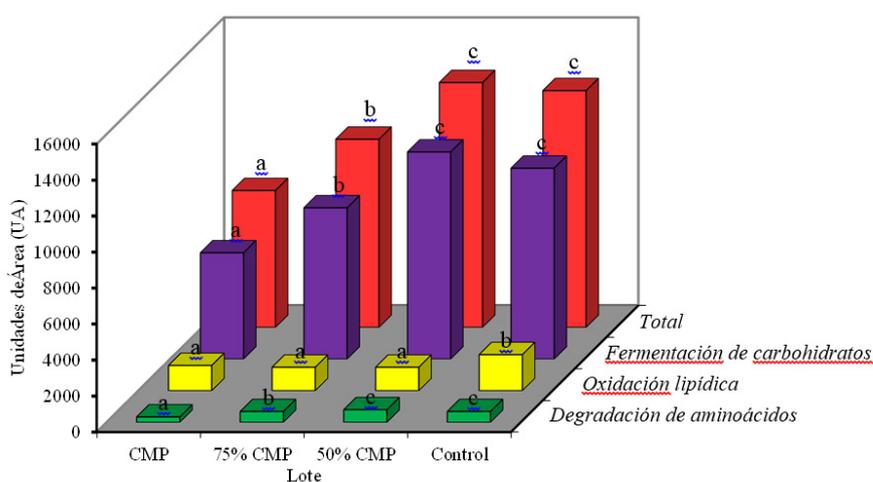
Por lo que se refiere a la microbiota típica de los embutidos, la reducción de la concentración de nitrificantes no afectó a la evolución de las bacterias lácticas. Sí se observaron diferencias en los recuentos de cocos Gram-positivos catalasa-positivos (CGC+) (Fig. 1). Los lotes con menores concentraciones de nitrato/nitrito presentaron recuentos 1-2 log ufc/g mayores que los embutidos elaborados con el máximo permitido actualmente y con una reducción del 25%. Este comportamiento podría repercutir en el correcto desarrollo del color y del aroma de los productos curados, en el que los CGC+ participan de forma relevante.

Por otra parte, al final de la maduración se observó una mayor concentración de enterobacterias en todos los lotes reducidos en comparación con el lote elaborado con el máximo permitido (Fig. 1).

Finalmente, y en cuanto al perfil de compuestos volátiles (Fig. 2), en los lotes con menor concentración de nitrato/nitrito se observó un mayor contenido de sustancias derivadas de la fermentación de los carbohidratos y de la degradación de los aminoácidos, entre ellos ciertos aldehídos, alcoholes y ácidos ramificados a los que se ha atribuido el aroma a “maduro” de los productos cárnicos curados. Por otra parte, en relación con la función antioxidante del nitrito, únicamente se observó un incremento de los compuestos derivados de la oxidación lipídica en los embutidos elaborados sin nitrificantes, mientras que todas las concentraciones de estos aditivos utilizadas para preparar el resto de los lotes modularon en la misma medida la oxidación de la fracción lipídica.



**Fig. 1.** Evolución de la microbiota típica durante la maduración de chorizo elaborado con distintas concentraciones de nitrato/nitrito. Bacterias lácticas (—); Cocos Gram-positivos catalasa-positivos (---); Enterobacterias (-----). Lotes: ◆ CMP; ◆ 75% CMP; ◆ 50% CMP; ◆ control.



**Figura 2.** Concentración de compuestos volátiles en salchichones elaborados con distintas concentraciones de nitrato/nitrito. a,b,c: barras con distinta letra para el mismo grupo de compuestos son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

### Estudios en jamón curado

La temperatura y la  $a_w$  fueron suficientes para controlar el crecimiento de *P. vulgaris* y *S. liquefaciens*, respectivamente, por lo que no se evidenció un efecto de la reducción de la cantidad añadida de nitrificantes.

La total ausencia de nitrito en la sal de curado hizo que al finalizar el post-salado se observaran recuentos de *Listeria* 1,5 log ufc/g mayores en el músculo *semimembranosus*. Este efecto se mantuvo al final del proceso, detectándose *Listeria* en un mayor número de jamones que se curaron sin nitrito o con una reducción del 75% de este aditivo. En *biceps femoris* no se observaron diferencias debidas a la composición de la sal de curado, ni en la fase de post-salado ni al final del proceso.

#### VIII.A.1.4 Conclusiones

Un control estricto del pH, la  $a_w$  y la temperatura podría ser suficiente para inhibir el crecimiento de enterobacterias en los productos cárnicos crudos curados, así como para evitar la formación de toxina botulínica. En cambio, dichos factores no permitirían controlar el crecimiento de *Listeria* en los músculos superficiales del jamón. Así pues, no se debería descartar el papel del nitrito en caso de que falle alguna de estas barreras, se utilicen otras condiciones de maduración o se incluya alguna modificación en la composición de los productos, como por ejemplo una disminución del contenido de sal.

En definitiva, la utilización de nitratos y nitritos en la industria cárnica ofrece ventajas desde el punto de vista higiénico que deben analizarse en el contexto del balance riesgo-beneficio en contraposición con sus posibles efectos toxicológicos.

#### VIII.A.1.5 Financiación

Estas investigaciones se iniciaron con el proyecto Consolider-Ingenio 2010 CARNISENUSA (CSD 2007-00016) y se han continuado con financiación procedente de las ayudas a grupos de investigación UCM (Grupo 920276, GR35/10A). Xavier Fernández Hospital ha sido beneficiario de una beca del Programa Predoctoral de la Universidad Complutense de Madrid.

## Línea B: Aplicación de la tecnología de pulsos de luz para la higienización de productos cárnicos loncheados

### VIII.B.1.1 Introducción

El consumidor actual demanda cada vez más productos mínimamente procesados, muchos de ellos “listos para el consumo” (*ready to eat*, RTE). Estos alimentos se procesan con técnicas que conservan sus propiedades sensoriales y nutritivas y se presentan en distintos formatos de corte y envasado que facilitan su empleo. Las operaciones de troceado, loncheado, dosificación, envasado, o cualquier otra conducente a facilitar la utilización del producto, incrementan el riesgo de contaminación por microorganismos, tanto alterantes como patógenos, lo que puede afectar de forma relevante a su vida útil y a su seguridad microbiológica (AESAN, 2011).

La utilización de tecnologías no térmicas para la inactivación microbiana ofrece interesantes posibilidades para asegurar el cumplimiento de los criterios establecidos por la legislación. Entre estas tecnologías se encuentran los pulsos de luz (PL). Se trata de destellos de luz blanca de amplio espectro (200-1.000 nm) y

corta duración ( $10^{-3}$ - $10^2$  ms) que se generan mediante la acumulación de energía en un condensador y su liberación rápida a una lámpara de xenón que al ionizarse súbitamente produce un destello. La luz emitida abarca desde la región UV hasta el infrarrojo cercano, correspondiendo aproximadamente el 40% de la radiación emitida a la fracción UV, que es la principal responsable de la inactivación microbiana, debida a la formación de dímeros en la cadena de ADN (Giese y Darby, 2000; Wat Res. 34, 4007-4013).

A continuación se presentan los resultados obtenidos en relación con la inactivación de *Listeria* sp. en jamón curado loncheado.

### VIII.B.1.2 Metodología

Se inocularon lonchas de jamón Serrano e Ibérico con *L. innocua* a una concentración de 4-5 log ufc/cm<sup>2</sup>. Tras un periodo de reposo de 15 minutos, las lonchas se envasaron a vacío de manera individual en bolsas de plástico de poliamida/polietileno de 60 µm de espesor y se trataron en un equipo PL estático Claranor IP20 con 0 (muestras control), 2,1, 4,2 y 8,4 J/cm<sup>2</sup>. Tras el tratamiento, parte de las muestras se analizaron inmediatamente, mientras que el resto se almacenaron en ausencia de luz en dos condiciones de temperatura, 4 y 20 °C.

Además de los recuentos de *Listeria*, se realizó un estudio de oxidación (índice de peróxidos) y un análisis sensorial de las lonchas de jamón, tanto inmediatamente tras el tratamiento como durante el almacenamiento (días 15 y 30).

### VIII.B.1.3 Resultados y Discusión

La inactivación de *Listeria* fue mayor en las lonchas de jamón Ibérico que en las de Serrano. La reducción máxima obtenida inmediatamente tras el tratamiento en jamón Serrano fue de 1 log ufc/cm<sup>2</sup>, mientras que en Ibérico fue de 1,8 log ufc/cm<sup>2</sup> aplicando una fluencia menor (Tabla 2). Este grado de inactivación se puede considerar razonable, teniendo en cuenta el nivel de contaminación superficial de los alimentos RTE, que habitualmente es inferior a 10 células/g (Angelidis y Koutsoumanis, 2006; J. Food Prot. 69, 938-942).

**Tabla 2. Inactivación (log ufc/cm<sup>2</sup>) de *Listeria innocua* en lonchas de jamón envasadas a vacío tras el tratamiento con pulsos de luz.**

Jamón Serrano*		Jamón Ibérico**	
Fluencia (J/cm <sup>2</sup> )	Inactivación	Fluencia (J/cm <sup>2</sup> )	Inactivación
2,1	0,21±0,08c	2,1	1,00±0,10b
4,2	0,68±0,05b	4,2	1,84±0,09a
8,4	0,95±0,11a	8,4	1,69±0,07a

\*Recuento inicial 3,80±0,08 log ufc/cm<sup>2</sup>

\*\*Recuento inicial 4,13±0,10 log ufc/cm<sup>2</sup>

a,b,c valores en la misma columna con distinta letra son diferentes significativamente ( $p < 0,05$ )

La mayor inactivación observada en el jamón Ibérico en comparación con el Serrano, y a menor fluencia, se podría explicar por su estructura. Así, el jamón Ibérico presenta una mayor infiltración grasa en el músculo que el Serrano, lo que podría haber causado una mayor exposición del inóculo a la luz. La grasa infiltrada podría haber dificultado la penetración del inóculo (en fase acuosa) en la estructura muscular y,

por lo tanto, las bacterias habrían quedado menos protegidas de la luz que en el jamón Serrano, en el que la grasa presenta otra distribución, acumulándose fundamentalmente en la zona subcutánea.

El incremento del índice de peróxidos (desde valores iniciales en torno a 10-12 mEq/kg de grasa) durante el almacenamiento de las muestras de jamón Serrano fue mayor en las lonchas tratadas con PL, duplicándose en el lote tratado con 8,4 J/cm<sup>2</sup> y almacenado a 20 °C. Por su parte, en el jamón Ibérico, aunque también se observó un mayor índice de peróxidos en las muestras tratadas, los valores se mantuvieron más estables durante el almacenamiento, y las cifras finales fueron inferiores a las del jamón Serrano.

Por lo que se refiere a las propiedades sensoriales del jamón, en la cata de ambos productos se detectaron matices azufrados inmediatamente después del tratamiento con 8,4 J/cm<sup>2</sup>. Estos matices desaparecieron durante el almacenamiento.

### VIII.B.1.4 Conclusiones

La aplicación de PL podría suponer una estrategia interesante para la higienización superficial del jamón curado loncheado, especialmente el de tipo Ibérico, ofreciendo una alternativa rápida, sencilla y económica. Aunque en el jamón Serrano el tratamiento no resultaría tan eficaz, el nivel de descontaminación no sería descartable en caso de recuentos no muy elevados, debiendo ajustarse la dosis para minimizar los cambios sensoriales.

### VIII.B.1.5. Financiación

Estas investigaciones se iniciaron con el proyecto Consolider-Ingenio 2010 CARNISENUSA (CSD 2007-00016) y se han continuado con financiación procedente del proyecto AGL2011-29325. (Ministerio de Economía y Competitividad). Xavier Fernández Hospital ha sido beneficiario de una beca del Programa Predoctoral de la Universidad Complutense de Madrid.

## VIII.2 Producción científica

### VIII.2.1 Artículos en revistas científicas

Aguirre, J.S., García de Fernando, G., Hierro, E., Hospital, X.F., Ordóñez, J.A., & Fernández, M. 2015. Estimation of the growth kinetic parameters of *Bacillus cereus* spores as affected by pulsed light treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 202, 20-26.

Hospital, X.F., Carballo, J., Fernández, M., Arnau, J., Gratacós, M., & Hierro, E. 2015. Technological implications of reducing nitrate and nitrite levels in dry-fermented sausages: typical microbiota, residual nitrate and nitrite and volatile profile. *Food Control*, 57, 275-281.

Hospital, X.F., Hierro, E., Stringer, S., & Fernández, M. 2016. A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 66-70.

Fernández, M., Hospital, X.F., Arias, K., & Hierro, E. 2016. Application of pulsed light to sliced cheese: effect on *Listeria* inactivation, sensory quality and volatile profile. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 1335-1344.

Hospital, X.F., Hierro, E., Arnau, J., Aguirre, J., Gratacós-Cubarsí, M., & Fernández, M. 2017. Effect of nitrate and nitrite on *Listeria* and selected spoilage bacteria inoculated in dry cured ham. *Food Research International* (en prensa).

### VIII.2.2 Tesis Doctorales y Trabajos fin de Máster dirigidos

Tesis Doctoral: Estudio de la reducción de la concentración de nitrificantes en la calidad microbiológica y sensorial de productos cárnicos curados

Doctorando: Xavier Fernández Hospital

Directores: Eva Hierro Paredes y Manuela Fernández Álvarez

Facultad y Universidad: Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

Año: 2016

Calificación: Sobresaliente “*cum laude*” por unanimidad con Mención de Doctorado de Europeo

TFM: Efecto de la tecnología de pulsos de luz en los procesos oxidativos, la inactivación microbiana y las propiedades sensoriales del jamón curado.

Alumna: M<sup>a</sup> Carmen Cabellos Arroyo

Directoras: Manuela Fernández Álvarez y Eva Hierro Paredes

Titulación: Máster Universitario en Nutrición Humana y Dietética Aplicada

Facultad y Universidad: Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid

Año: 2015

Calificación: Notable

TFM: Inactivación de *Listeria innocua* mediante tratamientos combinados y fase de latencia de las células supervivientes a tratamientos con luz pulsada.

Alumna: Esther Jambrina Gómez

Directores: Gonzalo García de Fernando Minguillón y Manuela Fernández Álvarez

Titulación: Máster Universitario en Nutrición Humana y Dietética Aplicada

Facultad y Universidad: Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid

Año: 2015

Calificación: Notable

TFM: Efecto de la tecnología de pulsos de luz en la inactivación y probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua*.

Alumna: Beatriz Cerdán García

Directoras: Manuela Fernández Álvarez, Eva Hierro Paredes y María Fernanda Fernández León

Titulación: Máster Universitario en Nutrición Humana y Dietética Aplicada

Facultad y Universidad: Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid

Año: 2017

Calificación: Pendiente de publicación de la calificación (convocatoria de septiembre de 2017)

### VIII.2.3 Libros/capítulos de libros

Hierro, E., Fernández, M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A. 2015. Mediterranean Products. En Handbook of Fermented Meat and Poultry. Chapter 35. Pages: 301-312. Ed: Wiley-Blackwell.

Fernández, M., Hierro, E. 2016. Microbial inactivation in foods by Pulsed Light. En High Intensity Pulsed Light in Processing and Preservation of Foods. Chapter 6. Pages: 121-162. Ed: Nova Science Publishers.

### VIII.2.4 Ponencias invitadas

Ponente: Manuela Fernández Álvarez

Ponencia: Pulsos de luz: una nueva tecnología para la higienización de los alimentos listos para el consumo

Congreso / Jornada / Reunión: Mesa Redonda sobre “Control de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo”

Lugar y fecha: Real Academia de Ciencias Veterinarias. Madrid, 21 de septiembre de 2015

## Capítulo IX. Aplicación de electrones acelerados a jamón curado deshuesado y piezas cárnicas reestructuradas: eliminación de *Listeria monocytogenes*. Detección de marcadores del tratamiento.

M.C. Cabeza<sup>a</sup>, J.R. Lucas<sup>a</sup>, R. Velasco<sup>a</sup>, J.A. Ordóñez<sup>ab</sup>, M.I. Cambero<sup>a</sup>, P. Valle<sup>c</sup>, M.D. Selgas<sup>a</sup>, M.L. García<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.* <sup>b</sup> *Real Academia de Ciencias Veterinarias de España.* <sup>c</sup> *CAI de Resonancia Magnética Nuclear. UCM.*

### IX.1 Desarrollos en investigación

#### IX.1.1 Introducción

La contaminación de productos cárnicos en las distintas plantas de procesado se debe, en la mayoría de los casos, a *Listeria monocytogenes*, un microorganismo psicrotrofo que se encuentra en el ambiente de las salas de procesado, resistente a los desinfectantes y capaz de formar biofilms en diferentes materiales. La persistencia de este microorganismo hace necesario su control en instalaciones, equipamiento y, por supuesto, en los alimentos. El Reglamento CE1441/2007 establece un nivel máximo de *L. monocytogenes* de 100 ufc/g durante la vida útil de los productos RTE no destinados a población de riesgo y que no permiten el crecimiento de este microorganismo, como el jamón curado ( $a_w < 0,92$ ). En otros países, el criterio de seguridad alimentaria es de tolerancia cero (ausencia en 25 g), lo que supone una barrera a la exportación de este tipo de productos.

La distribución tradicional del jamón curado, en piezas enteras, se ha modificado hacia el producto deshuesado, entero, troceado o loncheado para el mercado nacional y, sobre todo, para la exportación a la UE y terceros países. Todas estas operaciones incrementan el riesgo de contaminación por la microbiota del entorno industrial, equipos, manipuladores, etc., donde potencialmente pueden existir microorganismos patógenos. Debido a que uno de los puntos más susceptibles de contaminación del producto con *L. monocytogenes* es el lugar ocupado por el hueso, se hace necesario higienizar este producto hasta alcanzar niveles de *L. monocytogenes* estadísticamente despreciables, utilizando para ello, tecnologías no térmicas que aseguren su destrucción tras el procesado. En nuestro caso, la aplicación de un tratamiento ionizante mediante la aplicación de electrones acelerados (EA).

Con el fin de establecer la dosis necesaria para conseguir el Objetivo de Seguridad Alimentaria (FSO), resulta necesario conocer la cinética de destrucción de las cepas de *Listeria* más habituales en la industria cárnica. Para ello se han realizado estudios de penetración de los EA en jamón curado deshuesado y en piezas cárnicas reestructuradas para establecer si se absorbe la dosis suficiente para eliminar dicho microorganismo, o si, por el contrario, es necesario aplicar el tratamiento de forma bilateral (con volteo).

Por otro lado, en la actualidad se hace necesario desarrollar métodos adecuados que permitan no solo detectar alimentos irradiados sino conocer los cambios que este tratamiento puede provocar en su estructura y composición. Para ello, tras la aplicación de EA, se ha realizado un análisis metabolómico en las diferentes muestras de jamón curado con el fin de obtener el perfil metabólico de cada una de ellas con distintos dosis y poder establecer biomarcadores del tratamiento. El objetivo final es validar los modelos predictivos que se obtengan lo que permitirá detectar y cuantificar dicho tratamiento y establecer los posibles cambios estructurales que provoque en los jamones curados.

## Línea A: Efecto del tratamiento con electrones acelerados en jamón curado deshuesado

### IX.A.1.2 Material y métodos

#### Estudio de la penetración de electrones acelerados

Como materia prima se utilizaron jamones enteros deshuesados procedentes de una industria colaboradora. Cada pieza se perforó en varias zonas extrayendo tacos de forma rectangular de 4-5 cm de lado y cuya altura se correspondía con la del jamón. Con el fin de conocer la dosis absorbida en cada punto, cada uno de los tacos se cortó en lonchas de 3-4 cm de espesor. Se volvió a recomponer el taco superponiendo de nuevo las lonchas y colocando entre cada dos de ellas un dosímetro de acetato de celulosa, midiendo la altura a la que quedaba cada uno de ellos. La superficie del producto se consideró como la altura = 0 cm. Posteriormente, los tacos de jamón con los dosímetros, se insertaron de nuevo en el jamón del que se habían obtenido.

Así mismo, y con el fin de conocer las posibles diferencias en la penetración de los EA en la parte magra y grasa (tocino) de jamones curados, se cortó una parte magra del jamón en 12 lonchas de  $5,7 \pm 0,49$  mm de grosor, entre las que se colocaron, como se ha explicado anteriormente, dosímetros previamente identificados y se apilaron formando tacos (Imagen A). De la misma forma se procedió con el tocino. En este caso, las lonchas presentaron un grosor de



$6,64 \pm 0,45$  mm (Imagen B).

Los tacos así reconstruidos se envasaron a vacío para facilitar su manejo, manteniéndolos en refrigeración hasta su posterior uso. El tratamiento con EA se realizó en la planta de irradiación IONISOS Ibérica (Tarancón, Cuenca) que dispone de un acelerador de electrones que opera a una potencia de 10 MeV. Las dosis aplicadas fueron de 2, 4 y 6 kGy. El tratamiento se aplicó de forma unilateral y bilateral (con volteo). Al terminar, se extrajeron los dosímetros y se procedió a la lectura de la dosis absorbida.

#### Cinética de destrucción de *Listeria monocytogenes*

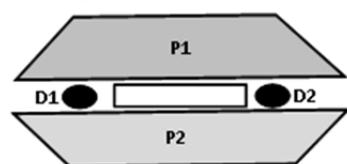
Para este estudio se utilizaron cepas de *L. monocytogenes* de los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b, procedentes de la industria cárnica y previamente caracterizadas como persistentes o aisladas esporádicamente (Ortiz et al., 2010; Foodborne Pathog Dis., 7, 1177-1184). Se utilizó igualmente una cepa

de *L. innocua* NCTC 11288 por presentar una radiorresistencia similar a la de *L. monocytogenes*, y evitar el riesgo derivado de su manejo.

Para determinar los parámetros de destrucción de las diferentes cepas de *Listeria* frente al tratamiento con electrones acelerados, se contaminaron muestras (lonchas) de jamón por inmersión en una suspensión de cada cepa, que contenía 8,5-9 unidades logarítmicas/ml, de forma que la carga microbiana en la loncha fuera de aproximadamente 8 ufc Log/gramo. Las muestras envasadas a vacío se trasladaron en recipientes isoterms a la planta de irradiación IONISOS Ibérica y se trataron con dosis de 0,5, 1, 2 y 3 kGy. Posteriormente, se trasladaron en las mismas condiciones al laboratorio y se realizaron recuentos de los supervivientes en agar Palcam, medio selectivo para *Listeria* spp, adicionado de suplemento antibiótico (polimixina B, clorhidrato de acriflavina y ceftacidina) y emulsión yema de huevo. Para las cepas de *L. monocytogenes* se utilizó además el medio ChromAgar *Listeria*, selectivo únicamente para esta especie.

### Efecto listericida del tratamiento con electrones acelerados

Se utilizaron jamones curados deshuesados comerciales cortados, siguiendo el sentido de la línea que correspondería a la posición del hueso, en dos partes de alturas similares (P1 y P2) midiéndose el grosor.



Se colocaron una sobre otra y, entre ellas, 2 dosímetros (D1 y D2) para conocer la dosis real absorbida durante el tratamiento (ver imagen).

Por otra parte, se prepararon lonchas de las mismas piezas de jamón curado (5 mm de grosor, 15 cm de longitud) y se inocularon con una suspensión de *L. innocua* que contenía aproximadamente  $10^9$  ufc/ml. Cada

loncha se plegó sobre sí misma quedando el inóculo en su interior. Entre las partes P1 y P2 de cada pieza se colocaron seis lonchas así preparadas (rectángulo blanco). Cada pieza se envasó al vacío de forma individual y se sometió a un tratamiento bilateral con EA a dosis de 2 kGy. Posteriormente, se almacenaron en refrigeración y se procedió al recuento de supervivientes en agar Palcam, adicionado de antibiótico y emulsión yema de huevo, a diferentes tiempos (días 1, 3, 8 y 22).

### Análisis sensorial

Las muestras tratadas se sometieron a una Prueba de Ordenación con el fin de valorar el efecto de los tratamientos con electrones acelerados en los siguientes parámetros sensoriales: apariencia, sensación en boca y olor del jamón curado. Igualmente, se hizo un estudio de la evolución de estos parámetros durante un almacenamiento de hasta 30 días en refrigeración (4°C).

### IX.A.1.3 Resultados y Discusión

#### Penetración de electrones acelerados en jamones curados deshuesados

Las Figuras 1 y 2 representan el porcentaje de dosis absorbida en un tratamiento con dosis de 2, 4 y 6 kGy aplicado unilateralmente y bilateralmente (con volteo), respectivamente, en función de la altura.

En el tratamiento unilateral (Figura 1), se obtuvo una gráfica que se ajustó a la siguiente ecuación:

$$\% \text{Dosis absorbida} = -38,7252 + \frac{327,433}{\text{altura (cm)}} \quad (R^2 = 0,89)$$

Figura 1

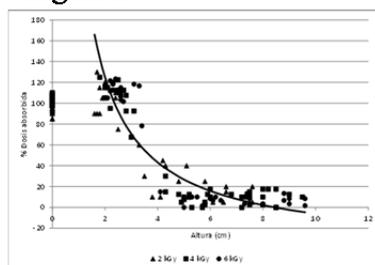
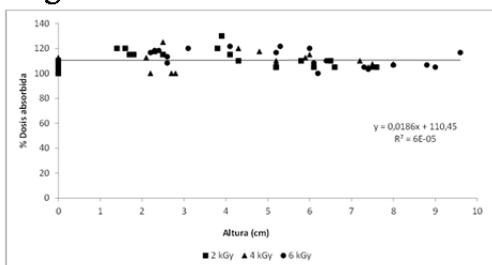
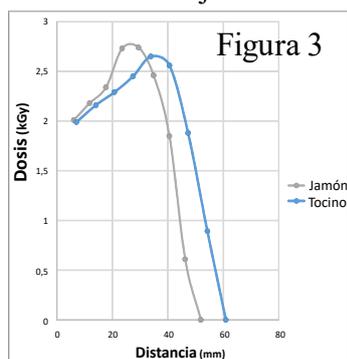


Figura 2



Se observa que el porcentaje de dosis absorbida a cada altura del jamón es la misma, independientemente de la dosis aplicada, lo cual indica que es posible conocer la dosis que se absorbe en cada punto de la pieza cualquiera que sea el tratamiento. Así, por ejemplo, en la mitad de la pieza (aproximadamente 4 cm) se absorbería un 43% de la dosis aplicada mientras que a una profundidad de unos 5-6 cm la dosis absorbida sería prácticamente nula. Teniendo en cuenta que la zona de mayor riesgo de riesgo será aquella que ocupe el hueso (aprox. centro de la pieza), debido a las posibles contaminaciones que pudieran ocurrir en la etapa de su extracción, se hace necesario asegurar que en ese punto del producto se absorbe la dosis suficiente para conseguir el FSO respecto a *L. monocytogenes*. Por todo ello, se planteó un segundo tratamiento volteando la pieza tras el primer pase, aplicando la misma dosis de irradiación por las dos caras del jamón. Este tratamiento se definió como bilateral o con volteo.



La Figura 2 muestra el porcentaje de dosis adsorbida en los jamones tratados bilateralmente. Puede observarse que al recibir el tratamiento por las dos caras, independientemente de la altura del producto, se absorbe como mínimo la totalidad de la dosis aplicada y, en algunos casos, ligeramente superior. Este fenómeno se debe al efecto de retrodispersión ocasionado por la excitación de los electrones al penetrar en el producto, descrito en la literatura científica (Jaczynski y Park, 2003; J. Food Sci., 68, 1788-1792). En el experimento realizado con magro y tocino (Figura 3), se observó que la dosis de irradiación absorbida es diferente dependiendo de la matriz, es decir, la densidad del alimento procesado con irradiación es crítica en términos de penetración de electrones.

### Cinética de destrucción de *Listeria monocytogenes*

Para conocer la cinética de destrucción de cada una de las cepas estudiadas, se representó el número de supervivientes (Log ufc/g) frente a la dosis absorbida, obteniéndose las correspondientes gráficas de destrucción que se ajustaron a las ecuaciones de primer orden recogidas en la tabla 1.

Si bien, para la mayor parte de las cepas utilizadas no se encontraron diferencias significativas en los valores D en función del medio de cultivo utilizado en los recuentos, en el caso de *Listeria monocytogenes* S7-2 (serotipo 4b), la radiorresistencia resultó superior cuando los recuentos se llevaron a cabo en ChromAgar Listeria. Resultados similares obtuvieron Jamali et al., 2013; (Food Control, 32, 19-24) quienes observaron que la sensibilidad del ChromAgar Listeria era superior a la del Agar Palcam. as cepas que presentaron mayor radiorresistencia fueron *L. innocua* y *L. monocytogenes* S4-2, por lo que sus valores D son los que se considerarán para calcular la dosis necesaria para conseguir el FSO.

Tabla 1

Microorganismo	Medio de cultivo	Ecuación de supervivencia	R <sup>2</sup>	Valor D (kGy)
<i>L. innocua</i> NCTC 11288	Agar Palcam	Log UFC/g = -1,7621·Dosis + 8,67	0,991	0,55
<i>L. monocytogenes</i> S2	Agar Palcam	Log UFC/g = -2,2494·Dosis + 8,85	0,987	0,44
	ChromAgar Listeria	Log UFC/g = -2,3272·Dosis + 9,06	0,986	0,45
<i>L. monocytogenes</i> S4-2	Agar Palcam	Log UFC/g = -1,788·Dosis + 9,03	0,979	0,56
	ChromAgar Listeria	Log UFC/g = -1,8538·Dosis + 9,13	0,986	0,54
<i>L. monocytogenes</i> S7-2	Agar Palcam	Log UFC/g = -2,1385·Dosis + 9,25	0,998	0,47 b
	ChromAgar Listeria	Log UFC/g = -1,8621·Dosis + 8,76	0,970	0,54 a
<i>L. monocytogenes</i> S12-1	Agar Palcam	Log UFC/g = -1,9387·Dosis + 9,12	0,9703	0,52
	ChromAgar Listeria	Log UFC/g = -1,897·Dosis + 9,18	0,975	0,52

a,b: Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05)

### Efecto listericida del tratamiento con electrones acelerados

Como era de esperar, la dosis absorbida y, por tanto, el efecto listericida del tratamiento, fue superior en aquellos jamones que presentaban el menor espesor. En cualquier caso, con este tratamiento se consiguió una disminución del número de listerias siempre superior a 2,39 unidades logarítmicas, que es lo que nuestro grupo ha establecido previamente (datos no publicados) como necesario para conseguir el FSO en este producto respecto a *L. monocytogenes* en los países en los que rige el criterio de tolerancia cero. Sin embargo, para que el tratamiento sea efectivo, es muy importante tener en cuenta la altura de la pieza, ya que por encima de 10 cm se puede ver comprometido el efecto listericida.

Durante el almacenamiento en refrigeración no hubo crecimiento de los microorganismos supervivientes, lo que era de esperar debido a las características que presenta el producto.

### Análisis sensorial

Tabla 2

Dosis (kGy)	0	1	2	3
0				S <sub>0,15</sub>
1				O <sub>15</sub> ; S <sub>15</sub>
2				
3				

En lo que se refiere al análisis sensorial (Tabla 2), la apariencia de las muestras fue similar a las distintas dosis ensayadas (1, 2 y 3 kGy), no observándose diferencias significativas en relación a la muestra control (0 kGy) ni entre ellas a lo largo del almacenamiento (30 días). Sin embargo, la sensación en boca (S) del jamón tratado con 3 kGy resultó significativamente diferente de la muestra control (días 0 y 15) y de la muestra tratada con 1 kGy en el día 15, aunque estas diferencias desaparecieron transcurridos los 30 días de almacenamiento en refrigeración. Al analizar el olor (O), se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) solamente entre las muestras tratadas con 1 y 3 kGy a los 15 días de almacenamiento.

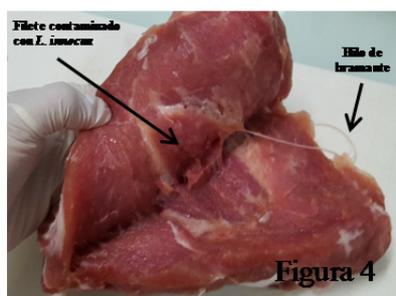
## Línea B: Efecto del tratamiento con electrones acelerados en piezas cárnicas reestructuradas con agentes de ligazón en frío

### IX.B.1.2 Material y Métodos

#### Efecto listericida del tratamiento en piezas cárnicas reestructuradas

Para la elaboración de las piezas reestructuradas, se tomaron dos bloques de magro de unos 500 g y se pegaron con Plasma Porcino en polvo con fibrinógeno (PP) (Herrero et al., 2009; Food Res. Int., 42, 1362-1372). Para favorecer el pegado, las piezas se envasaron a vacío y se mantuvieron a 5°C durante 24 h. Posteriormente, se salaron con una mezcla de sal gruesa y fina (1:1) (18 h/kg); se retiró la sal y se almacenaron en refrigeración durante 3 días. La mitad de las muestras se sometieron a un tratamiento con EA (2 kGy) y la otra mitad se utilizó como Control. Posteriormente, las piezas se mantuvieron en una cámara de maduración en condiciones de temperatura y humedad relativa de 15°C y 85-90%, hasta el momento de su análisis.

A continuación, se prepararon filetes de carne (4 mm de espesor x 10 cm de longitud) que se inocularon con *L. innocua* NCTC 11288 (1,5 x 10<sup>5</sup> ufc/ml aprox.). Cada filete se plegó sobre sí mismo, quedando el inóculo en su interior y se ató con un hilo de bramante. Inmediatamente después de aplicar el PP, se colocó el filete en medio de la superficie de pegado dejando los extremos del hilo por fuera de la pieza para poder localizarlo fácilmente (Figura 4) y continuó su procesado y posterior tratamiento con EA como se ha descrito anteriormente. Los filetes contaminados se recuperaron junto con 5 mm adicionales de carne adyacente. La evolución de *L. innocua*, se estudió mediante recuentos como se ha descrito en el apartado 2.1.2.



#### Determinación de la fuerza de ligazón en las piezas cárnicas reestructuradas irradiadas

Para estudiar el efecto de la irradiación sobre la eficacia del agente de ligazón utilizado, se realizó un ensayo de tracción uniaxial (ensayo destructivo) (Romero de Ávila et al., 2014; Meat Sci., 709-717) utilizando para ello un texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems) dotado de unas pinzas de aluminio que permitían fijar los extremos opuestos de las muestras normalizadas y con la línea de pegado en la parte central. Para el ensayo, las muestras se sometieron a una tracción creciente y progresiva hasta conseguir la rotura. Se determinó la fuerza de rotura de acuerdo con la siguiente expresión:

$$Fuerza\ de\ rotura\ (N\ x\ cm^2) = \frac{Fuerza\ máxima\ (N)}{espesor\ (cm) \times anchura\ de\ la\ muestra\ (cm)}$$

#### Microestructura de la línea de pegado de las piezas cárnicas reestructuradas

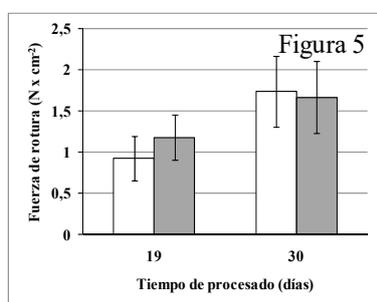
El estudio se realizó mediante microscopía electrónica de barrido en el Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid con muestras tomadas a los 1, 2, 5, 19 y 30 días del procesado. Para ello se prepararon cubos de 0,5 cm de lado intentando mantener la línea de pegado en el centro. Se fijaron durante 5 horas con glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 4% en suero fisiológico. Posteriormente, se deshidrataron con soluciones crecientes de acetona (30, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%) y finalmente, se deshidrataron (punto crítico en CO<sub>2</sub>) y se metalizaron con grafito y oro. Se visualizaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 6400) a diferentes aumentos (x100, x1000 y x5000).

## IX.B.1.3 Resultados y Discusión

### Efecto listericida del tratamiento en piezas cárnicas reestructuradas

La presencia de PP en los perniles frescos no influyó en el crecimiento de *Listeria*. El número de listerias disminuyó alrededor de medio ciclo logarítmico durante los dos primeros días (final de la fase de salado), aumentando, posteriormente, hasta alcanzar los niveles iniciales en torno al cuarto día. Superada esta primera etapa de adaptación al medio, el recuento se mantuvo constante durante toda la fase de maduración. Por tanto, se pueden hacer las mismas consideraciones que en el caso del jamón curado, es decir, suponiendo que se produzca una contaminación durante el deshuesado del pernil, se requerirán 2,39 reducciones decimales para garantizar el cumplimiento de la norma microbiológica de ausencia en 25 g. En las muestras tratadas con 2 kGy, en ningún momento se observó crecimiento de *Listeria*.

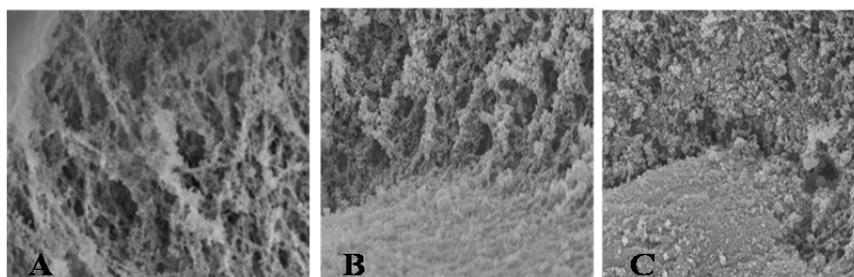
### Fuerza de ligazón en las piezas cárnicas reestructuradas



La fuerza de ligazón aumenta con el tiempo de procesado. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las muestras tratadas y no tratadas. En la figura adjunta se muestran los datos obtenidos en las dos últimas muestras, tomadas a los 19 y 30 días del procesado. En este sentido se ha descrito que el PP (Herrero et al., 2009; Food Chem., 113, 493-499) establece uniones o interacciones estables entre superficies cárnicas que perduran durante procesos tales como el salado y el secado.

### Microestructura de la línea de pegado de las piezas cárnicas reestructuradas

La microestructura de las zonas de unión en las piezas cárnicas reestructuradas cambió con el tiempo de maduración y el tratamiento de irradiación. Así, a los 5 días (Imagen A) se observó una red formada por el entrecruzamiento de estructuras fibrosas que interacciona con la superficie cárnica mucho más organizada y densa a los 30 días de procesado (Imagen B), lo que explicaría la mayor fuerza de ligazón observada previamente. En la imagen correspondiente a la muestra del día 30 tratada con 2 kGy (Imagen C) se puede observar la pérdida de las estructuras fibrosas, probablemente debido a la pérdida de estructura terciaria de las proteínas como consecuencia del tratamiento, lo que puede ser responsable de la menor fuerza de rotura observada en el ensayo de tracción, aunque las diferencias no fueron significativas. Las imágenes tienen una ampliación x5000.



## Línea C: Estudio del efecto del tratamiento con electrones acelerados de jamones curados por resonancia magnética nuclear (RMN)

### IX.C.1.2 Metodología

Las muestras obtenidas a partir del músculo *Biceps femoris* (BF) de diferentes jamones curados, se envasaron a vacío y se sometieron a un tratamiento de irradiación (4 y 10 kGy). Tras el tratamiento, se mantuvieron en refrigeración (4 °C) y se analizaron a diferentes tiempos de almacenamiento. El análisis se hizo mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución de rotación en ángulo mágico utilizando un espectrómetro Bruker AVIII500HD (frecuencia de resonancia 500,13 MHz) equipado con una sonda de HRMAS. Estos experimentos se realizaron a 4 °C para evitar la afectación de las muestras. Se obtuvieron espectros mono y bidimensionales.

Para evaluar las diferencias asociadas a la dosis aplicada se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) como un método no supervisado de clasificación de los datos de RMN. La distribución en los PCA se utilizó para la identificación de las señales principalmente responsables de las diferencias significativas entre las muestras.

### IX.C.1.3 Resultados y discusión

Los espectros de las muestras de BF permitieron identificar gran número de los metabolitos presentes (aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos y ácidos orgánicos) tanto en aquéllas procedentes de jamones no tratados (0 kGy) como en los irradiados (4 y 10 kGy).

Al comparar todos los datos espectrales correspondientes a los jamones control e irradiados a distintas dosis, el mayor poder discriminante se halló en bandas (*buckets*) correspondientes a la zona de los aminoácidos y en la zona aromática, con variaciones de los metabolitos tipo inosina, hipoxantina, fenilalanina, tirosina y metionina, y glutamato. No obstante, los resultados que se recogen en este estudio son las primeras experiencias realizadas por lo que es necesario hacer más estudios aumentando el número de muestras para disponer de un amplio número de datos que permita abarcar la variabilidad cuantitativa de los metabolitos detectados. Solo así se podrá avanzar en el estudio de los cambios asociados con la aplicación de EA a dosis iguales o inferiores a 10 kGy.

### IX.C.1.4 Conclusiones

El tratamiento de irradiación (2 kGy) es útil para conseguir el FSO, con respecto a *Listeria monocytogenes* en jamón curado deshuesado y en piezas cárnicas reestructuradas, en aquellos países en los que rige el criterio de tolerancia cero. Sin embargo, la altura del jamón es un factor limitante ya que la dosis absorbida disminuye a medida que aumenta el grosor de la pieza. Se puede compensar realizando un tratamiento bilateral (con volteo).

La irradiación no afecta a la fuerza de pegado de piezas cárnicas reestructuradas con plasma porcino en polvo como agente de ligazón.

La RMN podría ser una herramienta útil para detectar marcadores del tratamiento con radiaciones ionizantes, pero son necesarios más estudios.

**Agradecimientos:** Gracias a las Prof. Romero de Ávila y Cambero por su ayuda en los estudios con las piezas cárnicas reestructuradas.

## Línea D: Penetración de electrones acelerados en un alimento formulado con diversos ingredientes

M. C. Cabeza<sup>a</sup>, J. A. Ordóñez<sup>ab</sup>, M. I. Cambero<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Dpto de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense (UCM). 29040 Madrid.* <sup>b</sup>*Real Academia de Ciencias Veterinarias de España (RACVE)*

### IX.D.1.1 Introducción

Uno de los objetivos del subproyecto “Uso de tecnologías emergentes para garantizar la seguridad alimentaria de productos cárnicos listos para su consumo (PROCARTE)” integrado en el proyecto CONSOLIDER titulado “Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables (CARNISENUSA)” era el estudio de la aplicación de electrones acelerados (EA) para conseguir la higienización de alimentos listos para el consumo (RTE). Los resultados que se obtuvieron permitieron concluir que, efectivamente, el tratamiento con electrones acelerados era una tecnología muy adecuada para la higienización de estos alimentos, equivalente a una pasteurización térmica. Dosis inferiores a 2 - 3 kGy son suficientes para conseguir los objetivos de seguridad alimentaria (FSO) en productos RTE como, entre otros, jamón cocido (Cabeza y col., 2007; *Innov. Food Sci. Em. Technol.*, 8, 299 - 305), jamón curado (Hoz y col., 2008; *J.Food Protec.*, 71, 2001 - 2006), embutidos curados (Cabeza y col., 2009; *Meat Sci.*, 83, 320 - 327), ensaladilla (Cambero y col., 2011; *Foodb. Path. Dis.* 8, 221 - 229.), respecto a microorganismos patógenos no esporulados, incluso los que pueden multiplicarse bajo refrigeración, como *Listeria monocytogenes* (Cabeza y col., 2007; Hoz y col., 2008). Sin embargo, uno de los principales factores a tener en cuenta a la hora de ajustar un tratamiento con electrones acelerados es su limitado poder de penetración, que depende, en gran medida, de su energía cinética. En el uso alimentario esta energía se limita reglamentariamente a 10 MeV (R.D. 348/2001). Cuando la energía cinética de los electrones es constante, la penetración y, por tanto, la dosis absorbida en un punto determinado está en relación con la masa y densidad de la muestra tratada (Miller, 2005; *Food Engineering series*. Springer-Verlag. New York). Por ello, la optimización de un tratamiento con electrones acelerados para que toda la masa de producto absorba la dosis requerida y asegurar así el FSO, es necesario considerar, entre otras variables, la composición del alimento y el diseño y características del envase.

La dosis total media absorbida [ $1/2 (D_{max} + D_{min})$ ] por un alimento envasado (con una densidad de llenado aparente homogénea) puede determinarse directamente distribuyendo en la masa de producto dosímetros interpuestos en la trayectoria del haz de electrones. Los datos aportados por los dosímetros permiten obtener la curva de distribución de la dosis absorbida por el producto a distintos niveles de llenado del envase y considerar los puntos de máxima ( $D_{max}$ ) y mínima ( $D_{min}$ ) absorción de energía. Esta información es imprescindible en la optimización del tratamiento para alcanzar el FSO en un determinado alimento envasado y para ajustarse a la legislación vigente (RD 348/2001) que determina que la proporción  $D_{max}/D_{min}$  no deberá rebasar el valor de 3.

En el mercado actual, los productos RTE se presentan en envases de distinta capacidad y dimensiones para adaptarse a las exigencias y deseos de los consumidores. Así se comercializan raciones individuales o familiares de un escaso espesor (p. ej., en productos loncheados cuyo espesor es, en general, inferior a 3-4 cm) hasta contenedores (con dimensiones que pueden superar los 12 cm) destinados, éstos últimos, sobre todo a la restauración colectiva y obradores. Los alimentos en estos últimos envases alcanzan espesores que pueden superar el poder de penetración de los electrones acelerados. Por tanto, es necesario

tener en cuenta las características y las dimensiones de los envases destinados a contener los alimentos que se someten a un proceso de radiación con electrones acelerados para evitar que el tratamiento no sea homogéneo y, por tanto, ineficaz.

En el presente trabajo se ha determinado la energía absorbida en diferentes zonas de un envase lleno de un alimento preparado con ingredientes diversos cuando es irradiado con electrones acelerados. La información obtenida ha permitido obtener ecuaciones para calcular la dosis absorbida por el alimento en un determinado lugar del envase.

### IX.D.1.2 Metodología

Para la realización de este trabajo se utilizó ensaladilla rusa con la siguiente composición (%): mezcla precocida de patatas, zanahorias y guisantes (56), mayonesa (25), atún en aceite (6,5), aceitunas en rodajas (6,25) y huevo cocido picado (6,25), con un pH final de 4,93 y una actividad de agua ( $a_w$ ) de 0,99. La ensaladilla se envasó asépticamente en recipientes de plástico (polipropileno) tipo troncocónico de las siguientes dimensiones: diámetro de la base 13,5 cm, diámetro superior 14,5 cm y altura 15,0 cm. El espacio de cabeza fue de alrededor de 1 cm. Los envases se cerraron por termosellado de una lámina de polietileno y una tapa colocada a presión del mismo material que el cuerpo del envase.

El tratamiento de irradiación se realizó en una planta de funcionamiento continuo (IONISOS-Iberica, Tarancón, Cuenca) con electrones generados por un acelerador con una energía nominal (energía cuántica máxima) de funcionamiento igual o inferior a 10 MeV. Para determinar la radiación absorbida, se colocaron dosímetros de triacetato de celulosa (ASTM, 2000; E1650-97e1 Standard practice for use of cellulose acetate dosimetry systems. Vol. 12.02) que se anclaron (dos en cada lugar elegido) en la superficie y a diferentes profundidades de la masa de ensaladilla (figura 1).

Considerando el envase en disposición vertical, los dosímetros se colocaron a 0 cm (superficie), 3,75 cm, 7,5 cm y 13,5 cm de profundidad, según se muestra en la figura 1. El tratamiento de los envases se realizó siguiendo cuatro pautas: a) envase en disposición vertical en la cinta transportadora y aplicando el haz de electrones de arriba abajo; b) Igual colocación pero dando dos pases por el generador de electrones, volteando el envase tras el primero; c) envase en disposición horizontal y tratamiento igual que en a) y d) igual colocación que en c) pero con dos pases por el generador de electrones y volteo tras el primero. Cada modalidad se realizó al menos cinco veces para obtener los valores medios de la dosis absorbidas en los distintos puntos elegidos en el envase. En todos los casos, las condiciones de funcionamiento de las instalaciones se programaron para aplicar 3 kGy.

El análisis estadístico de los datos se realizó con un programa Statgraphics Plus versión 5.0.

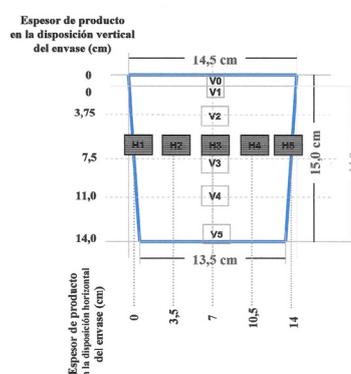


Figura 1. Dimensiones de los envases y distribución de los dosímetros de triacetato de celulosa (disposición vertical □ y horizontal ▨) en la masa de ensaladilla rusa para determinar la dosis absorbida, a distintas profundidades, en los tratamientos con electrones acelerados.

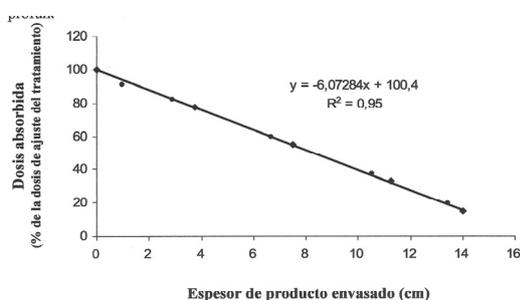
### IX.D.1.3 Resultados y Discusión

Las figura 2 muestra las dosis absorbidas por el alimento en distintos puntos del envase (en posición horizontal o vertical) con tratamiento unilateral. Independientemente de la posición, los resultados fueron prácticamente iguales. La figura 3 muestra los resultados cuando el tratamiento se aplicó bilateralmente (vertical u horizontalmente) con volteo. Al igual que en el tratamiento unilateral, los resultados fueron similares independientemente de la posición. En los tratamientos unilaterales (envase en posición horizontal y vertical), la dosis absorbida (kGy) en distintas zonas del envase fue inversamente proporcional al espesor (cm) del producto expuesto al haz de electrones. Los datos obtenidos han permitido establecer una ecuación de predicción de la dosis absorbida (expresada como porcentaje de la dosis programada en el acelerador) en distintos niveles del envase (y) en función del espesor de producto (x). La ecuación derivada de la figura 2, obtenida combinando los resultados de ambas posiciones, fue:

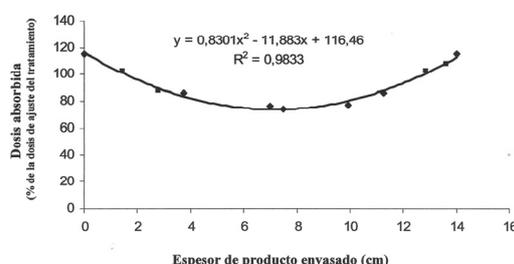
$$y = -6,0728x + 100,4 \quad (R^2 = 0,95) \quad (1)$$

Al combinar los datos procedentes de los tratamientos bilaterales con volteo (en posición horizontal y vertical), se obtuvieron igualmente coeficientes de correlación significativos ( $p < 0.005$ ) entre las mismas variables y su relación se ajustó a la siguiente ecuación, cuya representación gráfica se muestra en la figura 3.

$$y = 0,8301x^2 - 11,883x + 116,46 \quad (R^2 = 0,983) \quad (2)$$

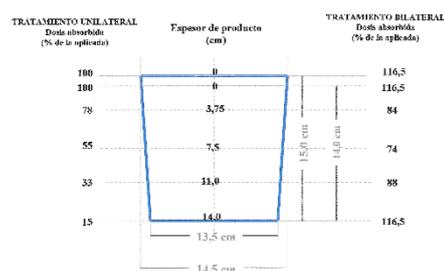


**Figura 2. Dosis absorbida en un tratamiento unilateral (sin volteo) con electrones acelerados a distintas profundidades en envases de ensaladilla rusa dispuestos vertical u horizontalmente**



**Figura 3. Dosis absorbida en un tratamiento bilateral (con volteo) con electrones acelerados a distintas profundidades en envases de ensaladilla rusa dispuestos vertical u horizontalmente**

La figura 4 muestra la dosis absorbida previsible en distintos niveles del envase tratado uni- y bilateralmente con electrones acelerados. Los dosímetros revelaron que los envases irradiados bilateralmente (con volteo) absorbieron en su superficie dosis superiores (alrededor del 116 %) a las que inicialmente se programó el acelerador (p. ej., en este caso, en el que el tratamiento se ajustó a 3 kGy, en la superficie se absorbieron 3,5 kGy). Lógicamente ese exceso de radiación absorbida procede de la aplicación de electrones acelerados en el primer paso del volteo en la primera superficie y del segundo pase en la superficie opuesta.



**Figura 4. Dosis absorbida (porcentaje de la dosis ajustada) después de un tratamiento unilateral y bilateral (con volteo) con radiación beta a distintas profundidades en envases de ensaladilla rusa**

Los productos cárnicos RTE (y otros alimentos similares) que se han mencionado anteriormente no presentan problemas de ajuste de la dosis de radiación para su higienización mediante la aplicación de electrones acelerados porque, una vez loncheados, se envasan en bolsas cuyo espesor final es inferior a 2-3 cm y, por tanto, la dosis absorbida en la superficie opuesta a la de incidencia del haz de electrones es, como han demostrado los dosímetros de control, sólo ligeramente inferior (del orden del 95%) a la programada. El problema se presenta cuando el alimento se comercializa en envases mayores con alturas superiores a los 5-8 cm en los que, como se ha mostrado en el presente artículo, la dosis absorbida va disminuyendo progresivamente de forma lineal (figura 2) si el tratamiento se aplica una sólo vez. El volteo de los envases mejora la eficacia de la radiación pero aún así la dosis absorbida en el centro geométrico es inferior a la que incide en la superficie (figura 3). Es necesario, pues, tener en cuenta este descenso para ajustar las condiciones del tratamiento.

Muchos productos RTE formulados/preparados que contienen trozos/partículas de varios alimentos (guisos típicos/tradicionales, arroces, ensaladas, virutas/trocitos de productos curados, etc.) o salsas/purés (guacamole, tomate, humus, etc.) se comercializan en envases de geometrías diversas (prismática, trocopiramidal, troncocónica, cilíndrica, etc.) y diferentes capacidades (p. ej., entre 0,4 y 1,5 dm<sup>3</sup>). Normalmente, la altura de los envase supera los 7-10 cm (tómese como referencia, por ejemplo, el envase de yogur que tiene unos 6 cm de altura con una capacidad de unos 0,12 dm<sup>3</sup>) pudiendo alcanzar hasta más de 15 cm. El envase utilizado en este estudio era un tronco de cono de 15 cm y la radiación del acelerador se ajustó a 3 kGy. Si se aplica un sólo pase por el acelerador de electrones la dosis absorbida en el centro geométrico (7 cm restando 1 cm de espacio de cabeza) será de acuerdo con la ecuación (1) de un 57,9% (es decir, 1,74 kGy) de la absorbida en la superficie (3 kGy) y a 2/3 de distancia desde la superficie de incidencia del haz de electrones (unos 9 cm) se habrá reducido a un 44% (o sea, 1,32 kGy). En cambio, el volteo permitiría llegar, de acuerdo con la ecuación (2), hasta una dosis absorbida de un 74% (o sea, 2,22 kGy) en el punto más distante de ambas superficies, o sea, en el centro geométrico.

De entre las bacteria patógenas vehiculadas por los alimentos, las más radiorresistentes son *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis y *Listeria monocytogenes*, a las que, según diversas fuentes, se les puede asignar valores típicos de reducción decimal (D) de 0,45-0,58 kGy; 0,32-0,50 kGy y 0,38-0,55 kGy, respectivamente. Asumiendo que se necesitan reducciones de 4D para asegurar que se logre el FSO, se tendría que sólo para aquellas cepas que presentaran valores D de 0,44 kGy o inferiores se conseguiría higienizar el producto hasta el centro geométrico (se requiere 1,74 kGy de energía absorbida) si la aplicación se realiza en un único pase por el acelerador pero, lógicamente, el tratamiento sería insuficiente más allá de dicho centro para cualquier cepa (incluida la más radiolábil de *S. Enteritidis* con un valor de 0,32 kGy) a partir de unos 9 cm de distancia a la superficie. Sin embargo, el volteo (dos pases) mejora la eficacia considerablemente, porque como el centro geométrico es el punto en el que se absorbe menos

energía, prácticamente se conseguiría el FSO en todo el producto, excepto para las cepas de *S. Typhimurium* que presentarían valores D de entre 0,55 y 0,58 kGy, ya que se requieren 2,32 kGy para reducir la tasa de estas cepas hasta niveles seguros. En productos envasados en recipientes con una altura de 12 cm o inferior se conseguiría ya el FSO según predice la ecuación (2). En cualquier caso, siempre se podría aumentar la energía del haz de electrones para asegurar que el producto es inocuo porque con 3 kGy se está irradiando a un 70% por debajo de lo que autorizan (10 kGy) los organismos nacionales e internacionales competentes, incluido el RD 348/2001.

Con este ejemplo se pretende únicamente mostrar la limitada penetración de la radiación de los electrones acelerados. La optimización del proceso completo requiere, además, contemplar otras variables, como la composición del producto, textura, viscosidad, etc. pero, sin lugar a dudas, una de las más destacadas es definir cuál es el microorganismo diana que en los alimentos RTE de  $a_w$  superior a 0,92 suele ser *L. monocytogenes* porque estos alimentos se almacenan bajo refrigeración y esta bacteria es psicrotrofa y, por tanto, además de reducir su nivel hasta niveles definidos, es necesario tener en cuenta que se multiplicará durante el almacenamiento con el fin de optimizar al máximo el tratamiento.

### IX.D.1.4 Conclusiones.

- La dosis absorbida (kGy) a distinta profundidad por alimentos de elevada humedad (alta  $a_w$ ) preparados con ingredientes diversos tratados unilateralmente con electrones acelerados es inversamente proporcional al espesor de producto.
- En alimentos de esta naturaleza (heterogéneos) envasados en recipientes de plástico, de longitud mínima superior a unos 4 cm, es necesario realizar un tratamiento bilateral sucesivo, para conseguir que la dosis absorbida a partir de ese punto supere el 75% de la radiación aplicada.
- En alimentos envasados en recipientes de altura y base superior, por ejemplo a unos 10 - 12 cm, sería conveniente, además del tratamiento bilateral, aumentar la dosis por encima de 3 kGy para garantizar que la radiación absorbida en el centro geométrico permita asegurar la higienización del producto.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto CARNISENUSA (CSD2007-00016) de la convocatoria CONSOLIDER-INGENIO 2010 y con el proyecto RTA 2013-00070-C03-02 del INIA.

## IX.2 Producción científica

### IX.2.1 Artículos en revistas científicas

Velasco, R.; Ordóñez, J.A.; Cambero, M.I. & Cabeza, M.C. 2015. Use of E-beam radiation to eliminate *Listeria monocytogenes* from surface mould cheese. *International Microbiology* 18, 33–40.

Cárcel, J.A., Benedito, J., Cambero, M.I., Cabeza, M.C. & Ordóñez, J.A. 2015. Modeling and optimization of the E-beam treatment of chicken steaks and hamburgers, considering food safety, shelf-life, and sensory quality. *Food and Bioprocess Technology* 96, 133–144.

Soto A.M., García, M.L. & Selgas M.D. 2016. Technological and sensory properties of calcium enriched dry fermented sausages: A Study of the calcium bioavailability. *Journal of Food Quality* 39, 476-486.

Soto, A.M., García, M.L. & Selgas, M.D. 2016. Sodium chloride influence on the technological and sensory properties of hamburgers patties enriched with calcium. *Fleischwirtschaft International* 31, 132-136.

Velasco, R., Ordóñez, J.A., Cabeza, M.C. & Cambero, M.I. 2016. Effect of E-beam sanitation of surface mould cheese on texture and sensory attributes. *Food Science and Technology* 70, 1-8.

Decimo, M., Brasca, M., Ordóñez, J.A. & Cabeza, M.C. 2016. Fatty acids released from cream by psychrotrophs isolated from bovine raw milk. *Journal of Dairy Technology* 70. Doi: 10.1111/1471-0307.12347.

### **IX.2.2 Tesis Doctorales dirigidas**

Título: “Viabilidad tecnológica y biodisponibilidad de diferentes sales de calcio como ingredientes funcionales en productos cárnicos”

Autor: Ana M<sup>a</sup> Soto Carrión

Directores: M. Dolores Selgas Cortecero, M. Luisa García Sanz

Facultad y Universidad: Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

Calificación: Sobresaliente *cum laude*

Año: 2015

Título: “Uso de electrones acelerados para aumentar la vida útil de lomo de cerdo”

Autor: Irene García Márquez

Directores: M. Concepción Cabeza Briales, Juan A. Ordóñez Pereda, M. Isabel Cambero Rodríguez

Facultad y Universidad: Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

Calificación: Sobresaliente *cum laude*

Año: 2015

Título: “Aprovechamiento de derivados de tomate, como fuente de licopeno, en productos cárnicos tradicionales y tratados con radiaciones ionizantes”

Autor: Carmen Gámez Losada

Directores: Marta M. Calvo Rodriguez, M. Dolores Selgas Cortecero, M. Luisa García Sanz

Facultad y Universidad: Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

Calificación: Sobresaliente *cum laude*

\*Mención Europea

Año: 2017

### **IX.2.3 Libros/capítulos de libros**

Selgas, M.D. and García, M.L. (2015). Starter cultures: Yeast. En: Handbook of fermented meat and poultry. 2 ed. Pp: 139-144 Ed: F. Toldrá, Y.H.Hui, I. Astiasarán, J.G. Sebranek & R. Talon. Wiley Blackwell Publs, Iowa, USA. ISBN: 978-1-118-52269-1

## Capítulo X. Biocontrol de *Listeria monocytogenes* y mohos productores de micotoxinas en derivados cárnicos curado-madurados

M. A. Asensio, M.J. Andrade, E. Bermúdez, F. Núñez, M. Rodríguez, A. Rodríguez, J. Delgado, V. Bernáldez, L. Sánchez-Montero, B. Peromingo, A. Alía, P. Padilla, M. Álvarez, I. Martín, F. Lobo, L. Jiménez, J.J. Córdoba

*Higiene y Seguridad Alimentaria. Instituto Universitario de Carne y Productos Cárnicos (IProCar). Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. 10003-Cáceres.*

### X.1 Desarrollo en investigación

#### X.1.1 Introducción

En los derivados cárnicos curado-madurados la adición de sal y la reducción del contenido acuoso durante la etapa de secado-maduración provoca una disminución de la actividad de agua ( $a_w$ ) hasta valores por debajo del límite de crecimiento de la mayoría de los microorganismos patógenos, lo que hace que sean productos generalmente reconocidos como seguros desde el punto de vista microbiológico. Sin embargo, en este tipo de productos es preocupante la presencia de *Listeria monocytogenes* y el desarrollo de mohos toxigénicos durante la etapa de secado-maduración. *L. monocytogenes* es una bacteria ampliamente distribuida en el ambiente de las industrias cárnicas, por lo que puede llegar a los derivados cárnicos curado-madurados en las operaciones finales de deshuesado, loncheado y envasado lo que supone un peligro sanitario. Aunque en general las condiciones de  $a_w$  de estos productos no favorecen el desarrollo de *L. monocytogenes*, podría incluso producirse multiplicación de este patógeno durante el almacenamiento de los productos loncheados en los casos en los que la  $a_w$  sea superior a la de su límite de crecimiento.

En lo que respecta a los mohos que crecen en la superficie de los derivados cárnicos curado-madurados, la mayoría de ellos influyen positivamente en el desarrollo del sabor y del aroma de estos productos (Martín et al., 2006; Int. J. Food Microbiol. 110, 8-18). Sin embargo pueden encontrarse cepas toxigénicas capaces de producir micotoxinas durante el tiempo de maduración (Rodríguez et al., 2012; Meat Sci. 92, 728-734).

Es necesario pues, desarrollar estrategias de control de *L. monocytogenes* y mohos toxigénicos en derivados cárnicos curado-madurados que minimicen los peligros sanitarios de estos patógenos. Entre estas estrategias están la aplicación de métodos de biocontrol basadas en la combinación de modificaciones de condiciones de temperatura y humedad relativa de maduración y almacenamiento, junto con la utilización de cultivos protectores de microorganismos no patógenos o de péptidos con actividad antimicrobiana. La aplicación de estas estrategias exige evaluar el efecto en la inhibición de estos microorganismos patógenos y además conocer cómo afectan estos tratamientos a la expresión de factores de virulencia en *L. monocytogenes* o de producción de toxinas en los mohos que sobrevivan a sus efectos.

Los objetivos del Grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Extremadura son desarrollar estrategias de biocontrol de *L. monocytogenes* y mohos toxigénicos en derivados cárnicos

curado-madurados y evaluar el efecto de estos tratamientos sobre la viabilidad de estos patógenos y sobre la expresión de genes de virulencia, adaptación al estrés y producción de micotoxinas.

## **X.1.2 Metodología**

### **X.1.2.1 Biocontrol de *L. monocytogenes***

#### **Caracterización de cepas de *L. monocytogenes* en industrias de jamón curado**

El estudio de biocontrol se realizó con cepas de *L. monocytogenes* patrón y aisladas de industrias cárnicas. Las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de superficies de equipos y utensilios en zona de deshuesado, loncheado y envasado de jamón curado se habían caracterizado previamente a nivel de serotipos mediante PCR múltiple. Con el objetivo de incrementar la rapidez y sensibilidad en el serotipado se ha diseñado un protocolo de PCR en tiempo real múltiple mediante metodología TaqMan.

#### **Efecto de la sal y reducción de la $a_w$ en el crecimiento y expresión de genes de virulencia y de adaptación al estrés de *L. monocytogenes***

Se realizó en medio de carne liofilizada (Rodríguez et al. 2014; Int. J. Food Microbiol. 178, 113–119) en el que se adicionó hasta un 4% de NaCl y distintas concentraciones de glicerol para conseguir niveles de  $a_w$  con y sin NaCl de 0,96, 0,94 y 0,92. En estas condiciones se evaluó el crecimiento y expresión de genes de virulencia (*plcA*, *hly*, *iap*) y de adaptación al estrés (*sigB*) de los serotipos más frecuentes en la industria cárnica (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) a dos temperaturas (7°C y 15°C).

#### **Evaluación y selección de levaduras con acción anti-*L. monocytogenes***

La evaluación y selección de levaduras aisladas de jamón curado con actividad anti-*L. monocytogenes* se realizó en medio de cultivo de jamón curado y en lonchas de jamón curado a dos diferentes valores de  $a_w$  (0,95 y 0,93) incubadas a 7°C. En todos los casos se inocularon de forma conjunta las levaduras ensayadas y cada una de las cepas de *L. monocytogenes* de los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b.

#### **Evaluación de hidrolizados proteicos de huevo y lactosuero con acción anti-*L. monocytogenes***

Se utilizaron hidrolizados proteicos hipoalergénicos de proteínas de huevo y de lactosuero suministrados por el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-CSIC, Madrid). La evaluación se realizó en medio elaborado con jamón liofilizado y en lonchas de jamón a  $a_w$  de 0,95 y 0,93 y a 7°C de temperatura.

### **X.1.2.2 Biocontrol de mohos toxigénicos**

#### **Efecto de las condiciones ambientales en el crecimiento de mohos toxigénicos y en la producción de aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA) y ácido ciclopiazónico (ACP)**

Se llevó a cabo en medios de cultivo elaborados con 3% de carne, jamón o embutidos previamente liofilizados, 2 % de agar y la cantidad de glicerol necesaria para alcanzar las  $a_w$  deseadas. Los experimentos preliminares se realizaron con 4 cepas productoras de cada micotoxina a distintas combinaciones de temperatura (25, 20 y 15°C) y de  $a_w$  (0,95, 0,90 y 0,85). La extracción de micotoxinas se realizó siguiendo los protocolos de Peromingo et al. (2016; Meat Sci. 122, 76–83) para AFs; de Rodríguez et al. (2015; Int. J. Food. Microbiol. 194, 71-77) para OTA y el protocolo QuEChERS descrito por Peromingo et al. (2017b; Food Chem. enviado), para ACP. La evaluación de los diferentes métodos de extracción se llevó a cabo realizando ensayos de recuperación de las diferentes micotoxinas. Las micotoxinas se detectaron y cuantificaron mediante uHPLC-MS.

### **Efecto de agentes de biocontrol con actividad antifúngica en el crecimiento de mohos toxigénicos y en la producción de AFs, OTA y ACP**

Los agentes de biocontrol aislados de productos cárnicos curados utilizados han sido la cepa de *Penicillium chrysogenum* RP42C productora de la proteína antifúngica PgAFP (Delgado y col., 2015, Int. J. Food. Microbiol. 205, 23-29), una cepa de *Debaryomyces hansenii* y las bacterias acidoláticas *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus reuteri*. Se realizaron diversos experimentos utilizando medios de cultivo elaborados con carne y productos cárnicos (descritos anteriormente), así como lonchas de salchichón y de jamón curado incubados en condiciones de temperatura y  $a_w$  habituales durante la maduración de derivados cárnicos curado-madurados. Posteriormente se llevaron a cabo ensayos en embutidos inoculados con los mohos toxigénicos y con los diferentes agentes de biocontrol madurados en planta piloto. La detección y cuantificación de micotoxinas se realizó con los métodos indicados en el apartado anterior.

### **Efecto de las condiciones ambientales y de los agentes de biocontrol con actividad antifúngica en la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de AFs, OTA y ACP**

Se han realizado estudios de la expresión relativa temporal de los genes más relevantes implicados en la biosíntesis de estas micotoxinas, *otapks* y *otanps* para OTA (Rodríguez et al., 2014; Int. J. Food. Microbiol. 178, 113-119), *aflR*, *aflS* y *aflP* para AF (Peromingo et al., 2017d; Food Microbiol. 67, 31-40), y *dmaT*, *pks-nrps* y *mfs-1* para ACP (Peromingo et al. 2017a) en las diferentes condiciones ambientales y en presencia de los agentes de biocontrol. El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR.

## **X.1.3 Resultados y Discusión**

### **X.1.3.1 Desarrollo de método de PCR en tiempo real para el serotipado de *L. monocytogenes***

Se desarrolló un protocolo de PCR múltiple para diferenciar los serotipos de *L. monocytogenes* más frecuentemente aislados en industrias cárnicas (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) a partir de los genes *lmo0737* para los serotipos 1/2a y 1/2c y ORF2110 para el serotipo 4b (Doumith et al., 2004. J. Clin. Microbiol. 42, 3819-3822), *lmo0306* para el serotipo 1/2c (Nho et al., 2015. J. Appl. Microbiol. 119, 845-852) y *gltA/gltB* para el serotipo 1/2b (Lei et al., 2001, J. Bacteriol. 183, 1133-1139). El método permite detectar e identificar de forma sensible y específica los anteriores serotipos a partir de mezclas de los mismos con niveles tan bajos como el 10%.

### **X.1.3.2 Efecto de la sal y reducción de la $a_w$ en el crecimiento y expresión de genes de virulencia y de adaptación al estrés de *L. monocytogenes***

La combinación de  $a_w$ , concentración de sal y temperatura afecta al crecimiento de *L. monocytogenes* en medio de jamón. En general a la misma  $a_w$  el crecimiento es estimulado por la presencia de NaCl, especialmente a los valores de  $a_w$  más bajos de 0,94 y 0,92 (Figura 1).

Respecto a la expresión génica se produce una mayor expresión de los genes de virulencia *plcA*, *hly* e *iap* cuando la  $a_w$  desciende con glicerol en lugar de sal (Alía et al., 2017), simulando condiciones de reducción de la  $a_w$  con menos sal y un mayor secado. Sin embargo, hay una mayor expresión del gen de adaptación al estrés *SigB* cuando la  $a_w$  desciende con NaCl (Alía et al. 2017). Este aspecto puede ser de extraordinaria relevancia en jamón curado loncheado, especialmente ante la tendencia actual a la reducción de sal, dado que en los jamones con menos sal se puede estar potenciando la expresión de genes de virulencia de las cepas de *L. monocytogenes* que permanezcan vivas, necesitando tratamientos adicionales para minimizar su desarrollo y la expresión génica.

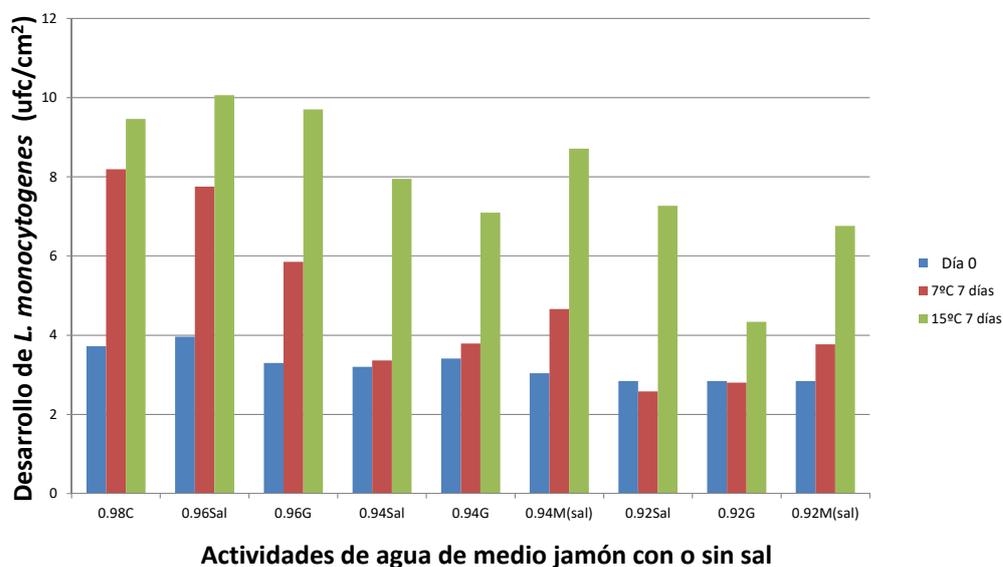


Figura 1. Crecimiento de *L. monocytogenes* en medio de jamón a distintos valores de  $a_w$  (0,96, 0,94 y 0,92) con NaCl (Sal), glicerol (G) y NaCl+glicerol (M). El medio sin sal y glicerol a  $a_w$  de 0,98 se utilizó como control.

### X.1.3.3 Evaluación y selección de levaduras con acción anti-*L. monocytogenes*

La mayoría de las levaduras ensayadas no tienen efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes* e incluso algunas de ellas potencia su desarrollo tanto en medio de jamón como en lonchas de jamón. No obstante, 4 de las cepas evaluadas de *D. hansenii* provocan reducciones de alrededor de un ciclo logarítmico de *L. monocytogenes* a valores de  $a_w$  de 0,95 y 0,93. Esta inhibición parece deberse a una competición por nutrientes. Las cepas seleccionadas podrían utilizarse como cultivos protectores en tratamientos combinados con otros métodos de biocontrol en jamón curado loncheado para inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes*.

### X.1.3.4 Evaluación del efecto anti-*L. monocytogenes* de hidrolizados proteicos de proteínas de huevo y lactosuero.

Los hidrolizados de ovomucoide y ovoalbumina con neutrasa y los de lactosuero con pepsina provocan reducciones de entre 1 y 2 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes*, destacando la actividad del hidrolizado de ovomucoide con neutrasa (Figura 2). Este hidrolizado podría ser utilizado en combinación con otras estrategias para el control de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado.

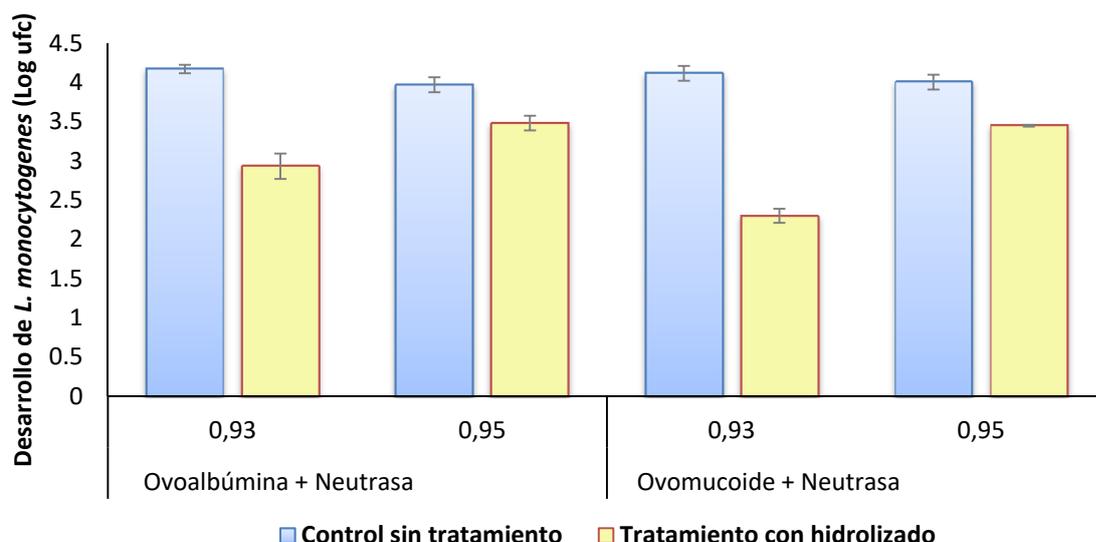


Figura 2. Efecto del tratamiento con hidrolizados de ovoalbúmina y ovomucoide con neutrasa sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en un medio de jamón curado.

### X.1.3.5 Estudio de la influencia de la $a_w$ y la temperatura en el crecimiento de mohos y la producción de OTA, AFs y ACP en modelos elaborados a partir de productos cárnicos (carne fresca, jamón curado y salchichón).

Se detectaron diferencias significativas entre las 3  $a_w$  estudiadas en el crecimiento de todos los mohos toxigénicos, comprobándose que el crecimiento era menor a medida que disminuía la  $a_w$ . Aunque en algunas cepas no hubo diferencias significativas entre los medios de cultivo, en la mayoría de los mohos se produjo un mayor crecimiento en el medio elaborado con jamón curado o salchichón (Peromingo et al., 2016; Meat Sci. 122, 76-83; Peromingo et al. 2017a; Int. J. Food. Microbiol. Enviado).

La producción de AFs y ACP, en general, fue mayor cuanto mayor era la  $a_w$  (Figura 3) y en el caso del ACP estaba influida por la composición del medio (Peromingo et al., 2016, 2017a). Sin embargo la producción de OTA fue mayor cuando las cepas estaban en condiciones de mayor estrés hídrico (Rodríguez et al., 2015).

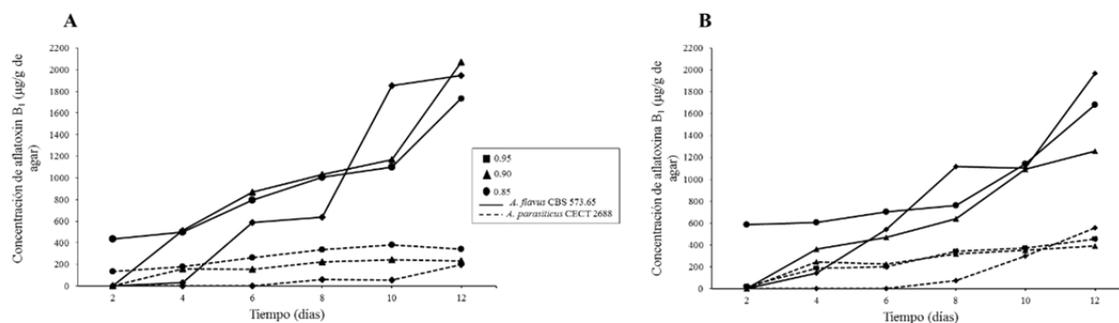


Figura 3. Efecto de la  $a_w$  sobre la producción de aflatoxina B<sub>1</sub> por *Aspergillus parasiticus* CECT 2688 y *Aspergillus flavus* CBS 573.65 en medio elaborado con carne (A) y en medio elaborado con jamón curado (B) durante 12 días de incubación a 25 °C.

### X.1.3.6 Estudio del efecto de los agentes de biocontrol en los mohos productores de micotoxinas en modelos elaborados a partir de productos cárnicos.

Se ha estudiado el efecto de diversos microorganismos con actividad antifúngica (mohos, levaduras y bacterias ácido-lácticas) aislados de productos cárnicos curados, sobre el crecimiento de mohos y la producción de AF, OTA y CPA en sistemas modelo con medios de cultivo elaborados con carne y productos cárnicos, así como lonchas de salchichón y de jamón curado y finalmente se llevaron a cabo ensayos en planta piloto madurando con embutidos. De forma general, en los ensayos en sistemas modelo, se observó que cuanto menor era la  $a_w$ , la capacidad inhibitoria de *D. hansenii* era mayor, además las levaduras fueron capaces de reducir hasta un 26% el crecimiento del moho y se produjo una disminución de hasta el 92% de la biosíntesis de OTA (Peromingo et al., 2017c; Int. J. Food. Microbiol. En revisión). También se observó que se obtenían mejores resultados cuando se utilizaban conjuntamente las cepas de *D. hansenii* y *P. chrysogenum* (Delgado, 2016. Tesis doctoral). No obstante, en los estudios preliminares realizados en planta piloto se ha comprobado una mayor reducción en la producción de micotoxinas (90% de OTA y 95% de CPA) en los lotes inoculados sólo con *P. chrysogenum* RP42C que en los lotes inoculados conjuntamente con los dos agentes de biocontrol, aunque el efecto no es idéntico en diferentes cepas de la misma especie de moho toxigénico.

Las bacterias acidolácticas, aisladas de embutidos curado-madurados estudiadas, *P. acidilactici*, *E. faecium* y *L. reuteri* no producen un efecto significativo en la disminución del crecimiento de los mohos. Sin embargo algunas de las cepas de *E. faecium* han sido capaces de reducir los niveles de OTA (Flores, 2017. Trabajo fin de Máster) y de ACP (Cebrián, 2017. Trabajo fin de Grado) tras 21 días de incubación (Figura 4) en los medios de cultivos elaborados a partir de productos cárnicos. Además, la utilización combinada de *D. hansenii* y *E. faecium* produce una reducción más importante de la producción de micotoxinas con respecto al moho control (Cebrián, 2017).

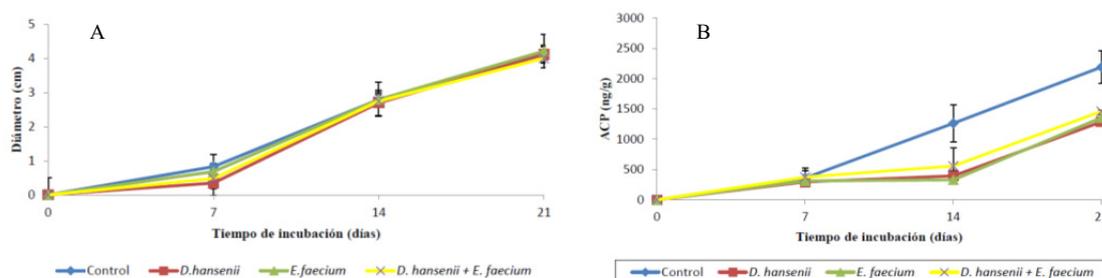


Figura 4. Efecto de *Enterococcus faecium* y *Debaryomyces hansenii* sobre el crecimiento (A) y producción de CPA (B) por *Penicillium griseofulvum* CECT 2919 en medio elaborado con salchichón durante 21 días de incubación a 15 °C.

### X.1.3.7 Estudio del efecto de las condiciones ambientales y de agentes de biocontrol en la expresión génica y la producción de OTA, AF y ACP en modelos elaborados a partir de productos cárnicos (carne fresca, jamón curado y salchichón).

Se han realizado estudios de la expresión relativa temporal de los genes más relevantes implicados en la biosíntesis de estas micotoxinas, *otapks* y *otanps* para OTA (Rodríguez et al, 2014; Int. J. Food. Microbiol. 178, 113-119), *aflR*, *aflS* y *aflP* para AF (Peromingo et al., 2017d; Food Microbiol. 67, 31-40), y *dmaT*, *pks-nrps* y *mfs-1* para ACP (Peromingo et al. 2017a), encontrando una alta correlación con la producción de las micotoxinas. Este hecho es muy importante desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, pues permitiría la detección y cuantificación precoz de mohos toxigénicos viables antes de la producción de la micotoxina en las condiciones ecológicas relacionadas con el procesado de los productos

cárnicos curados. Esto podría permitir adoptar medidas preventivas y correctoras aplicables en la industria cárnica para evitar la acumulación de OTA, AF y CPA en los productos cárnicos curado-madurados.

### X.1.4 Conclusiones

Estos resultados son prometedores, aunque dado que no se produce una inhibición total ni de *L. monocytogenes* ni de la producción de micotoxinas con ninguna de las medidas aplicadas individualmente, sería necesario aplicarlas de forma conjunta. En el caso de *L. monocytogenes* la combinación del descenso de  $a_w$ , aplicación de cultivos protectores de levaduras e hidrolizados proteicos hipoalergénicos sería de gran utilidad para controlar esta bacteria patógena en jamón curado loncheado, evitando el correspondiente peligro sanitario. El método de PCR en tiempo real múltiple desarrollado permite realizar el serotipado de cepas de *L. monocytogenes* aisladas en la industria cárnica, siendo de gran utilidad para caracterizar fuentes de contaminación de este patógeno.

Para inhibir el desarrollo de mohos toxigénicos y la producción de micotoxinas, puede ser efectiva la combinación de la utilización de mohos no toxigénicos, levaduras y bacterias lácticas en un cultivo protector mixto, junto con el uso de condiciones ambientales más adecuadas para favorecer el desarrollo de estos microorganismos frente a los mohos toxigénicos.

### X.1.5 Financiación

Estos trabajos han sido financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), la Junta de Extremadura y el FEDER (AGL2013-45729-P, AGL2016-80209-P, INIA- RTA-2013-00070-C03-03, IB16149, IB16045, GR15108). B. Peromingo es beneficiaria de una beca predoctoral (BES-2014-069484), A. Alía es beneficiario de una beca predoctoral de la Junta de Extremadura (PD16023) P. Padilla de una ayuda del Sistema Nacional de Garantía Juvenil (PEJ2014-P-0057) y la Dra A. Rodríguez de un contrato de investigación Juan de la Cierva-Incorporación (IJCI-2014-20666), del Ministerio de Economía y Competitividad. F. Lobo está contratado con financiación de Banco Santander-UEX. Apoyo técnico proporcionado por el Servicio de Innovación y Análisis de Productos Alimenticios de Origen Animal de SAIUEX (financiado por la UEX, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER y FSE).

## X.2 Producción científica

### X.2.1 Artículos en revistas científicas

Alía, A., Andrade, M.J., Rodríguez, A., Reyes-Prieto, M., Bernáldez, V., Córdoba, J.J. 2016. Identification and control of moulds responsible for black spot spoilage in dry-cured ham. *Meat Science*, 122, 16-24.

Alía A., Rodríguez A., Andrade M.J., Gómez F.M., Córdoba J.J. 2017. Effect of ionic and non-ionic water activity and storage temperature on growth and gene expression by *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham. *Food Microbiology*, En revisión.

Al-Saad, L.A., Al-Badran, A.I., Al-Jumayli, S.A., Magan, N., Rodríguez, A. 2016. Impact of bacterial biocontrol agents on aflatoxin biosynthetic genes, *afID* and *afIR* expression, and phenotypic aflatoxin B<sub>1</sub> production by *Aspergillus flavus* under different environmental and nutritional regimes. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 123-129.

- Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Andrade, M.J., Alía, A., Rodríguez, A. 2017. Selection of reference genes to quantify relative expression of ochratoxin A-related genes by *Penicillium nordicum* in dry-cured ham. *Food Microbiology* 68, 104-111.
- Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Magan, N., Peromingo, B., Rodríguez, A. 2017. The influence of ecophysiological factors on growth, *afIR* gene expression and aflatoxin B<sub>1</sub> production by a type strain of *Aspergillus flavus*. *LWT- Food Science and Technology*, 83, 283-291.
- Bernáldez, V., Rodríguez, A., Rodríguez, M., Sánchez-Montero, L., Córdoba, J.J. 2017. Evaluation of different RNA extraction methods of filamentous fungi in various food matrices. *LWT- Food Science and Technology*, 78, 47-53.
- Casquete, R., Rodríguez, A., Hernández, A., Martín, A., Bartolomé, T., Córdoba, J.J., Córdoba, M.G. 2017. Occurrence of toxigenic moulds and mycotoxins during smoked paprika elaboration. *Journal of Food Protection*, en prensa.
- Cordero, M., Córdoba, J.J., Bernáldez, V., Rodríguez, M., Rodríguez, A. 2015. Quantification of *Penicillium nalgiovense* on dry-cured sausage 'salchichón' using a SYBR Green-based real-time PCR. *Food Analytical Methods*, 8, 1582-1590.
- Delgado, J., Acosta, R., Rodríguez-Martín, A., Bermúdez, E., Núñez, R., Asensio, M.A. 2015. Growth inhibition and stability of PgAFP from *Penicillium chrysogenum* against fungi common on dry-ripened meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 205: 23-29.
- Delgado, J., Owens, R.A., Doyle, S., Asensio, M.A., Núñez, F. 2015. Impact of the antifungal protein PgAFP from *Penicillium chrysogenum* on the protein profile in *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 8701-8715.
- Delgado, J., Owens, R.A., Doyle, S., Asensio, M.A., Núñez, F. 2016. Increased chitin biosynthesis contributes to the resistance of *Penicillium polonicum* against the antifungal protein PgAFP. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 371-383.
- Delgado, J., Owens, R.A., Doyle, S., Asensio, M.A., Núñez, F. 2016. Antifungal proteins from moulds: analytical tools and potential application to dry-ripened foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 6991-7000.
- Delgado, J., Peromingo, B., Núñez F., Asensio, M.A. 2016. Use of antifungal proteins for biocontrol of toxigenic molds on dry-ripened cheese and meats. *Current Opinion in Food Science*, 11: 40-45.
- Delgado, J., Owens, R.A., Doyle, S., Núñez, F., Asensio, M.A. 2017. Quantitative proteomics reveals new insights into calcium-mediated resistance mechanisms in *Aspergillus flavus* against the antifungal protein PgAFP in cheese. *Food Microbiology*, 66: 1-10.
- Lozano-Ojalvo, D., Rodríguez, A., Cordero, M., Bernáldez, V., Reyes-Prieto, M., Córdoba, J.J. 2015. Characterisation of spoilage mould responsible for black spots in dry-cured fermented sausages. *Meat Science*, 100, 283-290.
- Medina, A., Akbar, A., Baazeem, A., Rodríguez, A., Magan, N. 2017. Climate change, food security and mycotoxins: do we know enough? *Fungal Biology Reviews*, 31, 143-154.
- Medina, A., Gilbert, M.K., Mack, B.M., Obrian, G., Rodríguez, A., Bhatnagar, D., Payne, G., Magan, N. 2017. Interactions between water activity and temperature on the *Aspergillus flavus* transcriptome and aflatoxin B<sub>1</sub> production. *International Journal of Food Microbiology*, 256, 36-44.
- Medina, A., Mohale, S., Rodríguez-Sixtos, A., Samsundin, N., Rodríguez, A., Magan, N. 2017. Biocontrol of mycotoxins: dynamics and mechanisms of action. *Current Opinion in Food Science*, en prensa.
- Medina, A., Rodríguez, A., Magan, N. 2015. Climate change and mycotoxigenic fungi: impacts on mycotoxin production. *Current Opinion in Food Science*, 5, 99-104.

- Medina, A., Rodríguez, A., Sultan, Y., Magan, N. 2015. Climate change factors and *A. flavus*: effects on gene expression, growth and aflatoxin production. *World Mycotoxin Journal*, 8, 171-179.
- Núñez, F., Lara, M.S., Peromingo, B., Delgado, J., Sánchez-Montero, L., Andrade, M.J. 2015. Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dry-fermented sausages. *Food Microbiology*, 46, 114-120.
- Peromingo, B., Núñez, F., Rodríguez, A., Alía, A., Andrade, M.J. 2017c. Potential of yeasts isolated from dry-cured ham to control ochratoxin A production in meat models. *International Journal of Food Microbiology*. En revisión.
- Peromingo, B., Rodríguez, A., Bernáldez, V., Delgado, J., Rodríguez, M. 2016. Effect of temperature and water activity on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on cured meat model systems. *Meat Science*, 122, 76-83.
- Peromingo, B., Rodríguez, A., Delgado, J., Córdoba, J.J., Rodríguez, M. 2017a; Relationship between cyclopiazonic acid production and gene expression in *Penicillium griseofulvum* under different environmental conditions in dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*. Enviado.
- Peromingo, B., Rodríguez, M., Delgado, J., Andrade, M.J., Rodríguez, A. 2017d. Gene expression as a good indicator of aflatoxin contamination in dry-cured ham. *Food Microbiology*, 67, 31-40.
- Peromingo, B., Rodríguez, M., Núñez, F., Silva, A., Rodríguez, A. 2017b. Sensitive determination of cyclopiazonic acid in dry-cured ham using a QuEChERS method and uHPLC-MS/MS. *Food Chem.* Enviado.
- Rodríguez, A., Bernáldez, V., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Núñez, F., Córdoba, J.J. 2015. Effect of selected protective cultures on ochratoxin A accumulation in dry-cured Iberian ham during its ripening process. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 923-928.
- Rodríguez, A., Capela, D., Medina, A., Córdoba, J.J., Magan, N. 2015. Relationship between ecophysiological factors, growth and ochratoxin A contamination of dry-cured sausage based matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 194, 71-77.
- Rodríguez, A., Gordillo, R., Andrade, M.J., Córdoba, J.J., Rodríguez, M. 2016. Development of an efficient real-time PCR assay to quantify enterotoxin-producing staphylococci in meat products. *Food Control*, 60, 302-308.
- Rodríguez, A., Magan, N., Medina, A. 2016. Evaluation of the risk of fungal spoilage when substituting sucrose with commercial purified Stevia glycosides in sweetened bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, 231, 42-47.
- Rodríguez, A., Medina, A., Córdoba, J.J., Magan, N. 2016. Development of a HOG-based real-time PCR method to detect stress response changes in mycotoxigenic moulds. *Food Microbiology*, 57, 109-115.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Córdoba, J.J. 2015. Detection of filamentous fungi in foods. *Current Opinion in Food Science*, 5, 36-42.
- Samsudin, N.I.P., Rodríguez, A., Medina, A., Magan, N. 2017. Efficacy of fungal and bacterial antagonists for controlling growth, *FUM1* gene expression and fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium verticillioides* on maize cobs of different ripening stages. *International Journal of Food Microbiology*, 246, 72-79.
- Vipotnik, Z., Rodríguez, A., Rodrigues, P. 2017. *Aspergillus westerdijkiae* as a major ochratoxin A risk in dry-cured ham based-media. *International Journal of Food Microbiology*, 244, 241-251.

### X.2.2 Tesis Doctorales dirigidas

Control de mohos toxigénicos mediante la proteína PgAFP. Influencia en el metabolismo, proteoma y síntesis de micotoxinas. Josué Delgado Perón. Universidad de Extremadura. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. 2016. Apto *Cum Laude* por unanimidad.

Desarrollo de métodos de PCR en tiempo real de transcripción inversa para la cuantificación de mohos. M<sup>a</sup> Victoria Bernáldez Rey. Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. 2017. *Apto Cum Laude*.

### X.2.3 Libros/capítulos de libros

Andrade, M.J., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., Rodríguez, A. 2017. Targeting other mycotoxin biosynthetic genes. En *Mycotoxigenic fungi: Methods and Protocols*, 1542. pp. 215-235. Springer Science+Business Media LLC. Nueva York; EEUU. I.S.B.N. 978-1-4939-6707-0

Andrade, M.J., Rodríguez, M., Rodríguez, A., Córdoba, J.J. 2017. *Candida*. En *Laboratory Models for Foodborne Infections*. Capítulo 32. Pp. 497-510. Ed.: CRC Press. Boca Raton, FL, USA. I.S.B.N. 978-1-4987-2167-7.

Bermúdez, E., Núñez, F., Delgado, J., Asensio, M.A. 2016. *Penicillium* and *Talaromyces*. En *Laboratory models for foodborne infections*. Don Liu (Ed.) Taylor and Francis, CRC Press (2016). ISBN: 978-1-4987-2167-7.

Delgado, J., Asensio, M.A. y Núñez, F. 2017. Chapter 89. Ochratoxins. En *Handbook of Foodborne Diseases*. Don Liu (Ed.) CRC Press, Boca Raton, USA. ISBN: 1138036307.

Medina, A., Rodríguez, A., Magan, N. 2015. Changes in environmental factors driven by climate change: effects on the ecophysiology of mycotoxigenic fungi. En *Climate Change and Mycotoxins*. Páginas 71-90. De Gruyter. I.S.B.N. 978-3-11-033361-9.

Rodríguez, A., Andrade, M.J., Rodríguez, M., Córdoba, J.J. 2015. Detection of mycotoxin-producing moulds and mycotoxins in foods. En *Microbial Food Safety and Preservation Techniques Chapter 11*. Pages: 191-213. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. I.S.B.N. 978-1-4665-9306-0.

Rodríguez, A., Córdoba, J.J., Rodríguez, M., Andrade, M.J. 2017. Multiplex detection of toxigenic *Penicillium* species. En *Mycotoxigenic fungi. Methods and protocols*. Páginas 293-309. Springer Science+Business Media, Nueva York; EEUU. I.S.B.N. 978-1-4939-6707-0

Rodríguez, A., Córdoba, J.J., Rodríguez, M., Andrade, M.J. 2017. Multiplex detection of toxigenic *Penicillium* species. En *Mycotoxigenic fungi: Methods and Protocols*. Volumen 1542, pp. 293-309. Ed.: Springer Science+Business Media LLC.

Rodríguez, A., Patriarca, A., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Córdoba, J.J. 2017. *Alternaria*. En *Laboratory Models for Foodborne Infections*. Chapter 30. Pp. 441-454. Ed.: CRC Press. Boca Raton, FL, USA. I.S.B.N. 978-1-4987-2167-7.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., Andrade, M.J. 2015. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. En *PCR Primer Design, Methods in Molecular Biology*, 1275, pp. 31-56. Ed.: Springer Science+Business Media, New York. I.S.B.N. 978-1-4939-2365-6.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Herrera, M., Ariño, A., Córdoba, J.J. 2015. T-2, HT-2 and diacetoxyscirpenol toxins from *Fusarium*. En *Manual of Security Sensitive Microbes and Toxins*. Chapter 47. Pages: 545-557. Ed: Taylor and Francis.

Rodríguez, M., Rodríguez, A., Andrade, M.J., Bermúdez, E., Córdoba, J.J. 2017. *Staphylococcus*. En Laboratory Models for Foodborne Infections. Pp. 209-221. Ed.: CRC Press. Boca Raton, FL, USA. I.S.B.N. 978-1-4987-2167-7.

### **X.3 Congresos, Jornadas y Reuniones**

#### **X.3.1 Ponencias invitadas**

Ponente: Juan J. Córdoba

Ponencia: Uso de cultivos protectores en productos cárnicos

Congreso/Jornada/Reunión: XX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

Lugar y fecha: León, 2016

Ponente: Alicia Rodríguez

Ponencia: Biocontrol de mohos productores de ocratoxina A (OTA) en derivados cárnicos curado-madurados: soluciones a la exportación a países con límite de contenido en OTA

Congreso/Jornada/Reunión: Jornada ANICE – PROCARSE sobre “Seguridad Microbiológica e Higiene de los Productos Cárnicos

Lugar y fecha: Madrid, 2016

Ponente: Miguel Ángel Asensio

Ponencia: Control de ácaros en derivados cárnicos curado-madurados

Congreso/Jornada/Reunión: Jornada ANICE – PROCARSE sobre “Seguridad Microbiológica e Higiene de los Productos Cárnicos

Lugar y fecha: Madrid, 2016

Ponente: Josué Delgado

Ponencia: Estrategias de control para mohos toxigénicos durante la maduración del jamón.

Congreso/Jornada/Reunión: IX Congreso Mundial del Jamón Curado

Lugar y fecha: Toledo, 2017

#### **X.3.2 Actividades**

Organización de a reunión final de la Red CONSOLIDER PROCARSE. Cáceres, 4-5 de octubre de 2017.



## Capítulo XI. Control de *Listeria monocytogenes* en la industria cárnica

M.C. Rota, M. Labrador, C., Escolar, C., S. Bayarri, P., Conchello, P., Ariño, A., Yangüela, J. y A. Herrera

*Nutrición y Bromatología. Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA). Facultad de Veterinaria. 50013-Zaragoza.*

### XI.1 Desarrollos en investigación

#### XI.1.1 Introducción

*Listeria monocytogenes* es un patógeno alimentario con alta tasa de mortalidad en países desarrollados, siendo los alimentos RTE los de mayor riesgo, como los productos cárnicos. Su ubicuidad, carácter psicrótrofo y su capacidad de formación de biofilm, le permite sobrevivir en condiciones ambientales adversas y persistir en superficies de la industria alimentaria, contaminar los alimentos durante el procesado y multiplicarse durante su vida útil. Para garantizar su control y reducir el riesgo de listeriosis, este patógeno debe ser detectado y cuantificado de forma eficaz, por lo que la industria cárnica precisa métodos rápidos, sencillos y precisos. La caracterización genética de las cepas de *L. monocytogenes*, aisladas del proceso de fabricación de productos cárnicos, permite conocer los nichos donde se alberga y poder actuar para su eliminación. Por otro lado, el estudio de determinantes genéticos de resistencia a antibióticos (RAM) en cepas de *Listeria* spp. de este origen contribuye a conocer la transmisión de este riesgo emergente a través de la cadena alimentaria.

#### XI.1.2 Metodología

**Puesta punto y aplicación de la Impedancimetría para la detección de *L. monocytogenes* en la industria cárnica.** Para la puesta a punto del método se siguieron las directrices ISO 16140:2003. El Nivel de Detección Relativo (LOD50) se realizó inoculando experimentalmente muestras de jamón curado con 3 niveles de contaminación, detección del patógeno mediante los métodos de referencia EN/ISO 11290-1 e impedancimetría (*BacTrac 4300, Sy-Lab*) e identificación en los medios OCLA, RAPID'L.mono y kit RiboFlow *Listeria* Twin. Los resultados se analizaron con el test de *Spearman-Kärber* (AOAC, 2006). La sensibilidad, especificidad y eficacia relativa, se estudió mediante el análisis de muestras de jamón curado (n=93) inoculadas con *L. monocytogenes*, mezcla de las especies *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. welshimeri* y sin contaminar, por ambos métodos. La inclusividad y exclusividad se estudió en cultivo puro con cepas *L. monocytogenes* (n=6), *L. innocua* (n=3), *L. welshimeri* (n=1), y *Enterococcus durans* (n=1). Posteriormente, se aplicó el método de la Impedancia al análisis de muestras comerciales de jamón curado (n=190 /33 lotes de fabricación) siendo las muestras positivas confirmadas por PCR a tiempo real (kit iQ-Check *Listeria monocytogenes* II; Bio-Rad) y al análisis de superficies (n=284 /zona de deshuesado y loncheado) tomadas antes y después de la limpieza y desinfección, en diferentes días y épocas del año. La toma de muestras se realizó siguiendo las directrices ISO 18593:2013 y la guía del Laboratorio de Referencia de la UE de *L. monocytogenes*.

**Puesta a punto y aplicación de un método qPCR a tiempo real para la cuantificación de *L. monocytogenes* en productos cárnicos.** Se optimizaron los componentes y condiciones de amplificación de la PCR en cultivo puro de *L. monocytogenes* CECT 934 y con estas condiciones, se analizaron muestras de jamón (n=30) contaminadas experimentalmente (rango  $10^7$  a  $10^1$  ufc/g) mediante PCR a tiempo real y método de referencia EN/ISO 11290-2. Las muestras analizadas por qPCR fueron sometidas a un pretratamiento mediante un proceso de lisis de matriz, el ADN se extrajo con el kit DNeasy Blood and Tissue-*Qiagen*, y se amplificó el gen codificante de la listeriolicina O (*hlyA*) utilizando sonda TaqMan con un fluoróforo FAM y un Black Hole Quencher (Nogva et al., 2000; *Appl Environ Microb*, 66:4266-4271). Se elaboró la curva de calibración representando la media del ciclo de amplificación (Cq) frente a los recuentos (ulog ufc/g) y se evaluó la linealidad, eficiencia, precisión y límites de detección y cuantificación del método qPCR. Para determinar la eficacia relativa del método alternativo se analizaron muestras de jamón contaminadas (n=60) por ambos métodos. Se analizaron productos cárnicos RTE comerciales (n=39) para detectar la presencia de *L. monocytogenes*, mediante PCR a tiempo real y en las muestras positivas, se cuantificó el patógeno mediante el método PCR a tiempo real desarrollado y el de referencia.

**Caracterización genética y antibiorresistencias de cepas de *Listeria* spp de origen cárnico.** Los serotipos de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de productos y superficies de la industria cárnica (n=92) se han analizado por PCR multiplex (Laboratorio de Referencia de la UE de *L. monocytogenes* ANSES), los pulsotipos por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado y los perfiles MLST-*Multilocus Sequence Typing* y MVLST (*Multi-Virulence-Locus Sequence* se realizan en el Dpto de Seguridad Alimentaria de la Universidad Ludwig-Maximilians de Múnich (estancia predoctoral Miriam Labrador). Los perfiles obtenidos serán comparados con la base del Instituto Pasteur de Francia. También se ha estudiado el fenotipo y genotipo de RAM de cepas de *L. monocytogenes* (n=7) y *L. innocua* (n=43) aisladas de alimentos de origen animal. El test de sensibilidad antimicrobiana se realizó frente a 9 antibióticos (ampicilina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, penicilina, rifampicina, tetraciclina y vancomicina) y los determinantes genéticos *tet M*, *tet L*, *mef A*, *msr A*, *erm A*, *erm B*, *lnu A*, y *lnu B* se determinaron mediante PCR a tiempo real, en condiciones optimizadas previamente para cada gen.

### XI.1.3 Resultados y Discusión

**Puesta a punto y aplicación del método de Impedancimetría.** La especificidad, sensibilidad y eficacia relativa con identificación en OCLA y RAPID'L.mono fue del 100%, el nivel detección relativa y el LOD50 fue similar al obtenido por el método de referencia, lo que demuestra su utilización como técnica alternativa. La inclusividad y exclusividad de la metodología no mostró interferencias en la detección de la especie patógena. Se detectó *L. monocytogenes* en 2 muestras (1,05%), con amplificación del gen *hlyA*, en ambas muestras, por lo que se confirmó la presencia del patógeno; el recuento estuvo por debajo del límite de detección de la técnica. De las 284 muestras de superficies se detectó *Listeria* spp. en casi el 35%, mientras que la detección de la especie patógena fue de cerca del 10%. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la zona de deshuesado y loncheado, siendo la primera de mayor contaminación atribuible al diseño de los equipos y cintas. Las superficies limpias de deshuesado presentaron más riesgo de contaminación que las superficies limpias de loncheado.

1.3.2. Puesta a punto y aplicación de un método PCR a tiempo real para la cuantificación de *L. monocytogenes* en productos cárnicos. Los resultados obtenidos mostraron un buen coeficiente de determinación y excelente eficiencia de la reacción PCR. La precisión del método fue demostrada por los coeficientes de variación intraensayo e interensayo y la desviación estandar por debajo de  $0,25 \times \log$  copias/g, valor máximo permitido para la variabilidad analítica. Los límites de detección y cuantificación estuvieron por debajo de 100 ufc/g menos de 10 copias del gen *hlyA*/ reacción, respectivamente. Se ha

demostrado una muy buena correlación entre el método alternativo y el de referencia. En los productos cárnicos RTE comerciales, *L. monocytogenes* fue detectada en 7 muestras (18%) y una fue cuantificada mediante el método PCR a tiempo real (< 100 ufc/g).

### 1.3.3. Caracterización genética y antibiorresistencias en cepas de *Listeria* spp de origen cárnico

La prevalencia de los serotipos de las cepas de *L. monocytogenes* de origen cárnico analizadas fueron de mayor a menor proporción: 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b. El serotipo predominante en productos y superficies fue el 1/2a, mientras que el 4b sólo se detectó en productos cárnicos. La prevalencia de multirresistencia fue del 54% de las cepas: 27 *Listeria* spp y 4 *L. monocytogenes*. La resistencia a clindamicina fue la más frecuente (90%), seguido de tetraciclina (30%) and ciprofloxacina (26%). El gen *Tet M* fue detectado en cepas con sensibilidad reducida a tetraciclina en *L. innocua* y *L. monocytogenes*, por lo que ambas especies presentan resistencia adquirida.

## XI.1.4 Conclusiones

- 1) La impedancimetría con identificación en ALOA y RAPID L mono, se presenta como un método de detección de *L. monocytogenes* en productos cárnicos, rápido, sencillo y que permite el análisis simultáneo de un elevado número de muestras. Ventajas de gran interés para su uso en la industria dentro de la verificación de su plan de autocontrol.
- 2) La técnica q-PCR desarrollada se presenta como una herramienta rápida, sencilla, precisa y sensible para la cuantificación de *L. monocytogenes* en productos cárnicos. El pretratamiento de las muestras ensayado ha reducido el límite de cuantificación, hecho que permite garantizar el cumplimiento del criterio microbiológico establecido en la UE
- 3) La caracterización genética de cepas de *L. monocytogenes* de origen cárnico permite conocer los diferentes subtipos moleculares en la industria y por trazabilidad identificar los nichos ecológicos y poder adoptar medidas eficaces para su control; además de contribuir al estudio epidemiológico de este patógeno en la cadena alimentaria.
- 4) La presencia de genes de RAM en *L. innocua* y *L. monocytogenes* indica la transferencia de éstos de bacterias comensales a patógenas en la cadena alimentaria; además, la RAM en *L. monocytogenes* podría comprometer el tratamiento de las listeriosis humana.

## XI.1.5 Financiación

**Título del proyecto:** Análisis y evaluación de la seguridad alimentaria

**Entidad financiadora:** Gobierno de Aragón- Fondo Social Europeo (A01)

**Duración desde:** 01.01.2014 hasta: 31.12.2016

Investigador principal: Agustín Ariño Moneva

**Título del proyecto:** Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en jamón y desarrollo de métodos rápidos para el análisis de *Listeria monocytogenes*

**Entidad financiadora:** Ministerio de Economía y Competitividad – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Proyecto INNPACTO IPT-2012-0189-060000)

**Duración desde:** 01.01.2013 hasta: 31.12.2015

Investigador principal: Susana Bayarri Fernández

**Título del proyecto:** Sistema de Electroforesis en Campo Pulsante CHEF-DR III

**Entidad financiadora:** Gobierno de Aragón. Infraestructura de Investigación/Universidad de Zaragoza

**Duración desde:** 01.09.2017

**Investigador principal:** Instituto Agroalimentario de Aragón (Director Rafael Pagán)

## **XI.2 Producción científica**

### **XI.2.1 Artículos en revistas científicas:**

Gómez, D., Iguácel L, Rota, M. C, Carramiñana, J J, Ariño, A. and Yangüela, J. (2015). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat Products and Meat Processing Plants in Spain. *Foods 4*: 271-282.

Escolar,C., Gómez, D., Rota M.C., Conchello, P. and Herrera, A. (2017). Antimicrobial Resistance Profiles of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from ready-to-eat products of animal origen in Spain. *Foodborne Pathogens and Disease*,14 (6): 357-363.

Labrador, M., Rota, M.C., Pérez-Arquillué, C., Herrera A., Bayarri, S. (2017). Evaluation of Impedance method for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in dry cured ham. *Journal of Food Protection* (enviado para su publicación JFP-17-380)

### **XI.2.2 Tesis Doctorales dirigidas**

Título: Eficacia de la aplicación de medidas de control de *Listeria monocytogenes* en industrias cárnicas elaboradas de productos listos para el consumo (LPC)

Doctorando: Español Pueyo, Miguel Antonio

Directores: Dr. Javier Yangüela Martínez y Dr. Guillermo Cubero Martín

Facultad y Universidad: Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

Año: fecha prevista lectura noviembre de 2017

Calificación: pendiente

Título: Desarrollo de métodos rápidos para el análisis de *Listeria monocytogenes* y su aplicación al proceso de evaluación del riesgo en la industria cárnica.

Doctorando: Labrador Bernad, Mirian

Directores: Dra. M<sup>a</sup> Carmen Rota García y Dra. Susana Bayarri Fernández

Facultad y Universidad: Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

Año: fecha prevista lectura diciembre de 2018

Calificación: pendiente

Título: Análisis y evaluación de resistencia antimicrobianas asociadas a microorganismos aislados de alimentos de origen animal mediante técnicas de biología molecular

Doctorando: Escolar Miñana, Cristina

Directores: Dr. Antonio Herrera Marteache y Dra. M<sup>a</sup> Carmen Rota García

Facultad y Universidad: Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

Año: fecha prevista lectura marzo de 2019

Calificación: pendiente

### **XI.3 Congresos, Jornadas y Reuniones**

#### **XI.3.1 Ponencias invitadas**

Ponente: Susana Bayarri Fernández

Ponencia: Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en jamón curado y desarrollo de métodos rápidos para el análisis de *Listeria monocytogenes*

Congreso / Jornada / Reunión: Jornada: Jornadas científicas ATECTA “Innovación: la herramienta del futuro agroalimentario”

Lugar y fecha: Facultad de Veterinaria. Zaragoza 14 de Mayo de 2015.

Ponente: M<sup>a</sup> Carmen Rota García

Ponencia: Estudios de investigación para la detección y control de *Listeria monocytogenes* en la Industria Alimentaria

Congreso / Jornada / Reunión: Jornada: *Listeria* y biofilm: un gran reto en la industria alimentaria

Lugar y fecha: Zaragoza 10 de Noviembre de 2016.



## Capítulo XII. Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en jamón

S. Bayarri, Gracia, MJ., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, A., Herrero, L., y Nieto, P.

*Nutrición y Bromatología. . Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA). Facultad de Veterinaria. 50013-Zaragoza.*

### XII.1 Desarrollos en investigación

#### XII.1.1 Introducción

*Toxoplasma gondii* es el agente responsable de la toxoplasmosis, enfermedad zoonótica parasitaria con mayor incidencia en los seres humanos. De entre los principales patógenos de transmisión alimentaria, *T. gondii* se sitúa en segundo lugar en cuanto al número de muertes anuales que provoca (Scallan y col., 2011, *Emerging Infections Diseases* 17: 7-15). A pesar de ello, en la UE está considerada como una enfermedad subestimada tanto en su detección como en su comunicación (EFSA, 2007). La principal vía de transmisión es por ingestión de carne cruda o poco cocinada procedente de animales infectados, si bien, estudios epidemiológicos señalan el consumo de productos cárnicos curados como factor de riesgo. Por ello, los estudios científicos acerca de la seroprevalencia en porcino, prevalencia en carne de cerdo y efecto del tratamiento de curado aporta datos de interés para evaluar este riesgo y permite aportar medidas eficaces en la industria para su control.

#### XII.1.2 Metodología

Se ha estudiado *T. gondii* en el proceso integral de elaboración de jamón curado: producción primaria, matadero y en la industria de elaboración de jamón. En producción primaria se han analizado los factores de riesgo asociados con *T. gondii* en explotaciones porcinas de Aragón, relacionándolos con la seropositividad en animales vivos. Se realizó un estudio epidemiológico en 161 granjas de producción intensiva, y se analizaron muestras de suero de 1200 cerdos procedentes de 60 explotaciones mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). En matadero, se ha analizado la presencia de quistes infectantes de *T. gondii* en carne fresca (perniles y órganos diana) procedente de animales de diferentes titulaciones serológicas. La metodología de análisis utilizada ha sido el bioensayo en ratón, que es el método de referencia que permite confirmar la viabilidad de *T. gondii* en tejidos. En esta etapa, además de evaluar el riesgo en la materia prima, el objetivo ha sido relacionar la seropositividad porcina con la presencia del parásito con capacidad infectiva en carne. Por último, se ha analizado la presencia de quistes infectantes de *T. gondii* en jamones curados durante 9 y 12 meses, elaborados a partir de perniles procedentes de los animales seropositivos seleccionados.

En el momento actual, nuestras investigaciones se centran en la evaluación de metodologías para el análisis de *T. gondii* en la industria cárnica porcina, tanto en animales vivos (serología) como en carne, en el análisis de *T. gondii* en jamón y otros productos cárnicos curados listos para el consumo con datos de trazabilidad, en la evaluación del efecto del tratamiento tecnológico de curado del jamón utilizando perniles de cerdos infectados experimentalmente con *T. gondii*; en la distribución de *T. gondii* en tejidos porcinos, y en aportar datos sobre la prevalencia de *T. gondii* en porcino en España.

### XII.1.3 Resultados y Discusión

La seroprevalencia fue del 24,5% y el 96,7% de las granjas presentaron animales positivos, lo que indica una amplia exposición al parásito. Los factores de riesgo fueron la presencia de gatos en las granjas o alrededor de ellas, la presencia de perros en las instalaciones, el bajo número de animales en las explotaciones, la mala higiene y el mal mantenimiento de las granjas. Además, se observó que cuando se utilizaban cebos para roedores, la prevalencia de *Toxoplasma* era menor. Mediante bioensayo en ratón, se detectó la presencia de *T. gondii* en el 73,7% de los animales seropositivos analizados, confirmando su viabilidad en el 42,1%. Se observó una relación significativa entre los títulos serológicos y la presencia y viabilidad de *T. gondii* en los tejidos porcinos, con una mayor probabilidad de detectar formas viables del parásito en tejidos de cerdos con títulos mayores o iguales a 1: 80. El proceso tecnológico de curado afectó a la viabilidad de *T. gondii*, observándose diferencias estadísticamente significativas entre jamones frescos y curados ( $p < 0,001$ ), y siendo más eficaz un tiempo de curado mayor (12 meses). Sin embargo, este período de curado resultó en una reducción pero no en una eliminación completa del riesgo.

### XII.1.4 Conclusiones

- 1) Conocer los factores de riesgo en granja permite establecer medidas correctoras con el fin conseguir disminuir la seroprevalencia, llegar a obtener granjas libres de toxoplasma y obtener carnes con menor riesgo
- 2) La correlación entre los títulos serológicos y la presencia del parásito en tejidos frescos hace que la serología en porcino sea una herramienta muy útil para predecir la presencia del parásitos en carne.
- 3) La relación entre órganos diana y tejidos frescos permite recomendar el análisis de éstos como herramienta de control de *T. gondii* en jamón curado

### XII.1.5 Financiación

**Título del proyecto:** Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en jamón y desarrollo de métodos rápidos para el análisis de *Listeria monocytogenes*

**Entidad financiadora:** Ministerio de Economía y Competitividad – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Proyecto INNPACTO IPT-2012-0189-060000)

**Duración desde:** 01.01.2013 hasta: 31.12.2015

**Investigador principal:** Susana Bayarri Fernández

**Título del proyecto:** Evaluación del riesgo de *Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de jamón y otros productos curados

**Entidad financiadora:** Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria INIA – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (RTA2014-00024-C04-02)

**Duración:** 3 años Desde: 17-9-2015 hasta: 16-9-2018

**Investigador principal:** Susana Bayarri Fernández

## XII.2 Producción científica

### XII.2.1 Artículos en revistas científicas:

Herrero, L.; Gracia, M.J.; Perez Arquillué, C.; Lázaro, R.; Herrera, M.; Herrera, A.; Bayarri, S. (2016). *Toxoplasma gondii*: Pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat. *Veterinary Parasitology* 224: 52-59.

Herrero, L., Gracia, M.J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, A. and Bayarri, S. (2017). *Toxoplasma gondii* in raw and dry-cured ham: the influence of the curing process. *Food Microbiology* 65: 213-220.

### XII.2.2 Tesis Doctorales dirigidas

Título: Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en el proceso integral de elaboración del jamón curado

Doctorando: Herrero Querol, Laura

Directores: Dra. Susana Bayarri Fernández y Dra. M<sup>a</sup> Jesús Gracia Salinas

Facultad y Universidad: Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

Año: fecha prevista lectura diciembre de 2017

Calificación: pendiente

Título: *Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo

Doctorando: Paula Nieto Bressel

Directores: Dra. Susana Bayarri Fernández y Dra. M<sup>a</sup> Jesús Gracia Salinas

Facultad y Universidad: Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

Año: fecha prevista lectura diciembre de 2018

Calificación: pendiente

## XII.3 Congresos, Jornadas y Reuniones

### XII.3.1 Ponencias invitadas

Ponente: Susana Bayarri Fernández

Ponencia: Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en jamón curado y desarrollo de métodos rápidos para el análisis de *Listeria monocytogenes*

Congreso / Jornada / Reunión: Jornada: Jornadas científicas ATECTA “Innovación: la herramienta del futuro agroalimentario”

Lugar y fecha: Facultad de Veterinaria. Zaragoza 14 de Mayo de 2015.

Ponente: M<sup>a</sup> Carmen Rota García

Ponencia: Avances en investigación sobre el riesgo de *Toxoplasma gondii* en derivados cárnicos curado-madurados

Congreso / Jornada / Reunión: Jornada ANICE-PROCARSE. “Seguridad Microbiológica e Higiene de los Productos Cárnicos”

Lugar y fecha: Madrid, 27 de septiembre de 2016

Ponente: Susana Bayarri Fernández

Ponencia: Risk assessment and control of *Toxoplasma gondii* in the dry-cured ham and cured pork products industry

Congreso / Jornada / Reunión: Food Safety Inspection Service Science & Technology Seminar Series

Lugar y fecha: Webinar organizado por el “Food Safety Inspection Service from United States Department of Agriculture”. 28 de junio de 2017.

### **XII.3.2 Actividades de organización de Congresos, Jornadas y Reuniones**

Congreso / Jornada / Reunión: 5th Symposium on Veterinary Sciences Zaragoza- Toulouse-München

Lugar y fecha: Zaragoza del 3 al 4 de noviembre de 2016

Actividad: Miembro del Comité Organizador (Susana Bayarri)

## Capítulo XIII. Virus de la hepatitis E: un problema emergente?

**A. Bosch, R.M. Pintó, S. Guix, N. Beguiristain, C. Fuentes, M. de Castellarnau, F.J. Pérez-Rodríguez.**

*Grupo de Virus Entéricos, Departamento de Genética, Microbiología y Estadística, Sección de Microbiología, Virología y Biotecnología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, 08028 Barcelona.*

### XIII.1 Desarrollos en investigación

#### XIII.1.1 Introducción

El virus de la hepatitis E (VHE) es un agente zoonótico que causa hepatitis aguda y que, en algunos casos, puede evolucionar hasta hepatitis crónica. El VHE es un virus desnudo del que se han descrito cuatro genotipos (G1-G4) que infectan al ser humano. Los genotipos G3 y G4 infectan también a animales, sobre todo el cerdo.

Además de los síntomas hepáticos clásicos, el VHE también es el responsable de trastornos extrahepáticos, como síndromes neurológicos, daños renales, pancreatitis y problemas hemáticos. Especialmente preocupantes son las cifras de mortalidad femenina en el tercer trimestre del embarazo que pueden llegar a ser de entre el 15 y el 25%.

Las principales vías de transmisión de la hepatitis E son el consumo de agua contaminada, el consumo de carne cruda o poco hecha de animales infectados, la transmisión parenteral por transfusión de sangre o trasplante de órganos y la transmisión vertical materno-filial.

El VHE es muy prevalente en el cerdo, con un 100% de los animales de más de seis meses infectados. También se encuentra en jabalíes, ciervos y conejos, entre otros huéspedes.

En países desarrollados, la transmisión de la infección se ha producido por consumo de carne de cerdo, jabalí, ciervo o conejo. La ingestión de carne de caza se ha apuntado como un factor de riesgo para adquirir la enfermedad. Se ha detectado el VHE en productos elaborados con carne de cerdo. Es importante poder evaluar la eficacia de tratamientos de eliminación/inactivación del HEV en productos cárnicos, sobre todo porcinos,

El Grupo de Virus Entéricos tiene puestas a punto una serie de herramientas que pueden ser utilizadas en el estudio de la eficacia de los métodos de eliminación/inactivación viral para el virus de la Hepatitis E (HEV). Así dispone, por un lado, de una RT-PCR a tiempo real (RTqPCR) para cuantificar partículas de HEV y de una fuente de dicho virus y por otro lado, dispone de un virus que podría considerarse a priori un modelo del HEV en estudios de infectividad. Este virus modelo sería el Norovirus Murino tipo 1 (MNV-1) adaptado al cultivo celular y que, al igual que el VHE, es un virus entérico de transmisión fecal-oral y de una familia próxima con lo que comparten muchas características físico-químicas.

No obstante, la detección del genoma vírico mediante técnicas moleculares no implica necesariamente que los virus detectados sean infecciosos. Por este motivo, se hace necesario conseguir aproximaciones moleculares que den resultados que tengan una correlación lo más

exacta posible con los datos de infectividad. Una de estas aproximaciones se basa en el tratamiento de las muestras con ribonucleasas (RNasas) o mono-azida de propidio (PMA), previo a la reacción de RTqPCR, lo que permite detectar únicamente genomas que están correctamente empaquetados dentro de una cápside vírica estanca, cohesiva y no dañada y por ello, reflejan mejor el número de partículas víricas infecciosas que puede haber en una muestra.

En este estudio se realizaron pruebas preliminares de dichas técnicas moleculares de cara a su potencial aplicación en la realización de estudios destinados a evaluar la capacidad de estas etapas para eliminar el virus de la Hepatitis E (HEV), así como el Norovirus Murino Tipo 1 (MNV-1), utilizado como virus modelo de infectividad para el virus de la Hepatitis E.

### XIII.1.2 Metodología

Como fuentes del virus de la Hepatitis E (HEV) se utilizaron las siguientes heces porcinas:

Heces porcinas positivas (HEV-3 21/03/13) para el Virus de la Hepatitis E (genotipo 3), procedentes de un cerdo de una granja de Vic, cedidas por el Dr. Juan Carlos Sainz, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Madrid).

Heces porcinas positivas (HEV-3 29/06/09) para el Virus de la Hepatitis E (genotipo 3), procedentes de un corral de cerdos de entre 10 y 12 semanas, cedidas por la Dra. Marga Martín, del Centre de Recerca en Salut Animal (CRESA, Barcelona).

El Norovirus Murino Tipo 1 (MNV-1), perteneciente a la familia Caliciviridae, es un virus no envuelto con una cápside de entre 27 y 35 nm de diámetro y un genoma ARN de cadena simple de polaridad positiva. Es el miembro del género Norovirus adaptado a replicar en cultivo celular más frecuentemente utilizado como modelo de Norovirus Humano y el más cercano al virus de la Hepatitis E por sus características. Dada su similitud con el virus de la Hepatitis E (anteriormente pertenecía a la misma familia de virus) a nivel morfológico, organización genómica y ciclo replicativo, el MNV-1 se utilizó como modelo de infectividad de dicho virus. La cepa que se utilizó en el estudio fue la CW1P3 (cedida por el Dr. Herbert W. Virgin, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, EEUU).

Para los ensayos de infectividad con el Norovirus Murino Tipo 1 (MNV-1) correspondientes al ensayo de puesta a punto del pretratamiento de las muestras con PMA/RNasa, se utilizó la línea celular RAW 264.7 entre los pases 20-28 (cedida por Dr. Herbert W. Virgin, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, EEUU). Se trata de línea de macrófagos murinos establecida a partir de un tumor inducido en una hembra de ratón por inyección intraperitoneal del virus de la leucemia de Abelson (A-MuLV).

El tratamiento con *RNase ONE Ribonuclease* (PROMEGA) se llevó a cabo con el objetivo de eliminar los genomas no encapsidados, una vez sometidos a tratamientos de inactivación y poder cuantificar sólo las partículas víricas intactas obteniendo así una mejor aproximación entre las copias genómicas detectadas y los virus infecciosos reales. Dicho tratamiento se llevó a cabo durante 15 minutos a 37°C y transcurrida esta, la reacción se paró con NaCl [5M]. También se ha utilizado para determinar la actividad de la RNasa en suspensiones fecales de HEV y RNA de HEV purificado.

Para la detección y cuantificación de MNV-1 se utilizó un protocolo de RTqPCR puesto a punto por el Grupo, en el que se utiliza el tampón de reacción, la retrotranscriptasa y polimerasa suministradas en el kit comercial *RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System* (INVITROGEN), junto con los cebadores (SIGMA) y sonda (LIFE TECHNOLOGIES).

Para el caso del HEV, se utilizó el kit comercial CEERAM S.A.S. (*hepatitisE @ceeramTools.health*) Ref: KHHEV FA01 que contiene como control externo propio (EC) un estándar internacional (compuesto por un preparado liofilizado de RNAs de HEV genotipo 3a derivados de donantes de sangre) reconocido por

WHO. La región amplificada por la RTqPCR corresponde a la región ORF3 entre las bases 5261-5330 del HEV.

### **XIII.1.3 Resultados**

De manera previa a la realización de los ensayos, se caracterizaron los stocks virales producidos y que posteriormente serían utilizados en las sucesivas pruebas de RTqPCR.

A su vez, y con el objetivo de mejorar la aproximación entre copias genómicas detectadas por RTqPCR y virus infecciosos reales, se llevó a cabo una prueba preliminar sometiendo los stocks víricos de MNV-1 y HEV a dos tratamientos llevados a cabo de manera previa a la extracción del ácido nucleico del virus; ribonucleasa One (RNasa ONE) o mono-azida de propidio (PMA).

El objetivo del tratamiento con RNasa ONE era eliminar los genomas no encapsidados y poder cuantificar sólo los virus intactos. De esta manera, en la cuantificación de los virus sometidos a tratamientos de eliminación y/o inactivación, se conseguirían obtener mejores aproximaciones entre las copias genómicas detectadas y los virus infecciosos reales.

El tratamiento con PMA se basa en que esta molécula fotoreactiva, es capaz de atravesar aquellas cápsides virales que se encuentran deterioradas y se intercala de manera covalente en regiones estructuradas del ácido nucleico del virus. Tras aplicar un tratamiento de fotoactivación con el Phast Blue, el PMA unido al ácido nucleico del virus sufre una modificación química que no permite su cuantificación por RTqPCR. De esta manera, se conseguiría cuantificar por RTqPCR solamente aquellos genomas virales pertenecientes a partículas víricas integrales.

Como control del proceso y con el objetivo de establecer que tratamiento permite obtener resultados de cuantificación en reacciones de RTqPCR posteriores a un tratamiento de inactivación y/o eliminación lo más próximos posibles a los datos de infectividad, se sometieron los virus a un tratamiento de inactivación por calor a 99°C durante 15 minutos; dicho tratamiento es lo suficientemente efectivo como para asegurar que los virus quedan inactivados y de esta manera se pudo analizar si las técnicas utilizadas fueron adecuadas para detectar factores de reducción óptimos tras el tratamiento de inactivación aplicado.

Una vez realizado el tratamiento de inactivación y tras llevar a cabo dichos pretratamientos, se extrajo el ácido nucleico de cada una de las muestras mediante el Kit Nuclisens. Por último, se llevaron a cabo las reacciones de RTqPCR para los virus MNV-1 y HEV ensayados. También se hicieron los ensayos de infectividad del MNV-1.

Tras el tratamiento de inactivación por calor, no se observa infectividad del MNV-1 en ninguna de las muestras estudiadas.

El título infeccioso del MNV-1, al igual que el número de copias genómicas detectadas, disminuyó en presencia del PMA, siendo en la infectividad donde se detecta una disminución más significativa.

Los valores tanto de infectividad como de copias genómicas tras tratar el stock con RNasa ONE son similares al stock vírico de partida no tratado.

El pretratamiento con RNasa ONE, tras someter al MNV-1 a un proceso de inactivación por calor, consigue valores de Factor de Reducción con mejor aproximación a los resultados de infectividad que en el caso del pretratamiento con PMA y mejora respecto al resultado del stock vírico no pretratado, pero no permite demostrar Factores de Reducción del mismo orden que los obtenidos por infectividad.

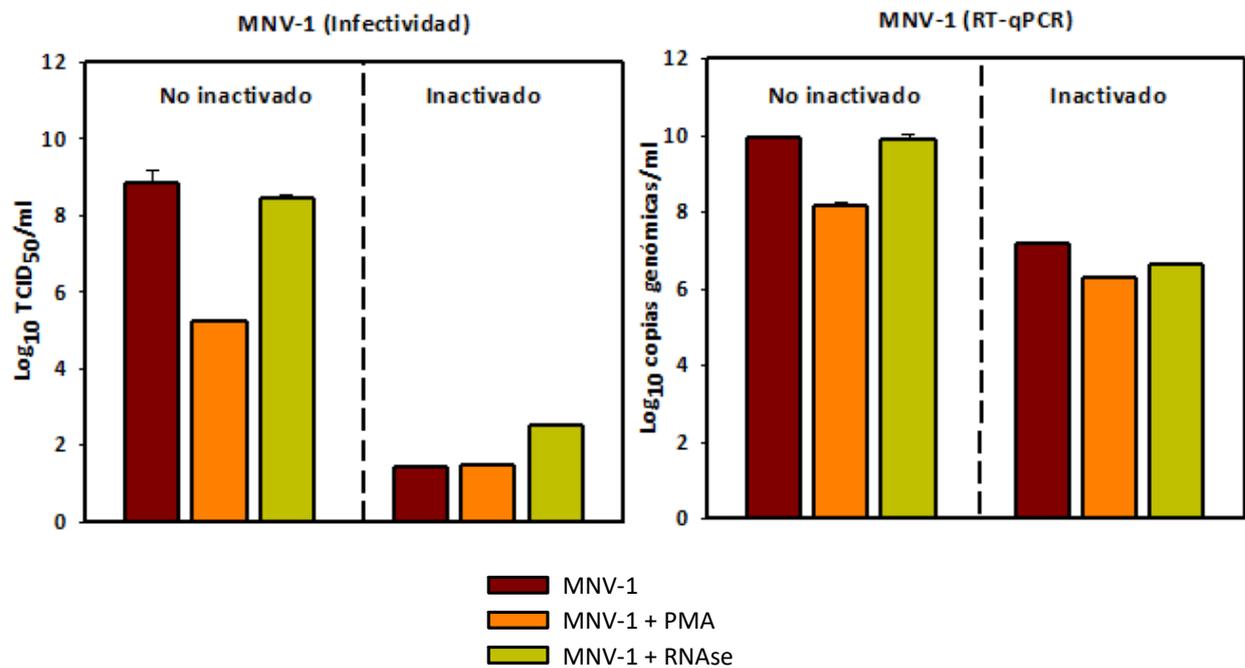


Figura 1. Ensayo de caracterización del stock *de* MNV-1 y su inactivación por calor a 99°C durante 15 minutos tras ser sometido a tratamientos con RNasa ONE y PMA de manera previa a su cuantificación por infectividad y RTqPCR.

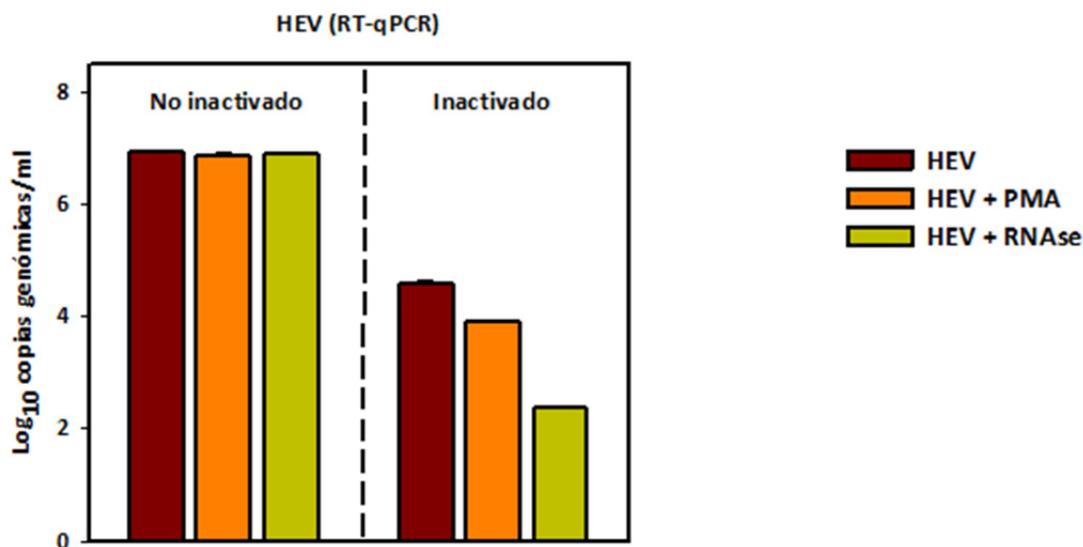


Figura 2. Resultados de la inactivación por calor a 99°C durante 15 minutos de la suspensión fecal al 20% PBS-Triton X-100 HEV-3 12/06/13 tras ser sometida a tratamientos con RNasa One y PMA de manera previa a su cuantificación por RTqPCR.

•No se observan diferencias significativas entre los valores de copias genómicas detectados en la suspensión fecal no tratada y las suspensiones fecales tratadas con RNasa ONE y PMA.

Tras el tratamiento de inactivación por calor, en la muestra pretratada con RNasa no se detectan copias genómicas; si se detectan copias genómicas al pretratar la muestra con PMA aunque son menores respecto a las detectadas en la muestra no pretratada.

Tras someter al HEV a un proceso de inactivación por calor, se demuestra un mayor factor de Reducción al pretratar las muestras con RNasa o PMA que al obtenido con la suspensión fecal no pretratada, siendo el pretratamiento con RNasa ONE el que refleja con más eficacia el proceso de inactivación al que ha sido sometida la suspensión fecal de HEV.

### **XIII.1.4 Conclusiones**

Los resultados obtenidos indican que, para el MNV-1, el efecto del tratamiento con PMA ó RNasa ONE previamente a la extracción del ácido nucleico da resultados similares en los correspondientes factores de reducción. Ambos tratamientos consiguen aproximar los resultados al modelo infeccioso utilizado, por lo que serían eficaces para obtener mayores factores de reducción en experimentos de inactivación y/o eliminación de virus realizados mediante métodos moleculares.

Para el caso del HEV, la reducción en el número de copias genómicas tras el tratamiento de calor se refleja mejor pretratando la muestra con RNasa en lugar de PMA. El factor de reducción obtenido tras aplicar un tratamiento de inactivación mediante calor fue mayor en la suspensión fecal de HEV pretratada con RNasa ONE que en la no pretratada. Esta mejora en la determinación del factor de reducción pone de manifiesto que la RNasa ONE habría conseguido eliminar RNA no encapsidado y cuantificar las partículas víricas intactas, mediante la técnica molecular de RTqPCR.

Se comprueba que las suspensiones fecales producidas no contienen RNA libre en exceso, ya que las diferencias en logaritmo de copias genómicas por mililitro de suspensión fecal entre las suspensiones tratadas y no tratadas con RNasa ONE no son significativas.

En cuanto a la técnica de RT-PCR cuantitativa, se pudieron detectar hasta 1.25 UI/reacción de RTqPCR. El límite de detección de la técnica aplicando el programa estadístico Probit resultó ser de 0.81 UI/microlitro. Dicho límite de detección (LoD) se determinó utilizando el Estándar Internacional de HEV.

El resultado de no detección de copias genómicas obtenido al tratar con RNasa ONE el RNA purificado del HEV pone de manifiesto la actividad óptima de la RNasa ONE que degrada el RNA existente.

En conclusión, la aplicación de la RTqPCR como método molecular para cuantificar el HEV junto al pretratamiento de las muestras con RNasa ONE, es eficaz para llevar a cabo estudios de evaluación de la inactivación/eliminación del HEV ya que logra una mayor aproximación a los datos de infectividad obtenidos en su correspondiente modelo el Norovirus Murino Tipo 1. Sin embargo, un factor limitante de la aplicación de dichas técnicas moleculares en estudios de inactivación y/o eliminación de virus deriva de que el rango dinámico que permite dicha técnica en la evaluación de los procesos mencionados es dependiente del proceso experimental que se lleve a cabo. Dicho rango dinámico se calcula en función del límite de detección teórico en caso de no detectarse virus en la muestra y del título inicial del virus a ensayar.

## **XIII.2 Producción científica**

### **XIII.2.1 Artículos en revistas científicas**

D'Andrea, L., Perez-Rodriguez, F. J., de Castellarnau, M., Manzanares, S., Lite, J., Guix, S., Pinto, R. M. 2015. Hepatitis A Virus Genotype Distribution during a Decade of Universal Vaccination of Preadolescents. *Int J Mol Sci*, 16(4), 6842-6854. doi: 10.3390/ijms16046842 ijms16046842 [pii]

- Bosch, A., Santos, R., & Vantarakis, A. 2015. ISFEV 2014: Environmental, Food and Health Impacts of Enteric Viruses. *Food Environ Virol*. doi: 10.1007/s12560-015-9197-1
- Guix, S., Perez-Bosque, A., Miro, L., Moreto, M., Bosch, A., & Pinto, R. M. (2015). Type I Interferon Response Is Delayed in Human Astrovirus Infections. *PLoS One*, 10(4), e0123087. doi: 10.1371/journal.pone.0123087 PONE-D-14-47283 [pii]
- Ferrer, O., Casas, S., Galvan, C., Lucena, F., Bosch, A., Galofre, B., . . . Bernat, X. (2015). Direct ultrafiltration performance and membrane integrity monitoring by microbiological analysis. *Water Res*, 83, 121-131. doi: 10.1016/j.watres.2015.06.039 S0043-1354(15)30068-3 [pii]
- A. Bosch, A., Pintó, R.M. & Guix, S. 2015. Foodborne viruses. *Curr. Opin. Food Sci.* 8, 110-119.
- Fuster, N., Pintó, R. M., Fuentes, C., Beguiristain, N., Bosch, A., & Guix, S. (2016). Propidium monoazide RTqPCR assays for the assessment of hepatitis A inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters. *Water Research*, 101, 226-232. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.086>
- Sabria, A., Pinto, R. M., Bosch, A., Bartolome, R., Cornejo, T., Torner, N., . . . Guix, S. (2016). Norovirus shedding among food and healthcare workers exposed to the virus in outbreak settings. *J Clin Virol*, 82, 119-125. doi: 10.1016/j.jcv.2016.07.012 S1386-6532(16)30182-2 [pii]
- Pérez-Rodríguez, F. J., D'Andrea, L., de Castellarnau, M., Costafreda, M. I., Guix, S., Ribes, E., Pintó, R. M. (2016). Improving virus production through quasispecies genomic selection and molecular breeding. [Article]. *Scientific Reports*, 6, 35962. doi: 10.1038/srep35962 <http://www.nature.com/articles/srep35962#supplementary-information>
- Vu, D. L., Bosch, A., Pinto, R. M., & Guix, S. (2017). Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond. *Viruses*, 9(2). doi: E33 [pii] 10.3390/v9020033 v9020033 [pii]
- Blanco, A., Guix, S., Fuster, N., Fuentes, C., Bartolome, R., Cornejo, T., . . . Bosch, A. (2017). Norovirus in Bottled Water Associated with Gastroenteritis Outbreak, Spain, 2016. *Emerg Infect Dis*, 23(9), 1531-1534. doi: 10.3201/eid2309.161489
- Quer, J., Rodríguez-Frias, F., Gregori, J., Tabernero, D., Soria, M. E., García-Cehic, D., . . . Perales, C. (2017). Deep sequencing in the management of hepatitis virus infections. *Virus Research*, 239(Supplement C), 115-125. doi: doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.020

### **XIII.2.2 Tesis Doctorales dirigidas**

Título: Efecto del uso de codones en la velocidad de traducción de la región codificante de la cápside en poblaciones del virus de la hepatitis A.

Doctorando: Lucía d'Andrea Hirschy

Directores: Albert Bosch y Rosa M. Pintó

Facultad y Universidad: Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

Año: 2015

Calificación: Excelente “cum laude”

Título: Mejora de la producción del virus de la hepatitis A mediante selección genómica y cruce molecular de cuasiespecies.

Doctorando: Francisco José Pérez Rodríguez

Directores: Albert Bosch y Rosa M. Pintó

Facultad y Universidad: Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

Año: 2016

Calificación: Excelente “cum laude”

### **XIII.2.3 Libros/capítulos de libros**

Sánchez, A. & Bosch, A. 2016. Survival of enteric viruses in the environment and food. En “Viruses in Foods, Second Edition”, S. M. Goyal, J.L. Cannon (Eds.). Food Microbiology and Food Safety Series, 2016. Ed: Springer International Publishing Switzerland, pp 367-392, ISBN-978-3-319-30721-3.

### **XIII.2.4 Patentes**

A. Bosch, R.M Pintó. Universidad de Barcelona.

Título: Standardized method and kit for the quantification of Hepatitis A virus.

Nº de solicitud: International PCT No. registro PCT/EP2007/055402, Estados Unidos, 2007. Fecha de publicación: 04/12/2008.

Nº de publicación PCT/EP2007/055402: WO 2008/145196.

En explotación Ceeram, 2009 (<http://www.ceeram.fr/>); Life Technologies 2012

(<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4475930>); bioMérieux, 2015

(<http://www.biomerieux.es/microbiologia-industrial/kits-de-deteccion-por-pcr-de-virus-de-la-hepatitis>).

A. Bosch, R.M Pintó. Universidad de Barcelona.

Título: Control for assays based on reverse-transcription polymerase chain reaction.

PCT/EP2007/055407, Estados Unidos, 2007.Fecha de publicación: 04/12/2008.

Nº de publicación PCT/EP2007/055407: WO 2008/145197.

En explotación Ceeram, 2009 (<http://www.ceeram.fr/>); Life Technologies 2012

(<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4475930>); bioMérieux, 2015

(<http://www.biomerieux.es/microbiologia-industrial/kits-de-deteccion-por-pcr-de-virus-de-la-hepatitis>).



# Instituciones participantes en la Red PROCARSE



**Instituto Nacional de Investigación  
y Tecnología Agraria y Alimentaria  
(INIA) Coordinador**



**Universidad de  
Extremadura  
(UEx)**



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



**Universidad de Barcelona  
(UB)**



**Universidad Complutense  
de Madrid  
(UCM)**



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



**Universidad de León  
(ULE)**



**Universidad de Navarra  
(UN)**



**Universidad Politécnica  
de Valencia  
(UPV)**



**Universidad de Zaragoza  
(UNIZAR)**

## Patrocinadores de la edición y de la reunión PROCARSE en Cáceres

