

# itea

información técnica económica agraria

REVISTA DE LA ASOCIACIÓN INTERPROFESIONAL PARA EL DESARROLLO AGRARIO



Volumen 120

Número 3

Septiembre 2024



Volumen Especial

«Ciencia e Innovación para la  
producción de alimentos  
Seguros, Saludables y  
Sostenibles»



[aida-itea.org](http://aida-itea.org)

<p>2024- AÑO LV Vol. 120 N.º 3 <a href="http://dx.doi.org/10.12706/itea">http://dx.doi.org/10.12706/itea</a></p>	<p><b>DIRECCIÓN Y REDACCIÓN</b> Avda. Montañana, 930 50059 ZARAGOZA (ESPAÑA) Tel.: 34-976 716305 Fax.: 34-976 716335 E-mail: <a href="mailto:direccion@aida-itea.org">direccion@aida-itea.org</a></p>	<p>Depósito legal: Z-577-82 ISSN: 2386-3765 Maquetación: Remedios Cordero</p>
--	---	---

DIRECCIÓN:	Paula Gaspar, Universidad de Extremadura. España
EDICIÓN CIENTÍFICA:	José Manuel Alonso, CITA de Aragón. España Javier Álvarez, Universidad de Lleida. España Miguel Escribano, Universidad de Extremadura. España Gabriel Pardo, CITA de Aragón. España Ana Pina Sobrino, CITA de Aragón. España Helena Resano, IA2-Universidad de Zaragoza. España Guillermo Ripoll, CITA de Aragón. España Ana Isabel Sanjuán, CITA de Aragón. España
EDICIÓN TÉCNICA:	María Salillas, Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario. España
COMITÉ DE REDACCIÓN:	Alfonso Abecia, Universidad de Zaragoza. España Alicia Cirujeda, CITA de Aragón. España Azucena Gracia, CITA de Aragón. España M <sup>ª</sup> Engracia Guerra Velo, CICYTEX, Extremadura. España Sandra Lobón, CITA de Aragón. España María Teresa Maza, Universidad de Zaragoza. España José Manuel Mirás Avalos, MBG-CSIC de Galicia. España Daniel Villalba, Universidad de Lleida. España
COMITÉ ASESOR:	Ricardo Aké, Universidad Autónoma de Yucatán, México; Joaquín Aibar, Universidad de Zaragoza, España; Francisco Alcón, Universidad Politécnica de Cartagena, España; Ángeles Calatayud, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, España; Alba Cerisuelo, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, España; Kizkitza Insausti, Universidad Pública de Navarra, España; Ramón Isla, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, España; Jorge Lora, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, España; Ana Meikle, Universidad de la República, Uruguay; Francisco Javier Mesías, Universidad de Extremadura, España; Ana Olaizola, Universidad de Zaragoza, España; Raquel Sánchez Pérez, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC), España; Manuel Serradilla, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura, España; Verónica Sierra, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, España; Alfredo Teixeira, Escola Superior Agrária de Bragança, Portugal; Luis Varona, Universidad de Zaragoza, España.

ITEA-Información Técnica Económica Agraria aparece indexada en SCI Expanded, Journal Citation Reports/Science Editions, ICYT, CABI, SCOPUS y EBSCO. Prohibida toda reproducción total o parcial sin autorización expresa de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario, Editor titular del copyright. ITEA no se responsabiliza necesariamente de las opiniones vertidas en los artículos firmados que publica, cuya responsabilidad corresponde a sus autores.

<https://www.aida-itea.org/index.php/revista-itea/presentacion-itea>



Fotos y Texto de Susana Lorán Ayala

Científicos y tecnólogos de los alimentos deben avanzar e innovar en el desarrollo de procesos y productos que garanticen la salud del consumidor y la competitividad del sector agroalimentario. Sin embargo, este progreso requiere de recursos humanos especializados y de los avances en el conocimiento que aporta la investigación. Es por ello que desde hace años se viene organizando el congreso nacional CyTA-CESIA. Un evento de carácter bienal que convoca conjuntamente los congresos de «Ciencia y Tecnología de los Alimentos» y de «Ingeniería de los Alimentos» (CESIA). Desde sus inicios, ha sido un importante punto de encuentro para todos aquellos profesionales relacionados con la ciencia, la tecnología y la ingeniería de los alimentos.

## Editorial

Científicos y tecnólogos de los alimentos deben avanzar e innovar en el desarrollo de procesos y productos que garanticen la salud del consumidor y la competitividad del sector agroalimentario. Sin embargo, este progreso requiere de recursos humanos especializados y de los avances en el conocimiento que aporta la investigación. Es por ello que desde hace años se viene organizando el congreso nacional CyTA-CESIA. Un evento de carácter bienal que convoca conjuntamente los congresos de "Ciencia y Tecnología de los Alimentos" (avalado por la Conferencia de Decanos de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CCyTA) y de "Ingeniería de los Alimentos" (CESIA). Desde sus inicios, ha sido un importante punto de encuentro para todos aquellos profesionales relacionados con la ciencia, la tecnología y la ingeniería de los alimentos.

El Edificio Paraninfo de la Universidad de Zaragoza, tuvo el honor de acoger la XI edición de este evento organizado por la Facultad de Veterinaria de UNIZAR, en colaboración con la Sociedad Española de Ingeniería de los Alimentos (SESIA) y diversas entidades.

En el programa científico que se diseñó, se incluyeron varias sesiones temáticas que abarcaban distintas disciplinas relacionadas con la docencia y la investigación en el ámbito agroalimentario. Alimentación y salud; Biotecnología y Avances en Ciencia de los Alimentos; Bioeconomía y desarrollo sostenible; Seguridad alimentaria; Innovación docente en ciencia de los alimentos y Nuevas tecnologías en el desarrollo y procesado de alimentos. Contamos con la participación de ponentes del más elevado nivel y se fomentaron las actividades de transferencia a la empresa gracias a la organización de tres mesas redondas, la primera sobre "Transferencia y emprendimiento", en la que participaron representantes de empresas que compartieron sus experiencias de colaboración con entidades investigadoras y se dirigieron a los científicos para hablarles de sus necesidades y demandas, la segunda relativa a la "Transformación digital de la industria alimentaria" y la última, dedicada a intercambiar experiencias en torno a las "Marcas de calidad diferenciada".

Tras la ceremonia oficial de clausura y gracias a la colaboración de algunas de las industrias agroalimentarias de referencia en Aragón, se ofreció a los asistentes una degustación de productos con la que se dio a conocer algunas de las excelencias gastronómicas de la región.

En total, fueron 221 resúmenes los que se expusieron en la XI edición del Congreso nacional CyTA-CESIA, lo que lo convirtió en un importante punto de encuentro para descubrir a todos los sectores interesados los últimos progresos en investigación científica e innovación docente en el ámbito agroalimentario.

Este evento se complementó además con la celebración del III Congreso CyTA Junior dirigido a estudiantes y recién titulados, con el que se quiso dar voz a las nuevas generaciones de profesionales en el ámbito de la ciencia y la tecnología de los alimentos, ofreciéndoles una oportunidad para presentar sus trabajos científicos, intercambiar conocimientos y debatir sobre el futuro laboral de esta profesión.

Ambos congresos reunieron en total a más de 300 participantes entre estudiantes, investigadores y ponentes. Gracias a todo ellos, así como a los miembros de los comités organizador y científico, los patrocinadores, colaboradores y voluntarios, fue posible lograr que esta edición fuera todo un éxito.

No obstante, a pesar de que se han logrado grandes progresos, necesitamos seguir caminando hacia la innovación y hacerlo de manera coordinada para seguir avanzando y mejorar los sistemas agroalimentarios para que continúen proporcionando alimentos nutritivos e inocuos y sean aún más eficientes y sostenibles, alineándose con los Objetivos de Desarrollo Sostenible marcados por la agenda 2030.

Como punto final, en este número de la Revista ITEA se incluyen publicaciones seleccionadas de entre los resúmenes presentados al congreso en las diferentes áreas temáticas que configuraron su programa. Como presidenta del Comité Organizador de este evento quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la asociación AIDA por ofrecernos la oportunidad de mostrar algunos de los progresos y avances científicos y tecnológicos que pudieron verse en este evento.

**Susana Lorán Ayala**

Presidenta del Comité Organizador del  
XI Congreso Nacional CyTA CESIA y III Congreso Cyta Junior  
Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza

## Sumario

### **Volumen Especial: “Ciencia e Innovación para la producción de alimentos Seguros, Saludables y Sostenibles”**

- Aceites esenciales como inhibidores del crecimiento de la microbiota asociada a la trufa negra (*Tuber melanosporum*) y otras bacterias patógenas.  
*Antimicrobial activity of essential oils against black truffle (Tuber melanosporum) spoiling microorganisms and foodborne pathogens.*  
David Gimeno, Pedro Marco, Miguel Atarés y Juliana Navarro-Rocha 208
- Aplicación de la Imagen de Resonancia Magnética (IRM) al análisis morfológico no destructivo de piezas cárnicas. Una aproximación a la selección de perniles.  
*Application of Magnetic Resonance Imaging (MRI) to non-destructive morphological analysis of meat pieces. An approach to the selection of pork legs.*  
Víctor Remiro, María Isabel Cambero, María Isabel García-Real, María Dolores Romero de Ávila, David Castejón, Carlos Santos y María Encarnación Fernández-Valle 224
- Empleo de Tours Virtuales 360° de realidad aumentada para la mejora del aprendizaje de habilidades en actividades experimentales de evaluación sensorial de alimentos.  
*Use of 360° Virtual Tours of augmented reality to improve the learning of experimental skills in sensory evaluation of food.*  
Giuseppe Fregapane y M. Desamparados Salvador 239
- Presencia de residuos antibióticos en carnes comercializadas en el área transfronteriza España-Francia: un enfoque novedoso en los métodos de vigilancia.  
*Antimicrobial residues assessment over commercialized meat samples from the cross-border area Spain-France: a new approach for effective monitoring.*  
María Jesús Serrano, Janire Elorduy, Itsaso Zabaleta, Georges Istamboulie, Elena González-Fandos, Alain Bousquet-Melou, Luis Mata, Chloé Aymard, Jessica Da Silva, Marlène Lacroix, Alba Martínez-Laorden, Diego García-Gonzalo, Santiago Condón, Eunate Abilleira y Rafael Pagán 251
- Efecto del mucílago de cacao en la bioconservación de carnes.  
*Effect of cocoa mucilage on the biopreservation of meats.*  
José Villarroel-Bastidas, Jasson Gabriel Argüello-Rivadeneira, Johnny Leonel Mendoza-Zambrano, María de Guía Córdoba, Alicia Rodríguez y Alejandro Hernández 269
- Actitudes y percepción de los consumidores hacia miel de origen local.  
*Consumer attitudes and perceptions towards local honey.*  
Pilar Uldemolins, María Teresa Maza y Tiziana De-Magistris 288

# Aceites esenciales como inhibidores del crecimiento de la microbiota asociada a la trufa negra (*Tuber melanosporum*) y otras bacterias patógenas

David Gimeno, Pedro Marco\*, Miguel Atarés y Juliana Navarro-Rocha

Departamento de Ciencia Vegetal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza). Av. Montañana 930, 50059 España.

## Resumen

La Organización Mundial de la Salud declaró en 2015 un plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, lo que ha intensificado la búsqueda de alternativas, como la evaluación de extractos y compuestos de origen natural que presenten actividad antimicrobiana. Un tipo de extractos de potencial interés son los aceites esenciales obtenidos a partir de plantas aromáticas y medicinales. Por ello, el objetivo de este estudio es evaluar y seleccionar diferentes aceites esenciales procedentes de diversos quimiotipos de plantas aromáticas cultivadas en Aragón (*Satureja montana*, *Mentha rotundifolia*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula angustifolia*, *Origanum vulgare* subsp. *virens*, *Salvia rosmarinus* y *Salvia officinalis*), en función de su capacidad para inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos de interés agroalimentario. Estos aceites se han aplicado a microorganismos alterantes asociados a la trufa negra (*Tuber melanosporum*) y relacionados con la pérdida de calidad durante su conservación postcosecha. Estas cepas microbianas se aislaron de trufa fresca, para su posterior secuenciación e identificación mediante técnicas de biología molecular. El cribado inicial de los diferentes quimiotipos se realizó por la técnica de difusión en agar, y tras su selección se determinó la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida frente a estos microorganismos alterantes y otros causantes de toxoinfecciones alimentarias (*Bacillus* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Staphylococcus aureus*, y *Yersinia enterocolitica*). De todos los quimiotipos evaluados, los de *S. montana* presentaron una mayor actividad antimicrobiana frente a un mayor número de especies bacterianas. Estos resultados apoyan el uso de aceites esenciales como potenciales inhibidores de la actividad microbiana en la industria alimentaria en general y, particularmente, aporta información relevante para futuros estudios sobre conservación de trufa fresca.

**Palabras clave:** Aceite esencial, quimiotipo, trufa, *Satureja montana*, bacterias alterantes.

---

\* Autor para correspondencia: pmarcomo@cita-aragon.es

Cita del artículo: Gimeno D., Marco P., Atarés M., Navarro-Rocha J. (2024). Aceites esenciales como inhibidores del crecimiento de la microbiota asociada a la trufa negra (*Tuber melanosporum*) y otras bacterias patógenas. ITEA- Información Técnica Económica Agraria 120(3): 208-223. <https://doi.org/10.12706/itea.2024.010>



## Antimicrobial activity of essential oils against black truffle (*Tuber melanosporum*) spoiling microorganisms and foodborne pathogens

### Abstract

The World Health Organization declared in 2015 a global action plan on antimicrobial resistance which has led to the search for natural extracts and compounds with antimicrobial activity. The essential oils from medicinal and aromatic plants have gained significant scientific relevance in the last years. Thus, the aim of the study was the evaluation and selection of different essential oils chemotypes from various cultivated plant species of Aragon (*Satureja montana*, *Mentha rotundifolia*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula angustifolia*, *Origanum vulgare* subsp. *virens*, *Salvia rosmarinus* and *Salvia officinalis*) based on their ability to inhibit different microorganisms associated with the spoilage of black truffle (*Tuber melanosporum*) during its shelf life (*Bacillus* sp., *Microbacterium* sp., and *Pseudomonas fluorescens*), as well as with other foodborne pathogens (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Staphylococcus aureus*, and *Yersinia enterocolitica*). The mentioned spoiling bacteria were isolated from fresh black truffles and then sequenced and identified by molecular biology techniques. The screening of the antimicrobial activity was evaluated by agar disk diffusion, and microdilution broth method was used to determine the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of the selected extracts. Among the species studied, the two chemotypes of *Satureja montana* presented a greater antimicrobial activity against both Gram+ and Gram- bacteria. These results support the use of essential oils as potential inhibitors of microbial activity, especially in the food industry, and on the preservation of fresh truffles in particular.

**Keywords:** Essential oil, chemotype, truffle, *Satureja montana*, carvacrol, spoiling bacteria.

### Introducción

El uso de las plantas aromáticas y medicinales (PAM) se remonta a la antigüedad, existiendo indicios de su uso desde el año 1200 a.C en Mesopotamia, donde la química y perfumista Tapputi-Belatekallim dejó registrada en arcilla una escritura cuneiforme con la metodología para obtener esencias mediante procesos de extracción y destilación de plantas basándose en la empiria (Muñoz Páez y Garritz, 2013). Más adelante, los avances de la química y el conocimiento ecológico tradicional (TEK) de las especies locales, racionalizó el uso de estas plantas permitiendo el desarrollo de productos derivados con propiedades terapéuticas (Huntington, 2000). Por ejemplo, de *Artemisia annua* se extrae artemisina, una lactona muy efectiva para el tratamiento de la malaria y cuyos efectos fueron descritos por la medicina China tradicional (Miller y Su, 2011).

Las PAM se definen como aquellas especies vegetales cuyos principios activos proceden de compuestos aromáticos y son identificados principalmente en los aceites esenciales (AEs) que se obtienen de estas. La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, siglas de Food and Drug Administration) ha reconocido más de 150 especies de plantas de las que se obtienen AEs, entre ellas destacan *Salvia rosmarinus*, *Origanum vulgare*, o el género *Thymus*, como seguras para el ser humano en el ámbito culinario. Además, existen estudios epidemiológicos que correlacionan la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales presentes en estos vegetales con una menor incidencia de enfermedades coronarias, la degeneración ocular relacionada con la edad, y el cáncer (Costa et al., 2015). Unido a estos compuestos, algunas moléculas volátiles de estos extractos tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, antitumorales, antidiabéticas, antioxi-

dantes, antimicrobianas y hepatoprotectoras (Costa et al., 2015; Abdellaoui et al., 2020; Saha y Basak, 2020). La Organización Mundial de la Salud resalta que aproximadamente el 88 % de la población usa este tipo de plantas para el cuidado de la salud, lo que ha incrementado su demanda notablemente, y por tanto su cultivo (WHO, 2019). La demanda global del mercado de AEs se estimó en 247.080 toneladas en 2020 y se espera que aumente por la creciente demanda de la industria alimentaria, de cuidado personal y cosmética. La cuota de uso de los AEs en el mercado está liderada por los tratamientos para la salud, que supusieron más del 39,0 % en 2019, seguido de su uso en la industria de alimentación y bebidas (38,6 %), y de usos domésticos y otras aplicaciones médicas (Grand View Research, 2020). El valor total en importaciones y exportaciones globales de PAM supusieron 3,02 y 3,18 mil millones de dólares en 2015, respectivamente, siendo India uno de los principales exportadores, mientras que la importación estuvo liderada por Singapur, Japón, Alemania y EE.UU. (Roosta et al., 2017).

El cultivo de PAM se está potenciando en distintos municipios de la geografía aragonesa como el Somontano-Hoya de Huesca, Moncayo o Bajo Aragón y otras zonas del Sistema Ibérico turolense, que se caracterizan por la abundancia de flora espontánea aromático medicinal. Debido a su importancia, actualmente se está trabajando en mejorar la producción de AEs seleccionando aquellos fenotipos más interesantes, destacando las especies *Salvia sclarea* L., *Salvia lavandulifolia*, *Lavandula angustifolia*, *Satureja montana*, entre otras (Navarro-Rocha et al., 2020). La composición de estos aceites esenciales puede cambiar significativamente dependiendo de la región de cultivo, condiciones ambientales y agronómicas, tiempo de cosecha, etapas de desarrollo de las plantas o el método de extracción utilizado. El término quimiotipo surge para clasificar a poblacio-

nes de la misma especie botánica pero que tienen variaciones notables en la composición y concentración de varios de los compuestos que componen su perfil químico (Soria et al., 2008; Abada et al., 2020).

Estos extractos son mezclas complejas de compuestos volátiles, sintetizados por varias estructuras de las plantas durante su metabolismo secundario. La presencia de alcaloides, fenoles, y compuestos derivados de terpenos hacen que los AEs sean efectivos frente a una amplia variedad de microorganismos patógenos (Sayeed et al., 2014). El principal mecanismo de acción de los aceites esenciales se basa en su capacidad para traspasar la pared celular bacteriana y la membrana citoplasmática, induciendo cambios en la permeabilidad o integridad de la membrana plasmática y desencadenando la lisis celular (Lopez-Romero et al., 2015). Otros estudios han ampliado el conocimiento de los cambios que preceden a la muerte celular, entre los que se incluyen la formación de mesosomas o la disminución de la tolerancia a altas concentraciones de NaCl (Radulovic et al., 2013). Se conoce que el carvacrol es capaz de inhibir la producción de toxinas de *B. cereus*, y que la aplicación de AE de orégano inhibe la producción de enterotoxinas por parte de *S. aureus*, incluyendo la inhibición de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Tariq et al., 2019), propiedad que se potencia con el uso conjunto de varios AEs, como se ha observado con las sinergias entre los AEs de *Mentha pulegium* y *Mentha piperita* frente a *S. aureus* y *E. coli* (Chraibi et al., 2021). Esta capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias resistentes y su actividad frente a otros microorganismos como levaduras, hongos e incluso virus, o la capacidad de evitar la formación de biofilms (Sayeed et al., 2014; Tariq et al., 2019) los posiciona como alternativa a otros aditivos de origen sintético.

El deterioro microbiológico de los alimentos conduce a productos no aptos para el con-



sumo, produciendo importantes pérdidas económicas en la industria alimentaria, y gran cantidad de desperdicios en los hogares. Estos pueden ser alterados por agentes físicos, químicos y biológicos, como microorganismos y enzimas, responsables de procesos metabólicos diversos. Además, los microorganismos patógenos pueden ser causantes de toxiinfecciones, suponiendo un riesgo para la salud del consumidor (Preedy, 2015). Concretamente, la trufa negra (*Tuber melanosporum*) presenta perfiles microbiológicos propios de especies de origen telúrico, con recuentos totales de microorganismos elevados que oscilan entre 8 y 9 log ufc/g, encontrándose casi exclusivamente en el peridio (exterior). En otros alimentos, esta elevada carga microbiana sería un claro indicativo de deterioro biótico, o de alimentos obtenidos por procesos fermentativos. Entre los microorganismos alterantes más importantes de la trufa negra, se encuentran el género *Pseudomonas* (7,2-8,2 log ufc/g), seguido de la familia Enterobacteriaceae (3,5-6,2 log ufc/g) y la microbiota (3,5-6,2 log ufc/g) (Tejedor-Calvo et al., 2024). Además se ha estudiado la prevalencia de bacterias patógenas en las tres especies de trufa de mayor consumo a nivel global, trufa negra (*Tuber melanosporum*), trufa de verano (*Tuber aestivum*) y trufa china (*Tuber indicum*) detectando presencia de *B. cereus*, *Y. enterocolitica* y *C. perfringens* entre otras bacterias patógenas, aunque su concentración ha sido inferior a la dosis mínima infectiva establecida por la EFSA (2005), e incluso por debajo de la normativa legal europea en el caso de *L. monocytogenes* (Marco, 2015). En cualquier caso, estas bacterias son propias de la rizosfera y su presencia no parece estar ligada ni al origen geográfico ni a la especie, y no comprometen la aptitud sanitaria de la trufa, aunque se debe tener en cuenta a la hora de consumir trufa en fresco o sus derivados.

El objetivo del trabajo ha sido determinar la capacidad de inhibición de crecimiento mi-

crobio de cepas alterantes de trufa negra (*Tuber melanosporum*) y patógenos causantes de toxiinfecciones alimentarias de distintos quimiotipos de aceites esenciales procedentes de plantas aromáticas cultivadas en Aragón.

## Material y métodos

### ***Aislamiento, identificación y selección de las cepas microbianas asociadas a la trufa negra (Tuber melanosporum)***

Se emplearon 5 carpóforos enteros sanos procedentes de Anento (Zaragoza). Las trufas, una vez recolectadas, fueron transportadas en cajas de poliestireno expandido bajo refrigeración hasta su llegada al laboratorio. Se cepillaron bajo el grifo, desinfectando el cepillo entre muestras, y se dejaron secar al aire. El análisis microbiológico se realizó siguiendo las Normas ISO: toma de muestras (6887-1:1999), análisis de microorganismos aeroanaerobios mesófilos totales (4833-2:2013), *Pseudomonas* spp. (13720:2011) y bacterias ácido lácticas (15214:1998).

Las trufas se homogeneizaron en un stomacher Lab-Blender Circulator 400 (Seward Laboratory, Reino Unido) en agua de peptona al 0,1 % durante 2 min a 260 rpm. Las placas de Petri se incubaron durante 5 d para seleccionar las colonias según su morfología con ayuda de una lupa binocular Leica EZ4 (Wetzlar, Alemania). Se aislaron 10 colonias en base a su morfología (6 procedentes de PCA, 2 de Agar *Pseudomonas*+CFC y 2 de Agar MRS), que se sembraron por agotamiento en agar TSA (agar tripton y soja), y se incubaron a 30 °C durante 48 h. La caracterización de colonias en Gram+ y Gram- se realizó mediante la prueba del KOH, resuspendiendo una colonia de cada cepa en un portaobjetos con una gota de esta solución al 3 % (Gregersen, 1978).

Finalmente, se realizó la identificación molecular de los microorganismos aislados mediante la secuenciación de la región 16S del ADN (Tejedor-Calvo *et al.*, 2020). Para ello, se introdujo en viales una cantidad significativa de microorganismo directamente desde cultivo puro, se añadieron 100  $\mu$ l de PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, EE.UU.) y se llevaron a 100 °C durante 10 min en un termobloque (Eppendorf ThermoMixer C, Alemania). Se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min (Gyrozen, Corea del Sur) y se determinó la concentración de ADN en el sobrenadante con un NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, EE.UU.). La amplificación se realizó mediante PCR (94 °C - 2 min; [94 °C - 30 s; 51 °C - 1 min; 72 °C - 1 min]  $\times$  33 ciclos; 72 °C - 7 min; 4 °C -  $\infty$ ) utilizando los cebadores 8F-1492R. Posteriormente, se purificó el producto de reacción con el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Inc., EE. UU.).

Para verificar la calidad de la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % tamponado (Buffer Tris, Ácido acético, EDTA) y 0,8  $\mu$ L de Midori Green (NIPPON Genetics GmbH, Alemania). La corriente empleada fue de 60 mV, a partir de una fuente de electroforesis BioRad PowerPac HV (BioRad, EE.UU.) y la revelación de bandas se llevó a cabo en un transiluminador (Chemidoc XRS+ BioRad, EE.UU.) con la ayuda del software GeneSys (Syngene, Reino Unido). Finalmente, se añadieron 3  $\mu$ L de Primer R y 10  $\mu$ L del producto de la PCR en microtubos refrigerados a 10 °C, y se enviaron a secuenciar a la empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal). Las secuencias se visualizaron y depuraron con el software 4Peaks (Nucleobytes, Holanda), y se compararon con la base de datos de nucleótidos en la Web BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional de Información Biotecnológica de EEUU (NCBI, 2024).

Tras la identificación, se eligieron 4 cepas en base a su capacidad de alterar las trufas, 2

Gram+ (*Bacillus* sp. y *Microbacterium* sp.), y 2 Gram- (*Pseudomonas fluorescens* y *Yersinia enterocolitica*), esta última también es causante de toxiinfecciones alimentarias. Añadidos a este patógeno, se seleccionaron otros patógenos procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), 3 de ellos Gram+ (*Staphylococcus aureus* CECT435, *Bacillus cereus* CECT135 y *Listeria monocytogenes* CECT 911) y 3 Gram- (*Escherichia coli* O157:H7 CECT516, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT4155), debido a su importancia por encontrarse de forma natural en trufas y otras setas comestibles o durante su manipulación (Venturini *et al.*, 2011; Marco, 2015; Romanazzi *et al.*, 2016).

#### **Obtención de los aceites esenciales y análisis del perfil químico**

El Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón cuenta con varias plantaciones experimentales de plantas aromáticas medicinales (PAM) en producción para evaluar la productividad de diferentes especies y la calidad de los aceites esenciales (AEs) obtenidos. Inicialmente se seleccionaron 10 quimiotipos en base a su rendimiento pertenecientes a los géneros *Satureja*, *Origanum*, *Thymus*, *Salvia*, *Lavandula*, y *Mentha* (Figura 1) para hacer un cribado en función de su capacidad antimicrobiana.

Los AEs fueron obtenidos mediante hidrodestilación en un aparato tipo Clevenger de acuerdo con el método descrito por la Farmacopea Europea de la Dirección Europea de Calidad de los Medicamentos (EDQM), y se conservaron durante todo el estudio en viales de color ámbar y en refrigeración. Los AEs se analizaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010 acoplado a un detector de masas Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra (ionización electrónica,

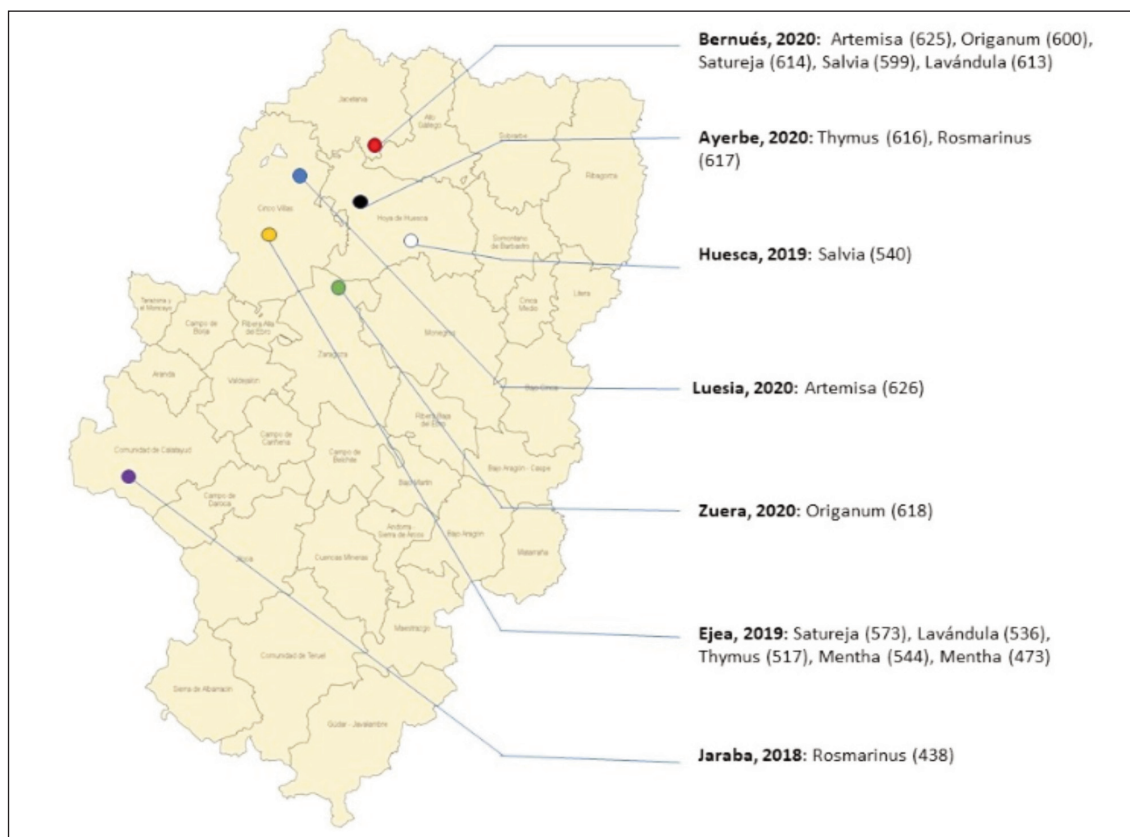


Figura 1. Parcelas experimentales de cultivo de plantas aromáticas y medicinales (PAM) localizadas en Aragón de donde se han obtenido los aceites esenciales (Aes) ensayados.

Figure 1. Experimental plots for the cultivation of aromatic and medicinal plants (PAM) located in Aragón from which the essential oils (EOs) tested were obtained.

70 eV) y equipado con una columna capilar de 30 m × 0,25 mm y 0,25 μm de espesor de película (Teknokroma TRB-5 (95 %) Dimetil-(5 %) difenilpolisiloxano). Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: relación de división (20:1), T<sup>a</sup> inyector 300 °C, T<sup>a</sup> línea de transferencia conectada al espectrómetro de masas 250 °C, T<sup>a</sup> inicial de la columna 70 °C con rampa de T<sup>a</sup> (6° C/min) hasta 290 °C.

Para la identificación de compuestos, se utilizaron espectros de masas de ionización de electrones y datos de retención e índices de retención lineal calculados (LRI), que se com-

pararon con los de los estándares o encontrados en la base de datos de espectros de masas Wiley 229. Además, los tiempos o índices de retención de los estándares y marcadores conocidos de los AEs también fueron empleados para confirmar las identidades de los constituyentes.

#### **Cribado de los AEs seleccionados mediante difusión en agar**

Para seleccionar los AEs con mayor actividad antimicrobiana se hizo un ensayo de difusión

en agar por discos (Balouiri et al., 2016) enfrentando cada extracto con las 10 cepas bacterianas indicadas. Las cepas se incubaron en tubos de Caldo de Triptona y Soja (TSB) a 37 °C/24 h. Tras verificar un crecimiento visible, se realizaron diluciones hasta conseguir una concentración de 0,5 sobre la escala McFarland ( $1,5 \times 10^8$  ufc/mL). Posteriormente se sembraron 100  $\mu$ L por extensión en superficie en placas de agar Mueller Hinton (MHA) y se depositaron discos de celulosa de 6 mm de diámetro impregnados con 8  $\mu$ L de AE. Se utilizó agua destilada como control negativo, vancomicina como control positivo para bacterias Gram+ (20  $\mu$ g/disco) y gentamicina para Gram- (10  $\mu$ g/disco). Finalmente, el radio de los halos de inhibición se midió con un calibre tras incubar las placas a 37 °C/24 (Ghazanfari et al., 2020).

#### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y mínima bactericida de los AEs**

La concentración mínima de un agente antimicrobiano capaz de impedir el crecimiento visible de un microorganismos después de su incubación se denomina MIC (CLSI, 2015). Para ello, cada AE se mezcló con caldo Mueller-Hinton (MHB) y Tween 80 (Sounouvou et al., 2021) en concentraciones decrecientes (1 % -  $9,75 \cdot 10^{-4}$  %). Se añadieron 150  $\mu$ L de la emulsión a la concentración correspondiente en placas de 96 pocillos y cada pocillo se inoculó con 50  $\mu$ L de la suspensión bacteriana adecuada previamente ajustada a la concentración 0,5 de la escala McFarland. Se utilizó vancomicina y gentamicina como controles positivos, y MHB + Tween 80 como control negativo. Tras incubar las placas a 37 °C durante 24 h se midió la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). La MIC se estableció como la menor concentración de AE en la que hubo ausencia total de turbidez, pero sí se observó crecimiento en placa tras sembrar

100  $\mu$ L en agar Mueller Hinton (MHA) e incubar las placas a 37 °C/24 h (Ghazanfari et al., 2020). Por otro lado, se consideró que la concentración mínima bactericida (MBC) de cada AE fue aquella que inhibió plenamente el crecimiento de los microorganismos en las placas de MHA tras la incubación (CLSI, 2015; Ghazanfari et al., 2020).

## **Resultados y discusión**

### **Análisis preliminar de las cepas microbianas asociadas a *Tuber melanosporum***

El origen telúrico de la trufa negra quedó patente con la alta heterogeneidad de morfologías bacterianas obtenidas tras los cultivos iniciales en placa. Dentro de la diversidad de especies microbianas asociadas a este producto, el género *Pseudomonas* resultó ser mayoritario, coincidiendo con Romanazzi et al. (2016). Las secuencias de las morfologías seleccionadas se visualizaron y limpiaron con el software libre 4Peaks (Nuclebytes, Holanda) y se identificaron mediante Blast. Finalmente, se seleccionaron 3 cepas bacterianas alterantes procedentes de la trufa negra (*Bacillus* sp., *Microbacterium* sp., *P. fluorescens*) y una patógena (*Y. enterocolitica*).

### **Perfil químico de los aceites esenciales**

La capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos que exhibe un AE está directamente relacionada con su perfil químico, debiéndose no solo a la actividad antimicrobiana de los compuestos químicos mayoritarios de ese extracto, si no a la sinergia ejercida entre estos compuestos y otros presentes en menor cantidad (Chraibi et al., 2021). Diversos estudios afirman que cada quimiotipo contiene una serie de moléculas que presentan un mayor efecto bactericida o bacterios-

tático responsables del potencial antimicrobiano de cada AE (Ounoughi et al., 2020; Semerdjieva et al., 2020; Kowalczyk et al., 2021). Además, los compuestos pueden presentar diferentes mecanismos de acción y establecer sinergias como sucede con el  $\alpha$ -terpineno, en sí mismo tiene un bajo efecto bactericida pero es capaz de inhibir las bombas de eflujo TetK de algunos microorganismos. En el caso de *S. aureus*, aumenta el efecto de otros antimicrobianos al no poder ser expulsados extracelularmente tan rápidamente (Limaverde et al., 2017).

La Tabla 1 muestra los perfiles químicos de los AEs que demostraron cierta actividad antimicrobiana. *T. vulgaris* presentó concentraciones moderadas de eucaliptol (15,2 %), linalol (14,7 %) y timol (9,0 %). En *L. angustifolia*, acetato de linalilo fue el compuesto más abundante llegando a suponer la mitad de su composición (50,1 %), seguido del linalol (21,5 %).

Los dos AEs de *S. montana* se caracterizaron por una alta concentración de carvacrol (41,3 % y 37,1 %), compuesto con gran efecto biocida demostrado, seguido de otros compuestos con actividad antimicrobiana como p-cimeno (17,6 % y 25,5 %),  $\gamma$ -terpineno (14,1 % y 7,1 %) y timol (3,4 % y 7,3 %). Los perfiles químicos de estos dos AEs de la misma especie presentaron diferencias en la concentración de los compuestos mencionados, así como en otros componentes minoritarios, pudiendo ser debido a su diferente procedencia. Aunque habría que estudiar el efecto de cada compuesto químico individualmente, y combinarlos para establecer sinergias, en líneas generales se puede observar como el perfil químico de los dos AEs de *S. montana* se correlaciona con su actividad antimicrobiana.

Por otro lado, el AE de *S. rosmarinus* destacó por una alta concentración de  $\alpha$ -pineno (28,4 %) y alcanfor (9,5 %), mientras que en el de la especie *O. vulgare* subsp. *virens* destacaron  $\gamma$ -terpineno (21,4 %) y p-cimeno (10,6 %). Finalmente, el AE de *M. rotundifolia*,

mostró un perfil químico muy diferente al resto de especies estudiadas, con concentraciones más bajas de los compuestos mencionados anteriormente; únicamente destacó el limoneno como compuesto común entre ellas, con un 6,6 % de abundancia. Aunque presentó un perfil complejo y con cantidades interesantes de otros compuestos como la piperitona (20,8 %) o el óxido de piperitona (37,0 %), este hecho puede explicar la baja actividad antimicrobiana que exhibió este aceite esencial.

### Cribado de los aceites esenciales

La capacidad de inhibición de crecimiento bacteriano en medio sólido de los de 10 quimiotipos fue mayor contra las bacterias Gram+ (Tabla 2). La falta de membrana externa de las bacterias Gram+ hace que sean más susceptibles a los mecanismos de acción de los AEs, a diferencia de las Gram-, más resistentes, y que sí poseen esta envoltura celular (Breijyeh et al., 2020). Los dos AEs de *S. montana* presentaron la mayor actividad antibacteriana frente a *Bacillus* sp. (14 mm y 9,5 mm). Además ambos AEs presentaron una actividad antimicrobiana superior en la mayoría de bacterias evaluadas, seguidos de los AEs de *O. vulgare* subsp. *virens* y *T. vulgaris*. Estos resultados coinciden con los observados por otros autores que otorgan a los AEs de *S. montana* una gran capacidad de inhibición con halos de  $38,50 \pm 2,5$  mm (Djenane et al., 2011).

Aunque los AEs de *L. angustifolia* y *M. rotundifolia* no fueron efectivos frente a *P. fluorescens*, *S. enterica*, *S. aureus* y *Y. enterocolitica*, estos extractos también se seleccionaron por su capacidad de inhibir otros de los microorganismos ensayados. Por otro lado, los dos quimiotipos de *R. officinalis* y *S. officinalis* mostraron muy baja o nula actividad frente a todas las bacterias estudiadas, por lo que no fueron seleccionados para los siguientes ensayos.

Tabla 1. Perfil químico de los aceites esenciales de las distintas especies de plantas aromático medicinales con efecto antimicrobiano empleadas.

Table 1. Chemical profile of the essential oils of the different species of aromatic medicinal plants with antimicrobial effect tested.

Compuesto	<i>T.v.</i>	<i>L.a.</i>	<i>S.m.</i>	<i>S.m.</i>	<i>O.v.v.</i>	<i>M.r.</i>
triciclono	0,04	0,01	0,02			
$\alpha$ -tuyeno	0,68		1,11	1,34	0,98	
$\alpha$ -pineno	1,63	0,15	0,76	0,98	0,45	
canfeno	0,94	0,20	0,31	0,40	0,16	
sabineno	1,26	0,06	0,22		1,16	1,05
$\beta$ -pineno	1,89	0,12	1,29	0,44	0,36	1,65
3-octanona	0,03	0,49			0,08	
mircenol	6,38	0,31	1,70	1,20	2,09	1,21
3-octanol	0,05	0,05	0,07		0,02	
octanal		0,01				
$\alpha$ -felandreno	0,06	0,02	0,29	0,23	0,23	
$\Delta$ -3-careno	0,02		0,08		0,05	
$\alpha$ -terpineno	0,65		1,93	1,94	2,72	
<i>p</i> -cimeno	9,83	0,06	17,57	25,48	10,58	
limoneno	1,67	1,30	0,76	1,22	0,63	6,63
eucaliptol	15,17	2,07	0,42	0,77	0,25	0,59
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno	0,02	1,98	0,30		2,00	0,63
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	0,04	1,08	0,17		2,34	
$\gamma$ -terpineno	2,36	0,02	14,14	7,13	21,43	0,25
sabineno hidrato	1,91	0,05	0,93	1,05	0,46	
terpinoleno	0,28	0,21	0,11		0,18	
linalol	14,74	21,51	0,72	0,88	8,42	
alcanfor	0,96	4,26	0,04		0,04	
borneol	0,81	3,36	0,85	1,39	0,32	
terpinen-4-ol	1,26	0,06	0,41	0,63	0,38	0,25
$\alpha$ -terpineol	2,49	0,67	0,04		1,94	
dehidrocarvona	0,12					
metil ester de timol	0,50		0,02		1,55	

*T.v.*: *Thymus vulgaris*. *L.a.*: *Lavandula angustifolia*. *S.m.*: *Satureja montana* *O.v.v.*: *Origanum vulgare* subsp. *virens*. *M.r.*: *Mentha rotundifolia*.

Tabla 1. Perfil químico de los aceites esenciales de las distintas especies de plantas aromático medicinales con efecto antimicrobiano empleadas (continuación).

Table 1. Chemical profile of the essential oils of the different species of aromatic medicinal plants with antimicrobial effect tested (continuation).

Compuesto	T.v.	L.a.	S.m.	S.m.	O.v.v.	M.r.
butirato de hexilo		0,65				
nerol		0,03				
neral	0,06					
cuminal		0,29	0,03			
carvona			0,14			
metil ester de carvacrol	0,37		0,10		5,50	
acetato de linalilo	5,85	50,11			0,86	1,25
geranial	0,10					
acetato de bornilo	0,31	0,11			0,02	
acetato de lavandulilo		2,73				
timol	9,02		3,36	7,25	11,51	
carvacrol	1,96	0,02	41,29	37,14	6,78	
acetato de $\alpha$ -terpinilo	7,29					
acetato de timilo	0,05		0,03			
acetato de carvacrol			0,22			
acetato de nerilo	0,06	0,14				0,28
$\alpha$ -cubebeno					0,03	
$\alpha$ -copaeno	0,08	0,02	0,03		0,07	
$\beta$ -burboneno			0,28		0,21	0,31
acetato de geranilo	1,51	0,29				
$\alpha$ -gurjuneno		0,02	0,02			
$\beta$ -elemeno						0,46
$\beta$ -cariofileno	3,84	1,98	3,37	3,90	5,16	
aromadendrene			0,14		0,11	
cumarina		0,03				
$\alpha$ -humuleno	0,14	0,07	0,19		0,61	0,83
trans- $\beta$ -farneseno		1,16	0,02		0,07	
allo aromandrene	0,06		0,05		0,06	

T.v.: *Thymus vulgaris*. L.a: *Lavandula angustifolia*. S.m: *Satureja montana* O.v.v: *Origanum vulgare* subsp. *virens*. M.r: *Mentha rotundifolia*.

Tabla 1. Perfil químico de los aceites esenciales de las distintas especies de plantas aromático medicinales con efecto antimicrobiano empleadas (continuación).

Table 1. Chemical profile of the essential oils of the different species of aromatic medicinal plants with antimicrobial effect tested (continuation).

Compuesto	<i>T.v.</i>	<i>L.a.</i>	<i>S.m.</i>	<i>S.m.</i>	<i>O.v.v.</i>	<i>M.r.</i>
germacreno-D	1,00	1,53	1,77	0,33	3,66	7,39
biciclogermacreno	0,74	0,06			1,90	
$\alpha$ -muuroleno	0,05		0,08		0,04	
$\beta$ -bisaboleno	0,06		2,63	3,36	2,76	
$\gamma$ -cadineno	0,19	0,16	0,24	0,39	0,15	
$\Delta$ -cadineno	0,28	0,07	0,58	0,42	0,48	
espatulenol	0,13		0,23		0,60	
óxido de cariofileno	0,85	0,30	0,81	1,18	0,46	
$\beta$ -eudesmol	0,07					
$\alpha$ -eudesmol	0,12					
$\alpha$ -bisabolol		2,15			0,07	
t-muurolol			0,10		0,08	
chamazuleno	11,54					
farnesol						1,85
calameneno						0,53
viridiflorol						0,51
acetato de 1-octen-3-ilo						1,24
endo-borneol						2,31
p-cimen-8-ol						0,51
cuminaldehído						1,12
piperitona						20,77
óxido de piperitona						36,97
cis-jasmona						0,35
cinerolona						2,72
trans-cariofileno						6,07
$\beta$ -cubeneno						0,41
epi-biciclosesquifelandreno						0,69

*T.v.*: *Thymus vulgaris*. *L.a.*: *Lavandula angustifolia*. *S.m.*: *Satureja montana* *O.v.v.*: *Origanum vulgare* subsp. *virens*. *M.r.*: *Mentha rotundifolia*.



Tabla 2. Radio de halos de inhibición (mm) producidos por distintos aceites esenciales por el método de difusión en agar frente a bacterias asociadas a la pérdida de calidad de la trufa negra (*Tuber melanosporum*), y otras bacterias causantes de toxiinfecciones alimentarias.

Table 2. Radius of inhibition halos (mm) produced by different essential oils by the agar diffusion method against bacteria associated with the loss of quality of black truffle (*Tuber melanosporum*), and other food-borne toxin-infective bacteria.

	<i>T. vulgaris</i>	<i>L. angustifolia</i>	<i>S. montana</i>	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>virens</i>	<i>M. rotundifolia</i>	C+	C-
<i>S. aureus</i>	2,5	1	5	2	0	5	0
<i>B. cereus</i>	3,5	5,5	7	3,5	2,5	6	0
<i>L. monocytogenes</i>	0	1	4	2	2	1	0
<i>Bacillus</i> sp.	2	0	14	4	8	5	0
<i>Microbacterium</i> sp.	4	2,5	8	3	3	7	0
<i>S. enterica</i>	1	0	4,5	1	3	10	0
<i>Y. enterocolitica</i>	2,5	2,5	5,5	3,5	0	9	0
<i>P. fluorescens</i>	2	0	4	2	0	11	0
<i>E. coli</i> O157:H7	2	5,5	4	3	2	12	0
<i>P. aeruginosa</i>	3	1,5	7	3	2,5	8	0

C+: control positivo, 20 µg/disco de vancomicina para bacterias Gram+ y 10 µg/disco de gentamicina para bacterias Gram-. C-: control negativo.

### Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y mínima bactericida (MBC)

Aunque para algunas bacterias estudiadas no se llegó a alcanzar la MIC con la mayor concentración de AE aplicada, la mayor eficacia bactericida de los AEs de *S. montana* fue frente a *S. aureus* (0,0625 %) y *E. coli* O157:H7 (0,125 % y 0,0625 %), seguido de *L. monocytogenes* (0,25 %) confirmando su potencial capacidad antimicrobiana (Tabla 3). Por otro lado, la bacteria más resistente a los AEs resultó ser *S. enterica*, con un MIC superior al 1 % frente a todos los AEs estudiados. *S. enterica* es un patógeno ampliamente conocido en la industria alimentaria y se han observado múltiples resistencias a antibióticos por parte de esta bacteria Gram- (Alenazy, 2022).

Los resultados de Concentración Mínima Bactericida (MBC) se presentan en la Tabla 4 en forma de porcentajes de AE empleado. Como cabía esperar, ambos AEs de *S. montana* presentaron gran poder bactericida frente a *S. aureus* (0,125 %), *L. monocytogenes* (0,25 %) y *E. coli* O157:H7 (0,125 %). Por el contrario, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *S. enterica* mostraron una gran resistencia frente a estos AEs.

Por otro lado, cabe destacar la escasa eficacia de otros AEs como *O. vulgare* subsp. *virens*, *L. angustifolia* y *T. vulgaris* con valores de MBC de 1 % y superiores, que concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores, que emplearon concentraciones del 5 % y 1 % de AE de *T. vulgaris* frente a cepas *S. aureus* y *E. coli* (Motlagh et al., 2014). Para establecer unos resultados satisfactorios de MIC y MBC, las concentraciones utilizadas para estos AEs deberían aumentarse, sin embargo, esto supone un problema para técnicas basadas en espectrofotometría en las que la propia turbidez del aceite dificulta las medidas de proliferación bacteriana.

Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de aceites esenciales (%) de distintas especies de plantas aromático medicinales ensayados en bacterias alterantes de la calidad de la trufa negra (*Tuber melanosporum*) y causantes de toxiinfecciones alimentarias.

Table 3. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of essential oils (%) of different species of aromatic medicinal plants tested on bacteria associated with the loss of quality of black truffle (*Tuber melanosporum*), and other food-borne toxi-infective bacteria.

	<i>T. vulgaris</i>	<i>L. angustifolia</i>	<i>S. montana</i>	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>virens</i>	<i>M. rotundifolia</i>	
<i>S. aureus</i>	0,50	>1	0,0625	0,0625	>1	1-0,5
<i>B. cereus</i>	>1	>1	0,25	0,25	>1	1-0,5
<i>L. monocytogenes</i>	0,50	>1	0,125	0,125	>1	1-0,5
<i>Bacillus</i> sp.	>1	>1	0,25	0,25	>1	1-0,5
<i>Microbacterium</i> sp.	0,50	>1	0,25	0,25	>1	1-0,5
<i>S. enterica</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>Y. enterocolitica</i>	0,50	>1	0,50	0,25	>1	>1
<i>P. fluorescens</i>	>1	>1	0,50-0,25	>1	>1	>1
<i>E. coli</i> O157:H7	>1	>1	0,0625	0,125	>1	1-0,5
<i>P. aeruginosa</i>	1-0,5	>1	>1	0,50-0,25	>1	>1

Tabla 4. Concentraciones mínimas bactericidas (MCB) de aceites esenciales (%) de distintas especies de plantas aromático medicinales ensayados en bacterias alterantes de la calidad de la trufa negra (*Tuber melanosporum*) y causantes de toxiinfecciones alimentarias.

Table 4. Minimum bactericidal concentrations (MCB) of essential oils (%) of different species of aromatic medicinal plants tested on bacteria associated with the loss of quality of black truffle (*Tuber melanosporum*), and other food-borne toxi-infective bacteria.

	<i>T. vulgaris</i>	<i>L. angustifolia</i>	<i>S. montana</i>	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>virens</i>	<i>M. rotundifolia</i>	
<i>S. aureus</i>	1	>1	0,125	0,125	>1	1
<i>B. cereus</i>	>1	>1	0,50	0,50	>1	1
<i>L. monocytogenes</i>	1	>1	0,25	0,25	>1	1
<i>Bacillus</i> sp.	>1	>1	0,50	0,50	>1	1
<i>Microbacterium</i> sp.	1	>1	0,50	0,50	>1	1
<i>S. enterica</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>Y. enterocolitica</i>	1	>1	1	0,50	>1	>1
<i>P. fluorescens</i>	>1	>1	0,50	>1	>1	>1
<i>E. coli</i> O157:H7	>1	>1	0,125	0,25	>1	1
<i>P. aeruginosa</i>	1	>1	>1	0,50	>1	>1

## Conclusiones

La trufa negra (*Tuber melanosporum*) presenta una carga microbiológica heterogénea, compuesta por diferentes géneros microbianos entre los que destaca el género *Pseudomonas*, estrechamente relacionado con la pérdida de calidad de este producto fresco.

A pesar de haberse identificado compuestos con demostrado poder antimicrobiano en los aceites esenciales procedentes de diferentes especies de plantas aromáticas, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* presentó la mayor resistencia frente a los diferentes aceites esenciales ensayados.

Los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Satureja montana* con alto contenido en eucaliptol, y carvacrol, respectivamente, han mostrado un efecto prometedor para inhibir la proliferación de los microorganismos estudiados, demostrando su potencial aplicación para la conservación de alimentos, y más concretamente para la conservación de trufa en fresco, pudiendo ser una alternativa a los tratamientos convencionales.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Diputación Provincial de Zaragoza (proyecto "Mejora de la Eficiencia de la Producción y la Innovación Agroalimentaria de la Trufa en la Provincia de Zaragoza, ejercicio 2024"), y al proyecto nº 101007623 "INTACT - Innovation in truffle cultivation, preservation, processing and wild truffle resources management") financiado por la Unión Europea en el Programa Marco de Investigación e Innovación (2014-2020) de Horizonte 2020.

## Referencias bibliográficas

- Abada M.B., Hamdi S.H., Masseoud C., Jroud H., Boussih E., Jemâa J.M.B. (2020). Variations in chemotypes patterns of Tunisian *Rosmarinus officinalis* essential oils and applications for controlling the date moth *Ectomyelois ceratoniae* (Pyralidae). *South African Journal of Botany* 128: 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.010>.
- Abdellaoui M., Bouhlali E. dine T., Derouich M., El-Rhaffari L. (2020). Essential oil and chemical composition of wild and cultivated fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): A comparative study. *South African Journal of Botany* 135: 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.09.004>.
- Alenazy R. (2022). Antibiotic resistance in *Salmonella*: Targeting multidrug resistance by understanding efflux pumps, regulators and the inhibitors. *Journal of King Saud University - Science* 34(7): 102275. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102275>.
- Balouiri M., Sadiki M., Ibensouda S.K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2): 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Breijyeh Z., Jubeh B., Karaman R. (2020). Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules* 25(6): 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>.
- Chraibi M., Fadil M., Farah A., Lebrazi S., Fikri-Benbrahim K. (2021). Antimicrobial combined action of *Mentha pulegium*, *Ormenis mixta* and *Mentha piperita* essential oils against *S. aureus*, *E. coli* and *C. tropicalis*: Application of mixture design methodology. *LWT* 145: 111352. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111352>.
- CLSI (2015). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved standard – Tenth edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards.

- Costa D.C., Costa H.S., Albuquerque T.G., Ramos F., Castilho M.C., Sanches-Silva A. (2015). Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science and Technology* 45(2): 336-354. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.009>.
- Djenane D., Yangüela J., Montañés L., Djerbal M., Roncalés P. (2011). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control* 22(7): 1046-1053. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.015>.
- Ghazanfari N., Mortazavi S.A., Yazdi F.T., Mohammadi M. (2020). Microwave-assisted hydrodistillation extraction of essential oil from coriander seeds and evaluation of their composition, antioxidant and antimicrobial activity. *Heliyon* 6(9): e04893. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04893>.
- Grand View Research, Inc. (2020). U.S. Essential oil market size, share and trends analysis report by product (Eucalyptus, Lemon), by application (Flavors, Fragrances), and segment forecasts, 2016-2024. Disponible en: <https://www.grandviewresearch.com> (Consultado: 12-04-2022)
- Gregersen T. (1978). Rapid Method for Distinction of Gram Negative from Gram Positive Bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 5: 123-127. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00498806>.
- Huntington H.P. (2000). Using traditional ecological knowledge in science: Methods and applications. *Ecological Applications* 10(5): 1270-1274. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[1270:UTEKIS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[1270:UTEKIS]2.0.CO;2).
- Kowalczyk A., Piątkowska E., Ku P., Marijanovi Z., Jerkovi I., Tuberoso C.I.G., Fecka I. (2021). Volatile compounds and antibacterial effect of commercial mint cultivars – chemotypes and safety. *Industrial Crops and Products* 166: 113430. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113430>.
- Limaverde P.W., Campina F.F., da Cunha F.A.B., Crispim F.D., Figueredo F.G., Lima L.F., Oliveira-Tintino C.D.M., de Matos Y.M.L.S., Morais-Braga M.F.B., Menezes I.R.A., Balbino V.Q., Coutinho H.D.M., Siqueira-Júnior J.P., Almeida J.R.G.S., Tintino S.R. (2017). Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. *Food and Chemical Toxicology* 109(2): 957-961. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.031>.
- Lopez-Romero J.C., González-Ríos H., Borges A., Simões M. (2015). Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2015(1): 795435. <https://doi.org/10.1155/2015/795435>.
- Marco P. (2015). Caracterización bromatológica y microbiológica del G° *Tuber* y aplicación de procesos combinados para su conservación. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Miller L.H., Su X. (2011). Artemisinin: Discovery from the Chinese herbal garden. *Cell* 146(6): 855-858. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.024>.
- Motlagh M.K., Kazemi M., Ghasemi H.A., Farahani K., Yahyaei M., Rezaei M., De Rensis F., Taddei S. (2014). Antibacterial effect of medicinal plant essence (*Thymus vulgaris*) on major bacterial mastitis pathogen *in vitro*. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 2(2): 286-294.
- Muñoz Páez A., Garritz Ruiz A. (2013). Mujeres y química. Parte I: de la antigüedad al siglo XVII. *Educación Química* 24(1): 2-7. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)73187-2](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)73187-2).
- Navarro-Rocha J., Andrés M.F., Díaz C.E., Burillo J., González-Coloma A. (2020). Composition and biocidal properties of essential oil from pre-domesticated Spanish *Satureja montana*. *Industrial Crops and Products* 145: 111958. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111958>.
- NCBI (2024). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Consultado: 12-04-2022)
- Ounoughi A., Ramdani M., Lograda T., Chalard P., Figueredo G. (2020). Chemotypes and antibac-

- terial activities of *Inula viscosa* essential oils from Algeria. *Biodiversitas* 21(4): 1504-1517. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210431>.
- Preedy V.R. (2015). *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Academic Press, Elsevier. pp. 99-117. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-06581-7>.
- Radulovic N.S., Blagojevic P.D., Stojanovic-Radic Z.Z., Stojanovic N.M. (2013). Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. *Current Medicinal Chemistry* 20(7): 932-952. <https://doi.org/10.2174/0929867311320070008>.
- Romanazzi G., Servili A., Murolo S. (2016). Postharvest diseases of *Tuber melanosporum*. *Acta Horticulturae* 1144: 129-132. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1144.18>
- Roosta R.A., Moghaddasi R., Hosseini S.S. (2017). Export target markets of medicinal and aromatic plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 7: 84-88. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.06.003>.
- Saha A., Basak B.B. (2020). Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products* 145: 111979. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111979>.
- Sayeed M., Degaga B., Azam T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research* 2(1): 1-7.
- Semerdjieva I.B., Zheljazkov V.D., Dincheva I., Asatkie T., Ka ániová M. (2020). Chemotypes of *Juniperus oxycedrus* in Bulgaria and the antimicrobial activity of galbuli essential oils. *Industrial Crops and Products* 158: 113005. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113005>.
- Soria A.C., Esteban J., Morales R., Martín-Álvarez P.J., Sanz J. (2008). Validación estadística de la presencia en plantas de quimiotipos caracterizados por la concentración de componentes volátiles obtenida mediante GC-MS. *Botanica Complutensis* 32: 225-236.
- Sounouvou H.T., Toukourou H., Catteau L., Toukourou F., Evrard B., Van Bambeke F., Gbaguidi F., Quetin-Leclercq J. (2021). Antimicrobial potentials of essential oils extracted from West African aromatic plants on common skin infections. *Scientific African* 11: e00706. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00706>.
- Tariq S., Wani S., Rasool W., Shafi K., Bhat M.A., Prabhakar A., Shalla A.H., Rather M.A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis* 134: 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>.
- Tejedor-Calvo E., García-Barreda S., Sánchez S., Marco P. (2020). Effect of bacterial strains isolated from stored shiitake (*Lentinula edodes*) on mushroom biodeterioration and mycelial growth. *Agronomy* 10(6): 898. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060898>.
- Tejedor-Calvo E., Baquero-Aznar V., Vega-Diez S., Salvador M.L., Sanz M.A., Sánchez S., Marco P., García-Barreda S., González-Buesa J. (2024). Potential of a smart gelatine hydrogel-based package to extend fresh black truffle (*Tuber melanosporum*) shelf-life preserving its aroma profile. *Food Hydrocolloids* 151: 109874. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.109874>.
- Venturini M.E., Reyes J.E., Rivera C.S., Oria R., Blanco D. (2011). Microbiological quality and safety of fresh cultivated and wild mushrooms commercialized in Spain. *Food Microbiology*, 28(8): 1492-1498. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.007>.
- WHO. (2019). *WHO Global report on traditional and complementary medicine*. World Health Organization. Ginebre, Suiza. 226 pp.

(Aceptado para publicación el 5 de agosto de 2024)

# Aplicación de la Imagen de Resonancia Magnética (IRM) al análisis morfológico no destructivo de piezas cárnicas. Una aproximación a la selección de perniles

Víctor Remiro<sup>1,\*</sup>, María Isabel Cambero<sup>1</sup>, María Isabel García-Real<sup>2</sup>,  
María Dolores Romero de Ávila<sup>1</sup>, David Castejón<sup>3</sup>, Carlos Santos<sup>1</sup> y  
María Encarnación Fernández-Valle<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Sección Departamental Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid, España.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid, España.

<sup>3</sup> ICTS Bioimagen Complutense. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid, España.

## Resumen

Para determinar el potencial de aplicación de la imagen de resonancia magnética (IRM) en la evaluación de la aptitud tecnológica de perniles frescos a nivel industrial se han obtenido imágenes de resonancia magnética potenciadas en  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_2^*$  y densidad protónica (DP). Con este objetivo, se analizaron perniles frescos de cerdo blanco clasificados en cuatro categorías en función de su contenido graso. En cada pieza se determinó, utilizando imágenes en el plano axial potenciadas en DP, el espesor de la grasa subcutánea (GS) sobre los músculos *rectus femoris* (RF), *vastus lateralis*, *biceps femoris* y *semitendinosus* (ST) a nivel de la longitud media del fémur. Además, se estimó el valor promedio del espesor de la GS en zonas seleccionadas (SL) entre los músculos RF y ST. Se ha establecido una correlación lineal ( $R^2 = 0,85$ ;  $p < 0,05$ ) entre el espesor promedio de la GS en las zonas SL y el contenido graso total del pernil. El análisis mediante IRM del interior de las piezas permitió la detección de defectos internos como hemorragias y acúmulos de sangre, lesiones articulares y óseas, anomalías del ganglio poplíteo y desgarros musculares, que posteriormente fueron contrastadas mediante la disección de las piezas. Muchas de estas lesiones tienen una importante repercusión en la aparición de defectos en jamón curado. Se concluye que la IRM, como técnica no destructiva, es una herramienta adecuada para la detección de defectos internos en piezas íntegras, así como para la estimación del contenido total de grasa del pernil.

**Palabras clave:** IRM, daños estructurales, grasa subcutánea, detección de lesiones.

**Application of Magnetic Resonance Imaging (MRI) to non-destructive morphological analysis of meat pieces. An approach to the selection of pork legs**

## Abstract

In order to determine the potential application of magnetic resonance imaging (MRI) in the evaluation of the technological aptitude of fresh pork legs at industrial level,  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_2^*$  and proton density (PD)

---

\* Autor para correspondencia: vremiro@ucm.es

Cita del artículo: Remiro V., Cambero M.I., García-Real M.I., Romero de Ávila M.D., Castejón D., Santos C., Fernández-Valle M.E. (2024). Aplicación de la Imagen de Resonancia Magnética (IRM) al análisis morfológico no destructivo de piezas cárnicas. Una aproximación a la selección de perniles. ITEA-Información Técnica Económica Agraria 120(3): 224-238. <https://doi.org/10.12706/itea.2023.018>



weighted magnetic resonance images were obtained. For this purpose, fresh white pork legs classified into four categories according to their fat content were analyzed. In each piece, the thickness of the subcutaneous fat (GS) over the *rectus femoris* (RF), *vastus lateralis*, *biceps femoris* and *semitendinosus* (ST) muscles at the level of the mid-femur length was determined using PD weighted axial images. In addition, the average value of GS thickness in selected areas (SL) between RF and ST muscles was estimated. A linear correlation ( $R^2 = 0.85$ ;  $p < 0.05$ ) was established between the average GS thickness in SL zones and the total fat content of the pork leg. MRI analysis of the interior of the pieces allowed the detection of internal defects such as hemorrhages and blood accumulations, joint and bone lesions, popliteal ganglion anomalies and muscle tears, which were subsequently contrasted by dissection of the pieces. Many of these lesions have an important repercussion on the appearance of defects in cured ham. It is concluded that MRI, as a non-destructive technique, is a suitable tool for detecting internal defects in whole pieces, as well as for estimating the total fat content of the ham.

**Keywords:** MRI, structural damage, subcutaneous fat, injuries detection.

## Introducción

La industria cárnica es una de las más importantes dentro del sector agroalimentario en España, siendo la que presenta un mayor porcentaje de cifra de negocios, con un 24,6 % del total, lo cual supone alrededor de 31.032 millones de euros (MAPA, 2022). Dentro de esta industria, los elaborados cárnicos tienen un elevado impacto en la economía, siendo el jamón y la paleta curados los productos con los valores más altos de producción en España, llegando a alcanzar en el último año, valores de 308.000 t, y en términos de exportación, las 67.196 t (ANICE, 2022).

En productos como el jamón curado, en los que el proceso de elaboración se prolonga en el tiempo (en ocasiones, periodos de maduración de más de 12 meses), es especialmente importante asegurar la calidad del producto final. Para ello, se requiere disponer de metodologías que faciliten la selección de las piezas cárnicas frescas con particularidades (como pH y contenido graso) que garanticen un correcto desarrollo de las características sensoriales y que permitan establecer lotes homogéneos. Entre los factores habituales de control, se encuentra el pH final de las piezas cárnicas, por su relevancia en la seguridad, características sensoriales y

aptitud tecnológica. Como es sabido, valores de pH superior a 6,0-6,2 (característicos de las carnes DFD, *Dry, Firm and Dark*) conllevan un mayor riesgo microbiológico y reducen la difusión del agua, mientras que valores de pH inferior a 5,6 (carnes sospechosas de comportamiento PSE, *Pale, Soft and Exudative*) favorecen la penetración de la sal y la pérdida de agua (Bosse et al., 2018). Dada su importancia, el pH es uno de los factores más controlados en la industria cárnica. Otro factor a tener en cuenta en la elaboración de productos curados es el peso total de la pieza en fresco (Lebret y Čandek-Potokar, 2022). Este factor condiciona el tiempo requerido para el salado y la velocidad de deshidratación, así como los procesos de maduración.

El contenido de tejido adiposo del pernil es también un parámetro a considerar en la selección de las piezas destinadas a la producción de jamón curado. Este tejido, tiene una gran relevancia en el desarrollo aromático y sávido del producto final, debido sobre todo a la lipólisis y a la oxidación de sus componentes (Segura et al., 2015). Una gran parte del tejido adiposo del jamón curado corresponde a la grasa subcutánea (GS). Este acúmulo de grasa dificulta la difusión del agua y la penetración de la sal. Por tanto, un mayor espesor de la GS evita la deshidratación rápida

y excesiva, con la consiguiente reducción de las pérdidas de peso a lo largo del proceso de curado. Además, la migración de la sal a través de la fracción magra se ve condicionada tanto por el contenido de GS como por el mayor porcentaje de grasa total de la pieza (Čandek-Potokar y Škrlep, 2012; Segura et al., 2015; Bonfatti y Carnier, 2020). Para la estimación del contenido de grasa de piezas cárnicas íntegras, habitualmente se utilizan métodos que requieren una toma de muestra o medidas aproximadas del espesor de la GS. Estos métodos son laboriosos y en la mayoría de los casos destructivos, pudiendo producir alteraciones en las piezas y su depreciación (Pérez-Palacios et al., 2014; Antequera et al., 2021).

Por otra parte, existen considerables dificultades para analizar la morfología y el estado del interior de las piezas cárnicas, pese a que con frecuencia se presentan lesiones derivadas del manejo de los animales. Muchas de las alteraciones que pueden producirse a nivel óseo y de tejido muscular tienen una fuerte repercusión en la conservación y en el proceso de curado, con afectación de la calidad sensorial del producto final y las consecuentes pérdidas económicas (Čandek-Potokar y Škrlep, 2012). Entre los hallazgos más frecuentes se encuentran fracturas óseas, luxaciones, inflamaciones y roturas de fascias articulares, hipertrofia de ganglios, daños en el sistema vascular (sangre en los vasos, hematomas, equimosis o petequias, presencia de sangre) y abscesos.

En este contexto, tanto para la estimación del contenido de grasa, como para la detección de alteraciones y lesiones, la industria cárnica recurre a distintas técnicas no destructivas o mínimamente invasivas (Pérez-Santaescolástica et al., 2019), como las basadas en el uso de ultrasonidos (Contreras et al., 2021), la espectroscopía de infrarrojo cercano (Kademi et al., 2019), la imagen hiperespectral (Gou et al., 2013), o el empleo de rayos X, entre las que se encuentra también la tomografía

computerizada (de Prados et al., 2015) y las recientes técnicas de absorciometría de rayos X de energía dual (Dual-energy X-ray absorptiometry, DXa) (Leighton et al., 2022).

Otras metodologías que podrían utilizarse en el análisis de piezas íntegras serían las basadas en la resonancia magnética nuclear (RMN), entre las que se encuentra la Imagen de Resonancia Magnética (IRM). Se trata de una técnica, no invasiva, que no requiere contacto con la pieza a analizar y no utiliza radiación ionizante. La IRM posibilita la obtención de imágenes con diferentes contrastes dependiendo de distintos parámetros característicos, como son los tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ ) y transversal ( $T_2$ ,  $T_2^*$ ) o la densidad protónica (DP), que dependerán de las propiedades que tenga cada tejido de la muestra estudiada (Mitchell et al., 2001). Estas imágenes permiten observar la estructura interna de sistemas biológicos, diferenciando tejidos y estructuras. Además, esta técnica permite la monitorización de los cambios estructurales asociados a procesos de degradación, de maduración, de transformación o de conservación (Damez y Clerjon, 2008). En conjunto, es una herramienta válida para la clasificación y la determinación de la calidad de los alimentos.

Aunque esta metodología se ha utilizado fundamentalmente en el diagnóstico médico, su potencial para la industria alimentaria es también muy elevado. No obstante, su implantación en el sector industrial ha estado condicionada por el elevado coste económico de los equipos y la carencia de estudios para adaptarlos a líneas de procesado en continuo. Sin embargo, en los últimos años el diseño de equipos de bajo campo magnético mucho más económicos, el desarrollo de nuevas secuencias y la mejora tecnológica de los equipos permiten actualmente, obtener imágenes en tiempos del orden de segundos o incluso milisegundos (Uecker et al., 2010). Todo ello, abre la posibilidad de su incorpo-



ración a sistemas de producción en el sector agroalimentario.

En esta línea de estudio, se han desarrollado diversos trabajos en los que se ha comprobado la utilidad de las imágenes de resonancia magnética (RM) para detectar lesiones y analizar la morfología de distintos alimentos, especialmente de origen vegetal. Cabe mencionar el uso de la IRM para estimar el efecto de la congelación en naranjas (Barreiro et al., 2008) y en pepinillos (Kotwaliwale et al., 2012), la presencia de semillas en cítricos (Hernández-Sánchez et al., 2005), el oscurecimiento interno de peras (Hernández-Sánchez et al., 2007), así como la presencia de alteraciones en cerezas y en manzanas (Melado-Herreros et al., 2013). A pesar de estos avances, el uso de la IRM en líneas de producción de la industria cárnica está todavía sin desarrollar. No obstante, diversos trabajos de investigación han dejado patente la viabilidad de esta técnica para el análisis de carne y productos cárnicos (Caballero et al., 2021), así como para la monitorización del proceso de maduración de productos cárnicos mediante la evaluación de la difusión de la sal, las pérdidas de peso por deshidratación o los cambios estructurales (García-García et al., 2019; Manzocco et al., 2013).

Por todo esto, el objetivo de este trabajo es estimar el potencial de la IRM para su uso a nivel industrial como herramienta para determinar la adecuación de perniles destinados a la elaboración de jamón curado.

## Material y métodos

### **Materia prima analizada**

Para la realización de este estudio, se utilizaron perniles frescos de 24 cerdos blancos (Large White × Landrace × Duroc), suministrados por una empresa cárnica, tras su obtención a las 48 h después del sacrificio del

animal. El pernil derecho de cada animal se destinó a la estimación del contenido graso, mientras que el izquierdo se utilizó para el análisis por IRM. Las distintas determinaciones se realizaron el mismo día de obtención de las piezas o al día siguiente (en las 48 h tras el sacrificio del animal).

### **Determinación del contenido graso, pH y peso de los perniles**

Todos los perniles se pesaron y se determinó su pH en el músculo *semimembranosus* mediante punción con un pHmetro Crison pH25+ (Hash, Loveland, EE. UU). El contenido graso de la totalidad de las piezas se determinó en un equipo de rayos X Multiscan Technologies (Cocentaina, Alicante, España). De forma adicional, el pernil derecho de cada animal se deshuesó después de la ablación de la porción distal a la altura del tarso. El material resultante de este pernil en su totalidad, se utilizó para la obtención de un homogenizado, tras su picado y mezcla, y se empleó para corroborar el contenido en grasa mediante el método Soxhlet (AOAC, 2006). El pernil izquierdo se reservó íntegro para el análisis mediante IRM. El contenido graso, determinado en el equipo de rayos X, se utilizó para la clasificación de los perniles izquierdos para la clasificación en cuatro categorías (magros, contenidos medios de grasa, grasos y muy grasos). Para el estudio se seleccionaron al menos seis piezas de cada categoría.

### **Análisis mediante IRM**

El análisis de IRM de los perniles izquierdos se realizaron en un equipo de resonancia magnética de bajo campo de diseño en C abierto (Panorama 0,23T, Philips Sistemas Médicos, Holanda). Se empleó una antena de cuerpo modelo XL. Los perniles se colocaron de modo que el eje longitudinal del jamón quedó

alineado con el eje mayor de la antena, es decir, a lo largo del ancho de la antena, con la cara lateral de la extremidad en la parte alta de la misma (material complementario, Figura 1M). En todos los casos fue necesario introducir la "pezuña" a través de una de las aperturas laterales de la antena, por superar la longitud de los pernils la anchura de esta. Los pernils fueron estudiados en el plano axial y sagital, obteniéndose imágenes potenciadas en  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_2^*$  y DP. En primer lugar, se adquirieron imágenes rápidas con orientación coronal, sagital y trasversal para la localización de los experimentos posteriores. Para las imágenes potenciadas en  $T_1$  se emplearon dos secuencias diferentes: Balanced Fast Field Echo 3D (BFFE3D) y Turbo Spin Echo 2D (TSE). En el primer caso el tiempo de repetición (TR) empleado fue de 8,4 ms, el tiempo de eco (TE) de 4,2 ms, el ángulo de excitación (FA) de  $45^\circ$  y el número de experimentos promediados (NA) de 1. En el caso de la secuencia TSE el TR empleado fue de 410 ms, el TE efectivo de 18 ms y NA de 4. Para las imágenes potenciadas en DP y  $T_2$  se empleó una secuencia TSE de doble eco (DTSE) que permite obtener para cada corte imágenes con dos TE diferentes, de modo que la primera imagen obtenida está potenciada en DP y la segunda en el tiempo de relajación transversal  $T_2$ . En este caso se adquirieron imágenes con 10 y 100 ms. Para las imágenes potenciadas en  $T_2^*$  se usó una secuencia Fast Field Echo (FFE) con TR de 850 ms, TE de 40 ms, FA de  $75^\circ$  y NA de 1. El tamaño de la región de la imagen (*field of view*, FOV) fue en todos los casos de  $45 \times 45 \text{ cm}^2$  y la anchura de los cortes de 5 mm. Para la secuencia BFFE3D potenciada en  $T_1$  en dirección sagital se realizó un barrido completo del jamón, adquiriéndose 42 cortes en total. Para el resto de secuencias y orientaciones el número de cortes varió entre 12 y 28. La resolución de las imágenes varió dependiendo de la matriz adquirida, de modo que se obtuvieron imágenes de alta resolución (1 mm) en

tiempos de adquisición aproximados de 6 min e imágenes de baja resolución (2,5 mm) y tiempos de adquisición aproximados de 1 min.

Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el visor de imágenes Radiant DICOM Viewer 2022.1.1 (Medixant, Poznan, Polonia) y el programa de procesamiento digital de imagen ImageJ 1.54 (NIH, Bethesda, Maryland, EEUU). Como se indica en los siguientes apartados, el análisis de IRM se utilizó para estimar el espesor de la grasa subcutánea y la detección de alteraciones o lesiones internas.

#### **Determinación del espesor de la grasa subcutánea (GS)**

El espesor de la GS se determinó con el programa ImageJ a partir de las imágenes de RM axiales potenciadas en DP correspondientes al corte en la longitud media del fémur (considerando esta longitud desde la articulación coxofemoral hasta la articulación de la femorotibial o de la rodilla). Para la medida del espesor de la GS se determinó la distancia entre la superficie de la piel y la superficie muscular en la que se inserta el tejido adiposo, siguiendo una trayectoria lineal perpendicular a las mencionadas superficies. La estimación se realizó en varios puntos sobre los músculos *rectus femoris* (RF), *vastus lateralis* (VL), *biceps femoris* (BF) y *semitendinosus* (ST), considerándose valores individuales y promedios (Figura 1a).

#### **Análisis interno de los pernils. Detección de lesiones en distintos tejidos**

Para la detección de lesiones en el conjunto de la masa del pernil, se analizaron en primer lugar las imágenes FFE potenciadas en  $T_1$  de baja resolución adquiridas con el fin de detectar de forma visual zonas con intensidades anómalas en distintos tejidos. Tras este estudio inicial, se usaron las imágenes de mayor resolución adquiridas con diferentes potenciaciones y orientaciones de los pernils para

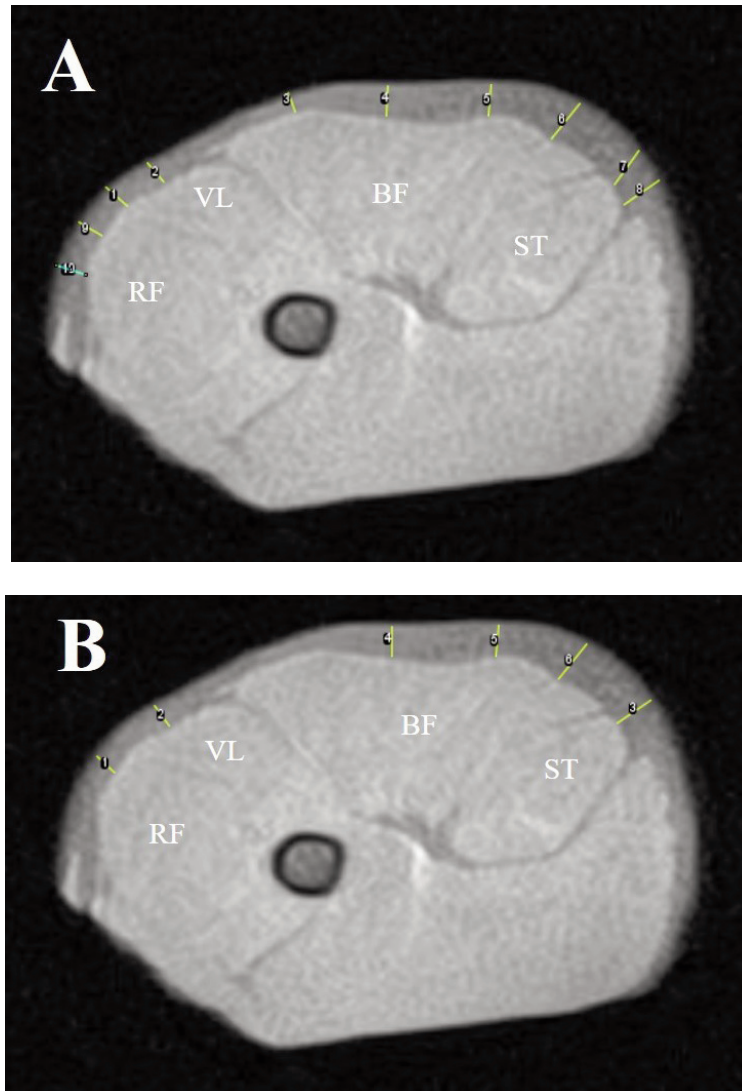


Figura 1. Puntos utilizados para la determinación del espesor de la grasa subcutánea (GS) en distintas zonas del pernil en una imagen de resonancia magnética (RM) en el plano axial potenciada en densidad protónica (DP). (A) Puntos para la estimación del espesor medio de la GS sobre distintos músculos. (B) Puntos considerados para la estimación del espesor de la GS las zonas seleccionadas (SL). RF: *rectus femoris*; VL: *vastus lateralis*; BF: *biceps femoris*; ST: *semitendinosus*.

Figure 1. Points used for the determination of subcutaneous fat (SF) thickness in different areas of the pork leg in an axial proton density (PD) enhanced magnetic resonance (MR) image. (A) Points for the estimation of the mean thickness of SF over different muscles. (B) Points considered for the estimation of the thickness of SF in selected areas (SL). RF: *rectus femoris*; VL: *vastus lateralis*; BF: *biceps femoris*; ST: *semitendinosus*.

obtener mejor visualización de las zonas susceptibles de alteración. Concluido el estudio de IRM, se realizó una disección de las piezas para analizar visualmente los lugares en los que se detectaron lesiones y confirmar su intensidad y características.

### **Análisis estadístico de los resultados**

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el programa Statgraphics 19-X64 para Windows (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, EEUU). Los datos obtenidos se presentaron como medias y desviaciones estándar. Las diferencias entre medias de las variables (pH, contenido graso total obtenido por rayos X, espesor de la GS y peso del pernil) se han establecido mediante ANOVA simple, a través del procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. El análisis de regresión simple se utilizó para relacionar el espesor promedio de GS estimado mediante IRM en distintos puntos y el contenido graso total del pernil. Para un mayor ajuste de esta regresión, se utilizó ANOVA para la selección de los puntos de análisis a considerar para la obtención del valor promedio de GS que se correspondía con

un incremento del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) siguiendo un procedimiento de eliminación gradual. Estas regresiones se evaluaron mediante pruebas estadísticas de Durbin-Watson, al 95 % de nivel de confianza.

### **Resultados y discusión**

#### **Caracterización de los perniles**

En la Tabla 1, se muestran valores medios del contenido graso total de los perniles izquierdos de los animales incluidos en el estudio, determinado mediante un equipo de rayos X. Esta misma determinación se realizó en el pernil derecho. Para comprobar la precisión de esta metodología, en un homogenizado del total de la masa de tejidos de esta pieza se determinó el contenido de grasa por el método oficial de Soxhlet. Los valores obtenidos por ambas metodologías en el pernil derecho no difirieron significativamente ( $p > 0,05$ ), por tanto, se consideró el contenido graso total del pernil izquierdo determinado en el equipo de rayos X como representativo de la presencia de este componente en el conjunto de la pieza cárnica.

Tabla 1. Características de los perniles frescos.  
*Table 1. Characteristics of fresh pork legs.*

Categoría asignada	Intervalo de grasa total (%)	Contenido graso total (%)	pH	Peso (Kg)
A	<10	7,75 ± 1,06	5,76 ± 0,07	12,28 ± 0,50
B	>10-16	12,70 ± 1,01	5,82 ± 0,07	12,64 ± 0,52
C	>16-20	17,85 ± 0,35	5,81 ± 0,05	12,73 ± 0,47
D	>20	23,00 ± 1,01	5,72 ± 0,10	12,65 ± 0,50

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre valores medios.

Teniendo en cuenta el contenido graso global, los perniles se calificaron en cuatro categorías: <10 % (A, jamones magros), >10-16 % (B), >16-20 % (C) y >20 % (D, jamones grasos). En el estudio se incluyeron seis piezas de cada categoría. El grado de engrasamiento de los perniles juega un papel relevante en la calidad sensorial del producto curado, según se ha comprobado en múltiples investigaciones (Segura et al., 2015). Por todo ello, la industria cárnica realiza una clasificación de los perniles frescos (Bañón et al., 1996), considerando el contenido graso y estableciendo habitualmente tres niveles (magros, semigrasos y grasos) (Ventanas, 2012).

Los perniles analizados presentaron valores de pH entre 5,6 y 6,0 sin que se detectaran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) asociadas a la categoría asignada a las piezas. Estos valores se encuentran en el rango de los detectados en otros estudios para este tipo de matrices cárnicas (García-García et al., 2019), y se consideran adecuados para la elaboración del producto curado (Dall'Olio et al., 2020).

El peso de las piezas analizadas fue muy similar en todas las categorías de perniles, en-

contrándose en torno a los 12-13 kg (Tabla 1). El tamaño de las piezas estudiadas se ajusta al habitualmente utilizado para la producción de jamón curado de cerdo blanco (Dall'Olio et al., 2020), y estaría en conformidad a los requerimientos para la elaboración de productos específicos, como E.T.G Jamón Serrano, con un mínimo de peso fresco con pata (mínimo en sangre) de 9,5 kg (European Commission, 1999).

#### **Determinación del espesor de la grasa subcutánea (GS) mediante IRM**

La imagen de RM ofrece una información global de las distintas estructuras que constituyen el pernil. Una de las aplicaciones que se ha analizado en este estudio es la validez de esta imagen para estimar el espesor de la GS. Para ello, sobre un corte axial a la altura media del fémur, se determinó la distancia entre la piel y la superficie muscular adyacente (Figura 1a). Este espesor se determinó sobre distintos músculos del pernil (RF y VL analizados de forma conjunta, BF y ST), como se muestra en la Figura 1a y Tabla 2.

Tabla 2. Espesor de la grasa subcutánea (GS, mm) en distintas áreas de perniles frescos.  
Table 2. Subcutaneous fat thickness (GS, mm) in different areas of fresh pork legs.

Categoría*	VL/VR	BF	ST	SL
A	4,06 ± 1,10 <sup>b</sup>	4,96 ± 1,37 <sup>b</sup>	6,26 ± 1,61 <sup>b</sup>	5,18 ± 0,11 <sup>d</sup>
B	8,79 ± 3,58 <sup>a</sup>	8,15 ± 2,30 <sup>a</sup>	11,65 ± 2,74 <sup>a</sup>	11,70 ± 0,03 <sup>c</sup>
C	8,07 ± 1,16 <sup>a</sup>	8,71 ± 2,61 <sup>a</sup>	11,68 ± 1,31 <sup>a</sup>	14,05 ± 0,13 <sup>b</sup>
D	10,01 ± 2,56 <sup>a</sup>	8,11 ± 2,25 <sup>a</sup>	10,89 ± 1,99 <sup>a</sup>	15,44 ± 1,16 <sup>a</sup>

\*Categoría del pernil en función del contenido graso, tal y como se detalla en la Tabla 1. RF: *rectus femoris*; VL: *vastus lateralis*; BF: *biceps femoris*; ST: *semitendinosus*. <sup>a, b, c, d</sup>: Valores con distinta letra en la misma columna presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La categoría A presentó el espesor más bajo ( $p < 0,05$ ) en las zonas de medida correspondientes a los distintos músculos analizados (Tabla 2). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) cuando se comparó el espesor de la GS sobre cada músculo en los perniles con un contenido de grasa total superior al 10 % (categoría B, C y D). El espesor de la grasa dorsal es un referente para la calificación de los perniles, y de hecho, es un parámetro requerido para asegurar la calidad de determinados productos curados. Tal es el caso de la Especialidad Tradicional Garantizada (E.T.G.) del Jamón Serrano, en la que se requiere un espesor mínimo de 8 mm medido en el punto de convergencia del músculo VL y la punta superior del hueso isquion (European Commission, 1999). La importancia de la GS se debe fundamentalmente a que evita una deshidratación excesiva de la masa muscular, y la retracción desmesurada de la pieza (Peloso et al., 2010).

Durante el desarrollo de este estudio, se ha podido comprobar que la IRM es una técnica que permite, de forma sencilla y rápida, determinar el espesor de la GS en cualquier punto del pernil. Sin embargo, el valor medio del espesor obtenido a la altura de distintos músculos de forma individual, no ha permitido la diferenciación entre perniles con un contenido graso total  $>10$  %. Esto se debe a que la distribución de la grasa subcutánea sobre las superficies consideradas es muy heterogénea. Por tanto, se procedió a seleccionar distintos puntos de fijación de las medidas, donde la GS muestra un mayor espesor y homogeneidad. Con este criterio, se han fijado seis puntos de medida: uno a nivel del músculo ST, tres en la zona media del BF, uno sobre el músculo VL y otro en la zona del RF (Figura 1b). Este espesor promedio fue un parámetro de diferenciación ( $p < 0,05$ ) de los perniles agrupados en las distintas categorías asignadas conforme a su contenido graso total (Tabla 2), con valores mínimos en la categoría A y máximos para la D. Por otra parte, se ha obte-

nido una correlación lineal ( $R^2 = 0,85$ ;  $p < 0,05$ ) entre el contenido de grasa total de los perniles (Tabla 1) y los valores promedios del espesor de la GS en las zonas SL (Figura 2).

Estos resultados indican que el espesor promedio de la GS estimado en las zonas SL en imágenes de RM potenciadas en DP podría utilizarse para la categorización de perniles frescos destinados a la elaboración de jamones curados, de forma similar a las medidas establecidas para distintos productos. En esta línea, y como se ha mencionado, en el pliego de la E.T.G. del Jamón Serrano se establece un espesor mínimo de la GS medido en la punta del pernil recortado (European Commission, 1999). En esta misma zona del pernil, la Indicación Geográfica Protegida (I.G.P.) Jamón de Trevélez establece, en virtud del espesor de la GS, distintos tiempos de curado (BOJA, 2015). Una práctica habitual de la industria cárnica de elaboración de jamón curado es establecer distintos niveles de espesor de la GS (por ejemplo, a nivel del músculo *gluteus medius* antes de perfilar) para estimar tiempos de curado. Un ejemplo de esta naturaleza es la clasificación de los perniles en piezas magras ( $<10$  mm), semigrasas (de 10 a 20 mm) y grasas ( $>20$  mm) para jamones curados que respectivamente llevan a tiempos de curado de 9, 12 y más de 15 meses (Ventanas, 2012).

Los resultados obtenidos en el presente estudio mediante la imagen de RM permiten asociar categorías de perniles con distintos niveles de grasa total con espesores de GS medidos en las zonas SL, sin alteración de la muestra (Tabla 2).

### **DetECCIÓN DE LESIONES INTERNAS**

En el análisis de las imágenes de RM con distinta potenciación, se detectaron distintas áreas con intensidad de señal anómala o diferenciada del entorno, que se asociaron a distintos tipos de lesiones. En la Figura 3 se

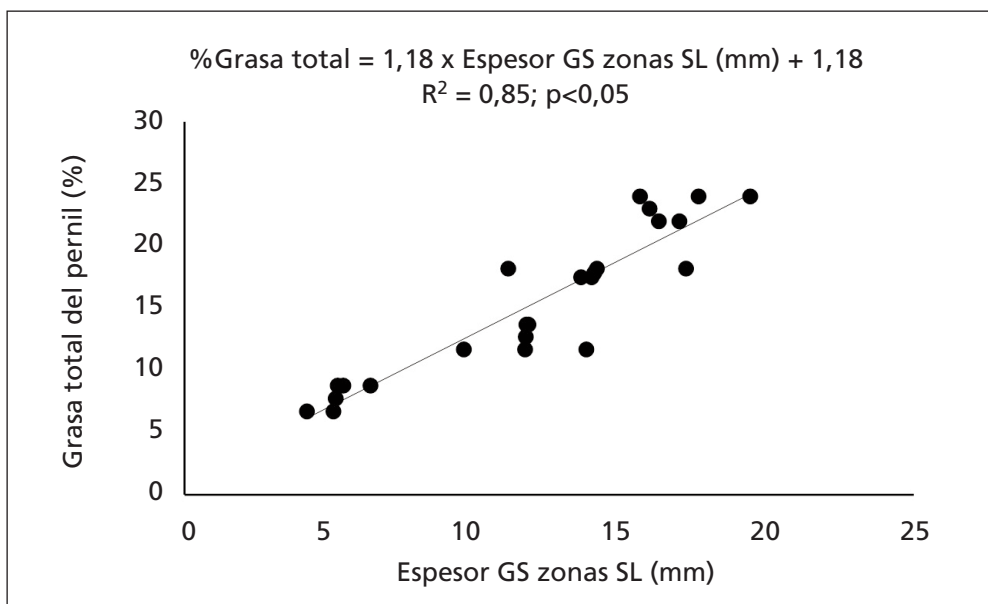


Figura 2. Modelo de regresión lineal entre el espesor promedio (mm) de la grasa subcutánea (GS) obtenido en las zonas seleccionadas (SL) y el contenido graso total del pernil (%). SL: Obtenido tal y como se indica en la Figura 1b.

Figure 2. Linear regression model between the average thickness (mm) of subcutaneous fat (GS) obtained in the selected zones (SL) and the total fat content of the pork leg (%). SL: Obtained as shown in Figure 1b.

muestran imágenes de las principales lesiones halladas. Entre las alteraciones más frecuentes cabe destacar:

- Acúmulos de sangre hallados en las piezas en distintas localizaciones, caracterizados como zonas hiperintensas en imágenes potenciadas en DP, T<sub>2</sub> y T<sub>2</sub>\*<sub>r</sub>, y como zonas hipointensas en imágenes potenciadas en T<sub>1</sub>. Estas anomalías se observaron tanto en imágenes en el plano axial como en el sagital, y se detectaron tanto en masas musculares como en el interior de cavidades articulares (especialmente en la coxofemoral). La naturaleza de estas lesiones fue confirmada tras la disección de los perniles (Figura 3). La aparición de estas alteraciones en perniles frescos es consecuente a traumatismos que derivan en la rotura de va-

sos sanguíneos y las consiguientes hemorragias de mayor o menor intensidad. Arduini et al. (2014) asociaron la presencia de defectos relacionados con el sistema vascular al transporte del animal, sobre todo cuando se trata de recorridos de larga distancia. Como causas *postmortem*, cabe indicar, que en las peladoras continuas se pueden producir golpes que afectan a las extremidades posteriores. Por otra parte, el colgado de las canales puede dar lugar a giros sobre la extremidad de la que pende, afectando a la articulación coxofemoral. Además, la producción de pequeñas hemorragias se han descrito tras el aturdimiento eléctrico debido a las fuertes convulsiones (Marcon et al., 2019; Arnau, 2021). En general, la presencia de sangre pueden des-

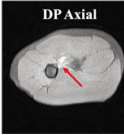
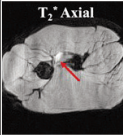
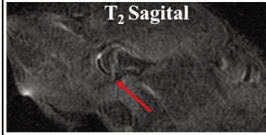
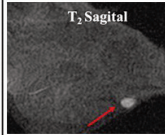

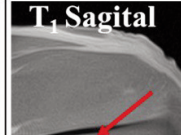

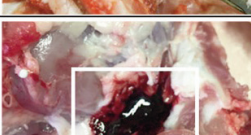



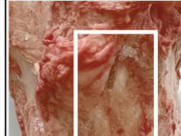
TIPO DE LESIÓN DETECTADA	Acúmulos de sangre	Luxación completa con rotura de la cápsula y ligamentos de la articulación coxofemoral	Hipertrofia del ganglio poplíteo	Desgarros musculares	Fisura ósea (sin desplazamiento)
IMÁGENES DE RM	 				
IMÁGENES OBSERVADAS TRAS DISECCIÓN	 				
POSIBLES DEFECTOS EN JAMÓN CURADO	Manchas verdes, ocre o marrones/Proliferación de microorganismos	Textura pastosa/Sabor y aroma anómalo/Aparición de coquera	Sabor y aspecto desagradable/Textura chiclosa	Textura deficiente/Riesgos de alteración microbiológica	Puede pasar desapercibida en el producto curado, sin ser causa de alteración

Figura 3. Lesiones observadas con más frecuencia en pernils frescos.  
 Figure 3. Most frequently observed lesions on fresh pork legs.

embocar en la aparición de manchas verdes, ocre o marrones, como resultado de su oxidación durante el proceso de curado (Arnau, 2021). Tal y como indican Moro *et al.* (2011), estas manchas de las tonalidades indicadas se asocian a la presencia de hemoglobina, y aparecen con una mayor incidencia en el músculo ST. Las zonas con acúmulo de sangre son especialmente susceptibles de presentar un deterioro bacteriano (Čandek-Potokar y Škrlep, 2012).

- Luxaciones de las articulaciones coxofemoral y femorotibial, observadas tanto en el plano axial como en el plano sagital. Estas lesiones se presentaron con distinta in-

tensidad, siendo más frecuentes en la articulación coxofemoral, incluyendo roturas de la cápsula y ligamentos articulares, así como desplazamiento de la cabeza del fémur por rotura del ligamento teres (Figura 3). En las articulaciones afectadas, se observaron zonas hipointensas en las imágenes potenciadas en  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_2^*$ , asociadas a la entrada de aire.

- Conforme se ha descrito previamente (Arnau, 2021), la entrada de aire por diversas causas en el interior de las cavidades articulares puede ser uno de los factores que favorece la aparición de mohos a lo largo del proceso de curado, el desarrollo de tex-



turas pastosas y de sabores y aromas anómalos. Además, el acceso abierto a la cavidad articular puede favorecer la aparición de coqueras, es decir, la proliferación de microorganismos en oquedades generando olores desagradables, tanto en el área afectada como en las superficies adyacentes (Sánchez-Molinero y Arnau, 2010). Estas zonas son también más propicias para la presencia de ácaros.

- Fisuras y fracturas óseas, detectadas en el plano sagital, como zonas hipointensas en imágenes potenciadas en  $T_1$ . Se trata de hallazgos menos frecuentes que se han observado en el cuerpo del fémur (Figura 3). En el caso de las fracturas sin desplazamiento, y siempre que no se produzca entrada de aire, podrían no tener consecuencias manifiestas en la calidad del producto curado. Cuando la fractura indica desprendimiento de fragmentos (lesión no detectada), las esquirlas óseas podrían encontrarse en los cortes de jamón curado e incluso llegar al consumidor. Si las fracturas conllevan la entrada de aire, las alteraciones en el producto curado serían similares a las descritas en las luxaciones articulares.
- Las causas de las lesiones a nivel óseo y articular se deberían a traumatismos más o menos intensos en el manejo *perimortem* del animal o de la canal, de forma similar a lo indicado en los acúmulos de sangre (Marcato, 1990).
- Desgarros musculares, visualizados en el plano sagital como zonas hipointensas en imágenes potenciadas en  $T_1$  (Figura 3). Estas lesiones implican el desplazamiento o la rotura de fibras y/o de las fascias musculares (epimisis). Las causas más habituales están relacionadas con la descarga de los animales de los camiones de transporte o por peleas durante el estabulado (Vitali et al., 2021). De la misma forma que ocurre con los problemas a nivel articular, durante el proceso de elaboración del jamón

curado, la existencia de desgarros potenciaría el riesgo de proliferación de microorganismos, incluso la aparición de coqueras (Arnau, 2021), así como la aparición de texturas deficientes, generalmente seca por la penetración de aire.

- Hipertrofia de ganglios poplíteos superficiales, observados en el plano sagital como zonas hipointensas en las imágenes de RM potenciadas en  $T_1$ , y como zonas hiperintensas en las imágenes potenciadas en  $T_2$  (Figura 3). El aumento de tamaño de estos ganglios poplíteos no tiene ninguna repercusión a nivel microbiológico, sin embargo, se relacionan con sabores desagradables, texturas chiclosas y otros problemas a nivel sensorial (Arnau, 2021).

En un análisis global, cabe indicar que la mayor parte de los hallazgos se correspondieron con lesiones menores (acúmulos de sangre de pequeña intensidad y desgarros musculares), que podrían pasar desapercibidas por otras metodologías no destructivas. En este estudio, estas lesiones se detectaron con una incidencia de entre 30-37 %. Entre las lesiones de mayor calado, la articulación más afectada fue la coxofemoral, con una incidencia de luxación o rotura articular de en torno al 10 %.

## Conclusiones

De la realización de este trabajo se concluye que la IRM es una técnica no destructiva que puede utilizarse para la selección de perniles frescos destinados a la elaboración de jamón curado. Su aplicación al estudio del espesor de la GS permite obtener valores precisos de este parámetro, aportando la posibilidad de clasificar y seleccionar perniles frescos con distinto contenido graso en función de su espesor. La IRM es una herramienta que permite también la detección y el análisis de lesiones internas en distintos planos anatómicos. En conjunto, esta metodología tiene un elevado

potencial de aplicación en la industria cárnica, con el objetivo de obtener un producto curado de mayor calidad y reducir al máximo las pérdidas a nivel económico por la aparición de alteraciones. Todo esto, unido a la innovación en el diseño de equipos de bajo campo mucho más eficientes y económicos, el desarrollo de nuevas secuencias y la aplicación de la Inteligencia Artificial al análisis de imagen facilitan su implantación en líneas de producción. No obstante, es necesario crear bases de datos sólidas para llegar a la detección automática de lesiones y defectos. Este estudio es un análisis preliminar en esta línea y se requiere, por tanto, incrementar las investigaciones para alcanzar este objetivo.

### Agradecimientos

Gracias al Proyecto financiador PID2019-107542RB-C22: Metodologías de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) como herramientas de automatización y control en el sector cárnico. A BiolmaC (Bioimagen Complutense), uno de los nodos de la ICTS ReDiB. A Luis Calvo Adiego, Montserrat García García y Raquel Reina Toribio (Cárnicas Loriente Piqueras, S. A., Tarancón).

### Material complementario

El material complementario de este artículo se puede consultar en la URL <https://doi.org/10.12706/itea.2023.018>

### Referencias bibliográficas

ANICE (2022). Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España. Disponible en: [https://www.anice.es/industrias/el-sector/el-sector-carnico-espanol\\_171\\_1\\_ap.html](https://www.anice.es/industrias/el-sector/el-sector-carnico-espanol_171_1_ap.html) (Consultado: 10/04/2023)

AOAC (2006). Official methods of analysis 18th ed. AOAC International, Washington D. C., EEUU.

Antequera T., Caballero D., Grassi S., Uttaro B., Perez-Palacios T. (2021). Evaluation of fresh meat quality by Hyperspectral Imaging (HSI), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Magnetic Resonance Imaging (MRI): A review. *Meat Science* 172: 108340. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108340>

Arduini A., Redaelli V., Luzi F., Dall'Olio S.D., Pace V., Costa L.N. (2014). Effect of transport distance and season on some defects of fresh hams destined for DPO production. *Animals* 4: 524-534. <https://doi.org/10.3390/ani4030524>

Arnau J. (2021). Problemas sensoriales del jamón curado. *Eurocarne: La Revista Internacional Del Sector Cárnico* 297: 39-54.

Bañón, S., Garrido, M.D., Pedauyé, J., Seguí, J. (1996). Clasificación de perniles frescos para la elaboración de jamón Serrano. *Eurocarne* 45: 39-44. Barreiro P., Zheng C., Sun D.W., Hernández-Sánchez N., Pérez-Sánchez J.M., Ruiz-Cabello J. (2008). Non-destructive seed detection in mandarins: Comparison of automatic threshold methods in FLASH and COMSPIRA MRIs. *Postharvest Biology and Technology* 47(2): 189-198. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.07.008>

BOJA (2015). Orden de 9 de marzo de 2015, por la que se publica el pliego de condiciones de la Indicación Geográfica Protegida «Jamón de Trévez». *Boletín Oficial de la Junta de Andalucía*, núm. 51, de 16 de marzo de 2015, pp. 319-322.

Bonfatti V., Carnier P. (2020). Prediction of dry-cured ham weight loss and prospects of use in a pig breeding program. *Animal* 14(6): 1128-1138. <https://doi.org/10.1017/S1751731120000026>

Bosse R., Müller A., Gibis M., Weiss A., Schmidt H., Weiss J. (2018). Recent advances in cured raw ham manufacture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58(4): 610-630. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1208634>

Caballero D., Pérez-Palacios T., Caro A., Antequera T. (2021). Use of magnetic resonance imaging to analyse meat and meat products non-destructively. *Food Reviews International* 39(1): 424-440. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1912085>

- Čandek-Potokar M., Škrlep M. (2012). Factors in pig production that impact the quality of dry-cured ham: A review. *Animal* 6(2): 327-338. <https://doi.org/10.1017/S1751731111001625>
- Contreras M., Benedito J., Garcia-Perez J.V. (2021). Ultrasonic characterization of salt, moisture and texture modifications in dry-cured ham during post-salting. *Meat Science* 172: 108356. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108356>
- Dall'Olio S., Aboagye G., Nanni-Costa L., Gallo M., Fontanesi L. (2020). Effects of 17 performance, carcass and raw ham quality parameters on ham weight loss at first salting in heavy pigs, a meat quality indicator for the production of high quality dry-cured hams. *Meat Science* 162: 108012. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108012>
- Damez J.L., Clerjon S. (2008). Meat quality assessment using biophysical methods related to meat structure. *Meat Science* 80(1): 132-149. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.039>
- de Prados M., Fulladosa E., Gou P., Muñoz I., García-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. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.01.015>
- European Commission (1999). Commission Regulation (EC) N° 2419/ 1999 of 12 November 1999 supplementing the Annex to Regulation (EC) N° 2301/97 on the entry of certain names in the Register of certificates of specific character provided for in Council Regulation (EEC) N° 2082/92 on certificates of specific character for agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, num. 291 de 13 de noviembre. pp. 25-26.
- García-García A.B., Fernández-Valle M.E., Castejón D., Escudero R., Cambero M.I. (2019). Use of MRI as a predictive tool for physicochemical and rheological features during cured ham manufacturing. *Meat Science* 148: 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.10.015>
- Gou P., Santos-Garcés E., Høy M., Wold J.P., Liland K.H., Fulladosa E. (2013). Feasibility of NIR inter-actance hyperspectral imaging for on-line measurement of crude composition in vacuum packed dry-cured ham slices. *Meat Science* 95(2): 250-255. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.013>
- Hernández-Sánchez N., Barreiro P., Ruiz-Altisent M., Ruiz-Cabello J., Fernández-Valle M.E. (2005). Detection of seeds in citrus using MRI under motion conditions and improvement with motion correction. *Concepts in Magnetic Resonance Part B (Magnetic Resonance Engineering)* 26(1): 81-92. <https://doi.org/10.1002/cmr.b.20041>
- Hernández-Sánchez N., Hills B.P., Barreiro P., Marigheto N. (2007). An NMR study on internal browning in pears. *Postharvest Biology and Technology* 44(3): 260-270. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.01.002>
- Kademi H.I., Ulusoy B.H., Hecer C. (2019). Applications of miniaturized and portable near infrared spectroscopy (NIRS) for inspection and control of meat and meat products. *Food Reviews International* 35(3): 201-220. <https://doi.org/10.1080/87559129.2018.1514624>
- Kotwaliwale N., Curtis E., Othman S., Naganathan G.K., Subbiah J. (2012). Magnetic resonance imaging and relaxometry to visualize internal freeze damage to pickling cucumber. *Postharvest Biology and Technology* 68: 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.12.022>
- Lebret B., Čandek-Potokar M. (2022). Review: Pork quality attributes from farm to fork. Part II. Processed pork products. *Animal* 16: 100383. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100383>
- Leighton P.L.A., Segura J., Lam S., Marcoux M., Wei X., López-Campos O., Soladoye P., Dugan M.E.R., Juarez M., Prieto N. (2022). Prediction of Carcass Composition and Meat and Fat Quality Using Sensing Technologies: A Review. *Meat and Muscle Biology* 5(3): 12951. <https://doi.org/10.22175/mmb.12951>
- Manzocco L., Anese M., Marzona S., Innocente N., Lagazio C., Nicoli M.C. (2013). Monitoring dry-curing of S. Daniele ham by magnetic resonance imaging. *Food Chemistry* 141(3): 2246-2252. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.068>

- MAPA (2022). Informe anual de la Industria Alimentaria Española. Periodo 2021-2022. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Gobierno de España, 13 pp..
- Marcato P.S. (1990). Anatomía e Histología Patológica Especial de los mamíferos domésticos. Editorial Interamericana. Madrid, España.
- Marcon A.V., Caldara F.R., de Oliveira G.F., Gonçalves L.M.P., Garcia R.G., Paz I.C.L.A., Crone C., Marcon A. (2019). Pork quality after electrical or carbon dioxide stunning at slaughter. *Meat Science* 156: 93-97. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.04.022>
- Melado-Herreros A., Fernandez-Valle M.E., Hernandez-Sanchez N., Jimenez-Ariza T., Verlinden B., Val J., Barreiro P. (2013). On-line MRI sequences for the evaluation of Apple internal quality. Inside Food Symposium, 9-12 abril, Leuven, Belgium.
- Mitchell A.D., Scholz A.M., Wange P.C., Song H. (2001). Body composition analysis of the pig by magnetic resonance imaging. *Journal of Animal Science* 79: 1800-1813. <https://doi.org/10.2527/2001.7971800x>
- Moro S., Restelli G.L., Arrighi S., Moretti V., Bontempo V., Rizzi R., Stella A., Pagnacco G. (2011). Genetic and environmental effects on a meat spotting defect in seasoned dry-cured ham. *Italian Journal of Animal Science* 10(1): e7 <https://doi.org/10.4081/ijas.2011.e7>
- Peloso J.V., Lopes P.S., Gomide L.A.M., Guimarães S.E.F., Carneiro P.L.S. (2010). Carcass and ham quality characteristics of heavy pigs from different genetic groups intended for the production of dry-cured hams. *Meat Science* 86(2): 371-376. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.017>
- Pérez-Palacios T., Caballero D., Caro A., Rodríguez P.G., Antequera T. (2014). Applying data mining and Computer Vision Techniques to MRI to estimate quality traits in Iberian hams. *Journal of Food Engineering* 131: 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.01.015>
- Pérez-Santaescolástica C., Fraeye I., Barba F.J., Gómez B., Tomasevic I., Romero A., Moreno A., Toldrá F., Lorenzo J.M. (2019). Application of non-invasive technologies in dry-cured ham: An overview. *Trends in Food Science and Technology*, 86: 360-374. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.011>
- Sánchez-Molinero F., Arnau J. (2010). Processing of dry-cured ham in a reduced-oxygen atmosphere: Effects on sensory traits. *Meat science* 85(3): 420-427. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.02.010>
- Segura J., Escudero R., Romero de Ávila M.D., Cambero M.I., López-Bote C.J. (2015). Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat. *Meat Science* 103: 90-95. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.01.008>
- Uecker M., Zhang S., Voit D., Karaus A., Merboldt K.D., Frahm J. (2010). Real time MRI at a resolution of 20 ms. *NMR in Biomedicine* 23(8): 986-994. <https://doi.org/10.1002/nbm.1585>
- Ventanas J. (2012). Jamón Ibérico y Serrano. Fundamentos de la elaboración y de la calidad. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 197 pp.
- Vitali M., Bosi P., Santacroce E., Trevisi P. (2021). The multivariate approach identifies relationships between pre-slaughter factors, body lesions, ham defects and carcass traits in pigs. *PLoS ONE* 16(5): e0251855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251855>

(Aceptado para publicación el 16 de octubre de 2023)

# Empleo de Tours Virtuales 360° de realidad aumentada para la mejora del aprendizaje de habilidades en actividades experimentales de evaluación sensorial de alimentos

Giuseppe Fregapane\* y M. Desamparados Salvador

Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas, Campus de Ciudad Real, Universidad de Castilla-La Mancha

## Resumen

La innovación docente en el ámbito universitario busca mejorar el aprendizaje de los estudiantes y el desarrollo de sus habilidades a través de enfoques pedagógicos más activos, el uso de tecnología educativa y la conexión con situaciones prácticas del mundo profesional real preparándolos para enfrentarse a los desafíos y demandas de la sociedad actual y futura. En este artículo se describe el diseño, producción y empleo de tours virtuales de 360° de laboratorios para su implantación en las asignaturas de los grados de la Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas, con el objetivo de familiarizar a los alumnos con el entorno de los laboratorios y su equipamiento, y mejorar la adquisición de las habilidades requeridas. Se comentan también las ventajas de utilizar la tecnología multimedia 360° frente a la clásica en 2D y se presentan visitas virtuales dirigidas a distintos tipos de laboratorios e instalaciones: laboratorio de análisis fisicoquímico, microbiológico, sensorial o sala de cata y planta piloto. La visita virtual a un laboratorio se puso a disposición de los estudiantes previamente a la realización de las prácticas de forma presencial, siendo esta actividad bien recibida por los alumnos que han valorado muy positivamente (4,2 sobre 5,0 puntos) la comprensión de las actividades a realizar por medio de los tours virtuales 360° frente a la lectura del clásico guion escrito e indicando que le gustaría disponer de esta herramienta también en otras asignaturas (4,3/5,0). La calidad global de la experiencia se puntúa con más de 4 puntos sobre 5.

**Palabras clave:** Técnicas inmersivas, videos 360° interactivos, realidad virtual, análisis sensorial.

## Use of 360° Virtual Tours of augmented reality to improve the learning of experimental skills in sensory evaluation of food

### Abstract

Teaching innovation in the university environment seeks to improve student learning and the development of their skills through more active pedagogical approaches, the use of educational technology and the connection with practical situations of the real professional world, preparing them to face the challenges and demands of current and future society. This article describes the design, production and use of 360° virtual tours of laboratories for their implementation in the subjects of the degrees of the Faculty of Chemical Sciences and Technologies, with the aim of familiarizing students with the environment of laboratories and their equipment and improve the acquisition of required skills. The ad-

---

\* Autor para correspondencia: giuseppe.fregapane@uclm.es

Cita del artículo: Fregapane G., Salvador M.D. (2024). Empleo de Tours Virtuales 360° de realidad aumentada para la mejora del aprendizaje de habilidades en actividades experimentales de evaluación sensorial de alimentos. ITEA-Información Técnica Económica Agraria 120(3): 239-250. <https://doi.org/10.12706/itea.2023.023>



vantages of using 360° multimedia technology compared to the classic 2D are also discussed, and virtual tours aimed at different types of laboratories and facilities are presented: physicochemical, microbiological, sensory laboratory or testing room and pilot plant. The virtual visit to a laboratory was made available to the students prior to carrying out the practices in person, this activity being well received by the students who have valued very positively (4.2 out of 5.0 points) the understanding of the activities to be carried out through the 360° virtual tours compared to reading the classic written script, and indicating that they would like to have this tool available also in other subjects (4.3/5.0). The overall quality of the experience is scored with more than 4 points out of 5.

**Keywords:** Immersive techniques, interactive 360° videos, virtual reality, sensory analysis.

## Introducción

La innovación docente en el ámbito universitario se dirige a la implementación de nuevas metodologías, herramientas y enfoques pedagógicos con el objetivo de mejorar el aprendizaje y desarrollar las habilidades de los estudiantes durante las actividades prácticas. La idea fundamental detrás de la innovación docente es promover un enfoque más activo, participativo y sobre todo centrado en el trabajo autónomo del alumno, alejándose de las tradicionales clases magistrales y fomentando un aprendizaje más dinámico. Además, la innovación docente implica la incorporación de estrategias pedagógicas como el aprendizaje basado en problemas (APB o PBL), por proyectos o bien colaborativo. Estas metodologías activas fomentan la participación de los estudiantes en la resolución de problemas reales, promoviendo de esta forma también su pensamiento crítico, su creatividad y toma de decisiones.

En la actualidad, la tecnología juega un papel fundamental en la innovación docente. Los docentes pueden utilizar herramientas digitales, recursos multimedia y plataformas en línea (on-line) para complementar las actividades prácticas en los laboratorios. Estas tecnologías permiten además una mayor interacción, colaboración y retroalimentación entre profesores y alumnos, así como el acceso a una amplia variedad de recursos y fuentes de información.

Las actividades prácticas llevadas a cabo en los laboratorios y en planta piloto son una parte esencial de la educación en las ciencias y tecnologías químicas y de los alimentos. Sin embargo, son costosas y requieren mucho tiempo y recursos; también exigen la presencia física del profesor y de los estudiantes, así como disponer de instalaciones bien equipadas. Sin olvidar que en algunos casos esto puede ser difícil de llevar a cabo, como, por ejemplo, durante un confinamiento causado por una pandemia, como ocurrió con la de la COVID-19 (Schweiker y Levonis, 2020).

La investigación sobre laboratorios virtuales no es un tema nuevo. De hecho, se han publicado varias revisiones que comparan laboratorios virtuales y remotos con laboratorios prácticos tradicionales en diferentes disciplinas (por ejemplo, biología, física, ingeniería) (Chan *et al.*, 2021); algunas de las cuales se centran de forma específica en los laboratorios virtuales de química (Bellou *et al.*, 2018; Ali y Ullah, 2020; Chan *et al.*, 2021).

Las tecnologías utilizadas en los laboratorios químicos virtuales abarcan desde simples gráficos 2D hasta representaciones más sofisticadas, pero también más complejas y costosas en 3D, acercándose al entorno de un laboratorio real, pasando por una situación tecnológica intermedia como son los videos y tours virtuales 360° (TV360, de ahora en adelante), objeto de este artículo. El empleo de TV360 en la docencia universitaria es una excelente

forma de incorporar la tecnología y brindar experiencias inmersivas a los alumnos. Estas herramientas permiten a los docentes crear espacios virtuales interactivos que simulan visitas reales a lugares específicos como laboratorios, empresas, museos, o sitios históricos.

Entre las principales razones para elegir el formato de videos 360° frente al clásico en 2D, merece la pena mencionar que: (i) se facilita y simplifica el encuadre de la imagen, ya que al grabar de forma esférica en todas direcciones no es necesario enfocar el objetivo hacia donde se produce la acción a capturar; posteriormente, durante el proceso de edición, es posible reencuadrar el punto de origen de la grabación, si es necesario; (ii) la libertad de movimiento por la esfera espacial por parte del espectador; (iii) la capacidad de explorar, descubrir e interactuar con información adicional de realidad aumentada (gamificación); (iv) poder disfrutar de una experiencia totalmente inmersiva utilizando gafas de realidad virtual (VR).

El uso de visitas a un laboratorio virtual de 360° en las disciplinas de las ciencias experimentales se está convirtiendo en un recurso muy accesible, ya que mejora la experiencia del estudiante al reducir su incertidumbre sobre el entorno real del laboratorio (Clemons *et al.*, 2019; Levonis *et al.*, 2021). La producción de estos recursos, como recorridos y videos de familiarización o dirigidos al desarrollo de procedimientos y habilidades, es muy accesible en términos de tiempo del personal y costes de producción (Sypsas y Kalles, 2018). Por otro lado, se ha establecido que el uso de actividades previas al laboratorio (prelaboratorio) ayudan a maximizar las oportunidades de aprendizaje (Reid y Shah, 2007; Agustian y

Seery, 2017) mediante la incorporación de cuestionarios en línea, tutoriales animados, videos y experiencias virtuales (Fung, 2015; Stieff *et al.*, 2018; Ferrell *et al.*, 2019).

En la Tabla 1 se presentan las principales ventajas del empleo de TV360 aplicados a la enseñanza de las actividades prácticas en laboratorio y en trabajos de campo a nivel universitario.

El objetivo principal del proyecto de innovación docente que se describe en este artículo es la mejora del aprendizaje y el desarrollo de habilidades en las actividades prácticas de los alumnos de los grados de la Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas de la Universidad de Castilla-La Mancha, y en particular de la titulación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CTA), siendo estas imprescindibles para la adquisición de las competencias profesionales de los futuros egresados que tienen que adquirir adecuadamente para su incorporación al mercado laboral.

En el marco de este objetivo general se han planteado dos objetivos más específicos:

- Permitir la familiarización y el entrenamiento previo del alumnado antes de entrar físicamente en el laboratorio o planta piloto para la realización de actividades prácticas, las cuales requieren habilidades específicas para el uso de utensilios y aparatos.
- Complementar la herramienta docente denominada 'prelaboratorio', que se está desarrollando actualmente en la Facultad de Ciencia y Tecnología Químicas, y que permite mejorar el aprendizaje de las tareas de laboratorio y el manejo de equipos e instrumentación.

Tabla 1. Principales ventajas en la docencia universitaria del empleo de tours virtuales y videos 360.  
 Table 1. Main advantages of the use of videos and virtual tours 360 in university teaching.

Acceso a lugares remotos	Con estas tecnologías, los estudiantes pueden explorar lugares que de otra manera serían inaccesibles o costosos de visitar. Por ejemplo, pueden realizarse visitas virtuales a laboratorios especializados o bien a instalaciones industriales.
Experiencias inmersivas	Los tours y videos en 360 grados permiten a los estudiantes sumergirse completamente en el entorno virtual, lo que mejora su experiencia de aprendizaje y facilita una comprensión más profunda de los conceptos o lugares.
Aprendizaje interactivo	Estas herramientas fomentan la participación de los estudiantes. Pueden explorar entornos virtuales a su propio ritmo, detenerse en los puntos de interés, hacer zoom o girar la vista en todas las direcciones. Esto les permite tener un mayor control sobre su proceso de aprendizaje.
Flexibilidad temporal y espacial	Los tours virtuales y videos 360 pueden utilizarse en cualquier momento y lugar, lo que brinda flexibilidad a los estudiantes para acceder a los recursos educativos. Pueden visualizarse desde dispositivos personales o en el aula, adaptándose a diferentes horarios y necesidades.
Estimulación sensorial	Estas herramientas aprovechan la realidad virtual para estimular los sentidos de los estudiantes, lo cual puede potenciar su capacidad de retención y comprensión de los conocimientos. Al poder explorar el entorno virtual de manera inmersiva, se genera un mayor impacto emocional y cognitivo.
Adaptabilidad a diferentes disciplinas	Los tours virtuales y videos 360 pueden utilizarse en una amplia variedad de disciplinas, como ciencias y tecnologías químicas y de los alimentos, medicina, ciencias naturales y agrarias, arquitectura, geografía, historia, arte, entre otras. Permiten familiarizar a los estudiantes con contextos reales relacionados con el área de estudio.

## Material y métodos

Para la producción de los tours virtuales se ha empleado la tecnología de video e imágenes de 360° que proporciona al usuario la posibilidad de explorar el entorno en todas direcciones ofreciendo una experiencia inmersiva con la posibilidad de utilizar gafas VR.

## Cámara 360

La cámara empleada para las grabaciones de imágenes y videos esféricos de 360° (Insta360 modelo One R) está dotada de dos lentes de tipo gran angular (180° × 2; distancia focal de 7,2 mm) con una resolución total en video de 5.7 K (5760 × 2880) a 30/25 o 24 fps y 6080 ×



3040 (2:1) en fotos. Esta resolución es adecuada para que el campo de visión (FOV, *field of view*) proporcione una calidad adecuada a las imágenes. La visión de videos 360° en una pantalla o con gafas VR suele tener una amplitud de 90-120° horizontalmente y 90-100° verticalmente, siendo la del ojo humano de 135°. Por lo tanto, la resolución del FOV suele ser aproximadamente 1/6 de la del video o imagen esférica 360; simplificando, el equivalente de una cara de un cubo. Por lo tanto, 1/6 de 5760 × 2880 se corresponden a 1152 × 576, una resolución inferior al estándar HD (1920 × 1080), pero suficiente para ofrecer una buena visión. Si la resolución de la grabación de video 360 fuese 'solo' 4 K (UHD), la resolución resultante de la parte visible sería demasiado baja (4096 × 2160 > 1/6: 819 × 432) para disfrutar de una buena experiencia visual. Las cámaras 360° profesionales tiene una resolución entre 8 K y 16 K, pero su precio es muy elevado para la aplicación que se describe en este artículo. El programa informático de la cámara (Insta360 Studio) permite convertir, editar y realizar reencuadres de los videos grabados, permitiendo su exportación a una amplia variedad de formatos para su adaptación a las distintas necesidades en la postproducción de los TV360, además de permitir la extracción de imágenes fijas 360.

### **Software para la creación/producción de los tours**

El software que se ha utilizado en la producción de los tours (3dvista Virtual Tour Pro) es muy potente, aunque permite una gestión relativamente sencilla de las propiedades y de la configuración de las escenas que constituyen el tour virtual. Un aspecto de gran interés es la posibilidad de incorporar 'hotspots' (punto de información) que permiten al usuario acceder a información multimedia específica y/o complementaria –por medio de fichas de datos, hipervínculos, imágenes, videos, etc.– sobre cualquier objeto o lugar

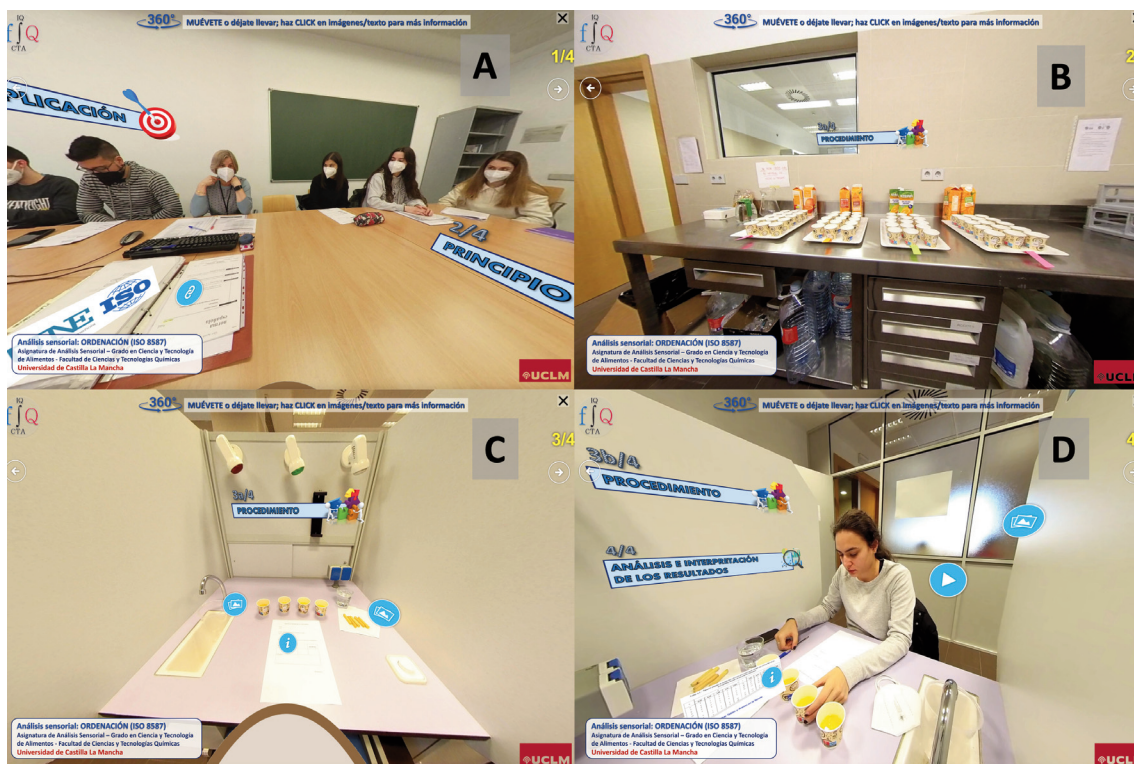
dentro de la visita virtual. El programa ofrece también la opción de diseñar pruebas de autoevaluación de los conocimientos y habilidades del alumnado. Otra de las ventajas más interesantes de este programa es que, a diferencia de la casi totalidad de los competidores, permite exportar el tour en un formato para página web que se puede publicar directamente en un servidor web desde donde acceder al TV360, sin depender del pago de una cuota para un servicio de alojamiento del tour, normalmente ofrecido por la misma empresa que comercializa el programa.

El equipamiento empleado para la realización de los TV360, la cámara para las grabaciones y el software para la producción de los tours tienen un precio asequible (aprox. 500 € cada uno) lo que ofrece la oportunidad de poder utilizar estas herramientas en muchos centros educativos.

### **Procedimiento para la producción de los TV360**

A continuación, se describen brevemente las principales etapas y procedimientos que se han seguido en el desarrollo de este proyecto de innovación docente:

1. *Selección* de la actividad práctica o formativa a virtualizar por parte de los profesores implicados.
2. *Formación*. Se han realizado sesiones formativas con los profesores, en las que se han explicado los fundamentos y se les ha formado en el uso de la cámara de grabación a 360° y del software utilizado para la generación de los TV360.
3. *Grabación* de las escenas a 360°. Suelen ser suficientes de tres a cinco escenarios para simular una actividad formativa, aunque el tour puede también estar compuesto por más escenas. En la Figura 1 se muestran, a modo de ejemplo, las cuatro escenas que componen un TV360 dirigido al análisis



A, explicación e instrucciones; B, preparación de las muestras; C, presentación de la cabina de cata; D, realización de la prueba.

Figura 1. Escenas que constituyen un TV360 dedicado a la metodología de la prueba de ordenación (UNE-ISO 8587, 2010) en análisis sensorial.

Figure 1. Scenes that constitute a VT360 dedicated to the methodology of the ranking test (UNE-ISO 8587, 2010) in sensory analysis.

sensorial. Las grabaciones se han hecho al mismo tiempo que la realización de las actividades prácticas presenciales con los estudiantes, sin necesitar, por lo tanto, tiempo adicional para su realización.

4. *Postproducción*. Se han montado las escenas 360° (generalmente denominadas “panoramas”) que pueden explorarse libremente por el usuario o bien estar guiadas por medio de opciones en su configuración. En cada panorama se han incorporado los elementos de interacción –denominados

‘hotspots’ (puntos de información y realidad aumentada)– que se consideren relevantes para la adquisición de las habilidades necesarias o para la realización de una autoevaluación por parte de los estudiantes.

5. *Publicación* en un servidor web. Una vez producido el TV360, se aloja en un servidor, uno específico en este caso (<https://quimicas360.web.uclm.es>), habilitado a tal fin por el Departamento de Gestión de Servicios TIC de la UCLM.

Finalmente, el TV360 producido está listo para ser integrado en las actividades docentes y formativas de las asignaturas por medio de la plataforma de Campus virtual (por ejemplo, Moodle o MS Teams).

## Resultados y discusión

En el desarrollo de este proyecto de innovación docente se han producido y publicado un amplio número de tours virtuales 360°, sobre todo para asignaturas del grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos –al que pertenecen la mayoría de los profesores implicados en el proyecto. El principal objetivo que se desea alcanzar es su incorporación como material docente ofrecido a los estudiantes en las distintas asignaturas por medio de la plataforma de campus virtual de la Universidad (Moodle o MS Teams). Esto permite a los alumnos visualizar e interactuar con los TV360 en el momento en que lo necesitan, principalmente antes de acudir presencialmente a los laboratorios e instalaciones o bien antes de realizar el examen práctico, ayudándoles en la mejora de su aprendizaje y en la adquisición de las habilidades de las actividades prácticas de laboratorio o planta piloto antes de entrar físicamente en estos espacios, familiarizándose con los entornos, los procedimientos y equipamientos que se van a encontrar en el laboratorio.

En la Tabla 2 se presentan los enlaces para acceder a los TV360 producidos en el marco de este proyecto de innovación docente, que en nuestro caso son públicos para que puedan ser de utilidad –en particular para los IES (Institutos de Enseñanza Secundaria)– además de servir para promocionar las titulaciones de nuestra Facultad. Se quiere destacar que el espíritu de este proyecto de innovación docente es que los TV360 producidos sean de acceso público para que otros profesores o alumnos de otras universidades o centros educativos, en

particular los preuniversitarios, puedan utilizarlos, a diferencia de la política de otros centros en los cuales estos recursos están disponibles solo para el uso interno por parte de sus estudiantes. En este sentido, se ha creado una página específica en el sitio web de la Facultad de Químicas para visualizar este tipo de contenido audiovisual, junto a otra, aún más completa, dedicada de forma específica a los TV360 dirigidos al alumnado del grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CTA; ver enlaces en la Tabla 2), que representan a la mayoría de los producidos.

Los TV360 se puede diseñar para cumplir dos funciones académicas bien diferenciadas: (i) para simular la actividad a realizar posteriormente de forma presencial; o bien (ii) como ejercicio de autoevaluación para que el alumno pueda comprobar su grado de comprensión y aprendizaje. En el primer caso, se busca que los estudiantes puedan visualizar e interactuar con los TV360 todas las veces que lo necesiten antes de acudir presencialmente para realizar la actividad práctica en el laboratorio o planta piloto, para así familiarizarse y comprender de forma más profunda el significado y las habilidades requeridas en de cada etapa del procedimiento a llevar a cabo, el uso de las herramientas, y equipamientos específico de cada tarea. Este entrenamiento se enmarca en el concepto de prelaboratorio que en la Facultad de Ciencia y Tecnología Químicas de la UCLM estamos implantando desde hace tiempo con el objetivo exactamente de preparar mejor a los estudiantes antes de que entren físicamente a los laboratorios. Además, el alumno tendrá la oportunidad de volver a practicar de nuevo antes de la realización de una evaluación o un examen de las actividades prácticas. En el caso de la autoevaluación, los TV360 diseñados para tal fin pueden contener preguntas tipo test y/o la necesidad de identificar correctamente herramientas, configuraciones o situaciones de trabajo, lo que permite al estudiante verificar sus conocimientos sobre la

Tabla 2. Enlaces a los videos y tours virtuales 360 desarrollados.  
 Table 2. Links to the developed videos and virtual tours 360.

Recurso	Enlace
Página web TV360 de la Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas	<a href="https://www.uclm.es/ciudad-real/quimicas/Transferencia_Visibilidad/InnovaDocente/Tours-virtuales-360">https://www.uclm.es/ciudad-real/quimicas/Transferencia_Visibilidad/InnovaDocente/Tours-virtuales-360</a>
TV360 para asignaturas de Ciencia y Tecnología de Alimentos	<a href="https://www.uclm.es/departamentos/qanalitica/ctalimentos/tours360">https://www.uclm.es/departamentos/qanalitica/ctalimentos/tours360</a>
Disciplina de Análisis Sensorial	<a href="https://www.uclm.es/departamentos/qanalitica/ctalimentos/tours360/as">https://www.uclm.es/departamentos/qanalitica/ctalimentos/tours360/as</a>
Ejemplos de actividades en laboratorio químico físico	<a href="https://quimicas360.web.uclm.es/AmpliacionQuimica/">https://quimicas360.web.uclm.es/AmpliacionQuimica/</a> <a href="https://quimicas360.web.uclm.es/PrNH-L1/">https://quimicas360.web.uclm.es/PrNH-L1/</a>
Ejemplos de actividades en laboratorio sensorial / sala de cata	<a href="https://quimicas360.web.uclm.es/SalaCata-CTA_VR/">https://quimicas360.web.uclm.es/SalaCata-CTA_VR/</a> <a href="https://quimicas360.web.uclm.es/Sens-Ordenacion/">https://quimicas360.web.uclm.es/Sens-Ordenacion/</a>
Ejemplos de actividades en planta piloto	<a href="https://quimicas360.web.uclm.es/PrAG-RendGraso/">https://quimicas360.web.uclm.es/PrAG-RendGraso/</a> <a href="https://quimicas360.web.uclm.es/Lacteos-FabQueso/">https://quimicas360.web.uclm.es/Lacteos-FabQueso/</a>
Ejemplos de TV360 de autoevaluación	<a href="https://quimicas360.web.uclm.es/PrNH-L1-TEST/">https://quimicas360.web.uclm.es/PrNH-L1-TEST/</a> <a href="https://quimicas360.web.uclm.es/AmpliacionQuimicaTest/">https://quimicas360.web.uclm.es/AmpliacionQuimicaTest/</a>
Visita virtual al edificio Marie Curie, sede de la Ciencia y Tecnología de Alimentos	<a href="https://quimicas360.web.uclm.es/CTAUclm-MarieCurie/">https://quimicas360.web.uclm.es/CTAUclm-MarieCurie/</a>
La Fábrica de Chocolate (video 360°)	<a href="https://www.youtube.com/watch?v=q4cP_P36ZEQ">https://www.youtube.com/watch?v=q4cP_P36ZEQ</a>

práctica que va a realizar o que ya ha realizado y le brinda la ocasión de realizar un repaso antes de la correspondiente evaluación.

El grado en CTA es claramente multidisciplinar y por eso se ha enfocado la producción de TV360 en los distintos tipos de laboratorios e instalaciones empleados en esta área de estudios: laboratorio fisicoquímico, microbiológico, sensorial o sala de cata y planta piloto. De hecho, uno de los objetivos básicos de la creación de los TV360 es justamente este, presentar los utensilios, materiales y equipamiento básicos de los distintos tipos de laboratorios en los cuales el graduado en CTA ejercerá su actividad profesional en el futuro. En este sentido, algunos de los TV360 que

se han elaborado están enfocados a este objetivo, mientras que otros por el contrario se dirigen hacia el entrenamiento en la realización de actividades específicas de algunas asignaturas, tal y como se refleja en la Figura 2 y en la Tabla 2.

Una de las características más distintivas del grado en CTA es la necesidad de conocer y saber aplicar el análisis sensorial de los alimentos y el comportamiento del consumidor. El laboratorio sensorial o sala de cata es un espacio peculiar y especializado; la presentación con técnicas interactivas e inmersivas de las características de dicho espacio y sus procedimientos de ensayo son, por lo tanto, fundamentales. Así se han elaborado una se-



A, laboratorio químico físico; B, sala de cata; C, planta piloto; D, prueba de autoevaluación.

Figura 2. Ejemplos de TV360 diseñados para el entrenamiento o la autoevaluación en distintos tipos de laboratorios.

Figure 2. Examples of VT360 designed for training or self-assessment in different types of laboratories.

rie de TV360 dedicada a la familiarización del estudiante con este espacio, mientras que otros tours se centran en explicar cómo se utilizan distintas metodologías de pruebas sensoriales, tal y como se puede observar en la Figura 1 y en la Tabla 2.

La tecnología de los alimentos es un pilar indiscutible de la profesión del tecnólogo de alimentos, y en este sentido las actividades prácticas realizadas en planta piloto provista de equipamientos semiindustriales proporcionan una importante formación para el futuro profesional de los alumnos en el sector de la industria alimentaria. En los enlaces proporcionados en la Tabla 2 se puede acce-

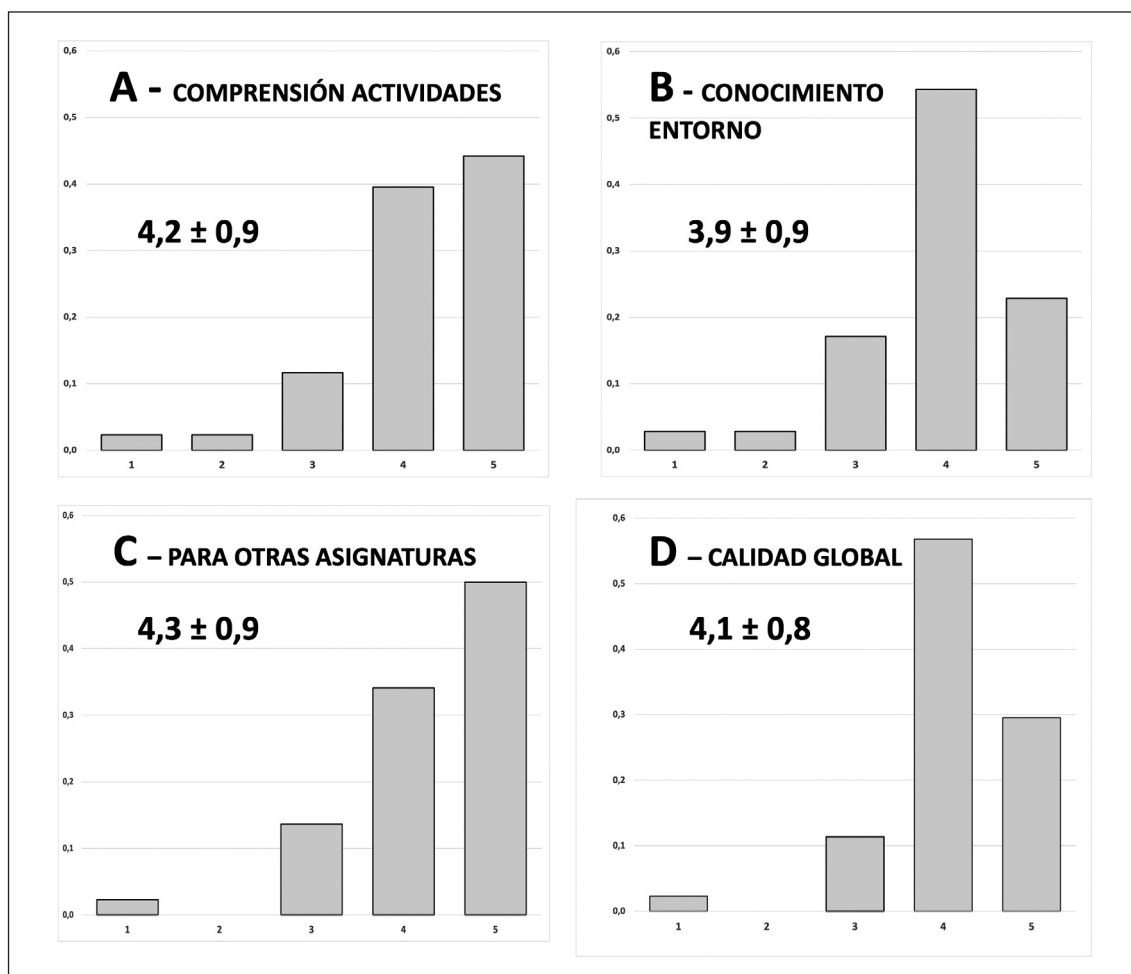
der directamente a algunos ejemplos de TV360 ambientados en planta piloto, por ejemplo, para la determinación del rendimiento graso en el procesado de la aceituna para la obtención del aceite virgen de oliva o en la elaboración de quesos. Se puede acceder a más TV360 desde la página principal de CTA (Tabla 2).

Actualmente, las asignaturas en las que se han incorporado más tours virtuales como parte de las actividades de prelaboratorio principalmente son: Nutrición Humana (3º del grado en CTA), Análisis sensorial (3º CTA), Grasas y aceites (4º CTA), Análisis sensorial avanzado y comportamiento del consumidor

(Máster Universitario en Innovación y desarrollo de alimentos de calidad, UCLM) y Aceite de oliva de calidad (Máster Universitario en Calidad y Seguridad alimentaria, UPV-EHU). Las encuestas realizadas tanto a los estudiantes como a los profesores que se han involucrado activamente en la producción de los tours virtuales evidencian un buen grado de satisfacción, tanto por el uso de las visitas

360° para la formación y el entrenamiento de los alumnos antes de acudir físicamente al laboratorio como en la calidad de la experiencia visual de los tours.

En la Figura 3 se muestran los resultados de algunas de las preguntas de las encuestas realizadas. Los estudiantes ( $n = 72$ ) valoran muy positivamente, 4,2 sobre 5,0 puntos (fig. 3A), la comprensión de las actividades a rea-



A, comprensión de las actividades; B, familiarización con el entorno; C, les gustaría disponer también para otras asignaturas; D, calidad global de la experiencia.

Figura 3. Resultados de las encuestas realizadas a los estudiantes.

Figure 3. Results of the surveys carried out on the students.

lizar por medio de los TV360 frente a la lectura del clásico guion escrito, así como que les gustaría disponer de esta herramienta también en otras asignaturas (4,3/5,0; fig. 3C). La familiarización con el entorno del laboratorio obtenida por el uso de los TV360 en comparación con la experiencia real al entrar en persona en el espacio recibe una valoración un poco menor (3,9; fig. 3B). La calidad global de la experiencia se puntúa con más de 4 puntos sobre 5 (4,1; fig. 3D). Entre los comentarios y observaciones realizadas con más frecuencia por los alumnos se encuentran: facilitan, ayudan, son de utilidad y de gran interés para comprender la actividad que se va a realizar en el laboratorio.

La valoración por parte de los quince profesores directamente implicados en la producción de los TV360 ha sido aún mejor que la de los estudiantes. Valoran muy positivamente (4,7/5,0) la información que se puede incorporar a los tours, al mismo tiempo que remarcan el elevado esfuerzo necesario para su realización (4,5/5,0). Todos los profesores indican que estarían dispuestos a realizar más visitas virtuales en los próximos años, aunque el 60 % lo haría solo si se dispone de personal de apoyo.

Se ha realizado también un tour virtual 360° del edificio Marie Curie de la Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas, sede de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos en la UCLM –ver enlace en la Tabla 2–, en el cual, además de poder pasear por los distintos laboratorios docentes y de investigación, también se puede acceder a información sobre la titulación de grado en Ciencia y Tecnología de Alimentos y del Máster Universitario en Innovación y Desarrollo de Alimentos de Calidad.

Aprovechando la experiencia con los TV360 y videos 360° que se ha adquirido durante el desarrollo de este proyecto de innovación docente, también se ha realizado un video inmersivo 360 para una actividad formativa

programada para estudiantes de Secundaria denominada ‘La fábrica de chocolate’ (Tabla 2). Esta iniciativa de la Facultad de Ciencias y Tecnología Químicas pretende que los alumnos de bachillerato descubran cómo es un día en un Centro Universitario docente y de investigación. La experiencia se compone de una serie de actividades realizadas de primera mano por los estudiantes en distintos entornos y tipos de laboratorios –químico, sensorial, planta piloto–, cuyo hilo conductor es el proceso de elaboración del chocolate a partir del fruto del cacao (enlace en Tabla 2).

## Conclusiones

Los tours virtuales 360° de laboratorios son relativamente sencillos, rápidos y económicos de producir. Su visualización se puede realizar en línea por medio de cualquier dispositivo: teléfono, tableta, ordenador o bien con gafas de realidad virtual para disfrutar de una experiencia totalmente inmersiva. Los resultados de la experiencia descrita demuestran que la familiarización y la preparación percibidas por los alumnos mejoraron después de interactuar con una clase de laboratorio virtual antes de una sesión de laboratorio presencial.

El empleo de tours virtuales 360° y videos 360° en la docencia universitaria amplía las posibilidades de aprendizaje, enriquece la experiencia educativa y brinda a los estudiantes la oportunidad de explorar entornos virtuales interactivos. Estas tecnologías promueven el aprendizaje activo, la inmersión y la conexión con diferentes disciplinas, mejorando la comprensión y el desarrollo de habilidades. Por lo tanto, se puede afirmar que los laboratorios virtuales son una herramienta viable y de gran valor didáctico e incluso, en determinados casos, una alternativa a los laboratorios prácticos tradicionales.

## Agradecimientos

A todos los profesores de la Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas que han participado activamente en este proyecto de innovación docente y/o en la actividad para los IES de la 'Fábrica de chocolate'.

A la UCLM por la concesión del Proyecto de Innovación y Mejora Docente UCLM 2021-23 "Producción de 'Tours virtuales 360° con realidad aumentada' y su empleo para la mejora del aprendizaje de habilidades de las actividades prácticas experimentales".

## Referencias bibliográficas

- Agustian H.Y., Seery M.K. (2017). Reasserting the role of prelaboratory activities in chemistry education: a proposed framework for their design. *Chemistry Education Research and Practice* 18(4): 518-532. <https://doi.org/10.1039/C7RP00140A>.
- Ali N., Ullah S. (2020). Review to analyze and compare virtual chemistry laboratories for their use in education. *Journal of Chemical Education* 97(10): 3563-74. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c00185>.
- Bellou I., Papachristos N.M., Mikropoulos T.A. (2018). Digital learning technologies in chemistry education: a review. En: *Digital technologies: sustainable innovations for improving teaching and learning* (Ed. Sampson D., Ifenthaler D., Spector J.M., Isaías, P.), pp. 57-80. Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-73417-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-73417-0_4).
- Chan P., Van Gerven T., Dubois J.L., Bernaerts K. (2021). Virtual chemical laboratories: A systematic literature review of research, technologies and instructional design. *Computers and Education Open* 2: 100053. <https://doi.org/10.1016/j.caeo.2021.100053>.
- Clemons T.D., Fouche L., Rummey C., Lopez R.E., Spagnoli D. (2019). Introducing the first year laboratory to undergraduate chemistry students with an interactive 360° experience. *Journal of Chemical Education* 96(7): 1491-1496. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.8b00861>.
- Ferrell J.B., Campbell J.P., McCarthy D.R., McKay K.T., Hensinger M., Srinivasan R., Zhao X., Wurthmann A., Li J., Schneebeli S.T. (2019). Chemical exploration with virtual reality in organic teaching laboratories. *Journal of Chemical Education* 96(9): 1961-1966. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.9b00036>.
- Fung F.M. (2015). Using first-person perspective filming techniques for a chemistry laboratory demonstration to facilitate a flipped pre-Lab. *Journal of Chemical Education* 92(9): 1518-1521. <https://doi.org/10.1021/ed5009624>.
- Levonis S.M., Tauber A.L., Schweiker S.S. (2021). 360° virtual laboratory tour with embedded skills videos. *Journal of Chemical Education* 98: 651-654 <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c00622>.
- Reid N., Shah I. (2007). The role of laboratory work in university chemistry. *Chemistry Education Research and Practice* 8(2): 172-185. <https://doi.org/10.1039/B5RP90026C>.
- Schweiker S.S., Levonis S.M. (2020). Insights gained while teaching first semester chemistry in the time of COVID-19 at Bond University in Australia. *Journal of Chemical Education* 97(9): 2863-2865. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c00621>.
- Stieff M., Werner S.M., Fink B., Meador D. (2018). Online prelaboratory videos improve student performance in the general chemistry laboratory. *Journal of Chemical Education* 95(8): 1260-1266. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.8b00109>.
- Sypas A., Kalles D. (2018) Virtual laboratories in biology, biotechnology and chemistry education: a literature review. *Proceedings of the 22nd Pan-Hellenic Conference on Informatics; Association for Computing Machinery, 29 noviembre, Athens, Greece*, pp. 70-75. <https://doi.org/10.1145/3291533.3291560>.
- UNE-ISO 8587 (2010). Análisis sensorial. Metodología. Ordenación. AENOR, Madrid, España. 25 pp.

(Aceptado para publicación el 28 de noviembre de 2023)



## Presencia de residuos antibióticos en carnes comercializadas en el área transfronteriza España-Francia: un enfoque novedoso en los métodos de vigilancia

María Jesús Serrano<sup>1,\*</sup>, Janire Elorduy<sup>2</sup>, Itsaso Zabaleta<sup>2</sup>, Georges Istamboulie<sup>3</sup>, Elena González-Fandos<sup>4</sup>, Alain Bousquet-Melou<sup>5</sup>, Luis Mata<sup>6</sup>, Chloé Aymard<sup>3</sup>, Jessica Da Silva<sup>4</sup>, Marlène Lacroix<sup>5</sup>, Alba Martínez-Laorden<sup>4</sup>, Diego García-Gonzalo<sup>1</sup>, Santiago Condón<sup>1</sup>, Eunate Abilleira<sup>2</sup> y Rafael Pagán<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Agroalimentario de Aragón – Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria, 50013, Zaragoza, España

<sup>2</sup> Ministerio de Sanidad del Gobierno Vasco, Oficina de Salud Pública y Adicciones, Laboratorio de Salud Pública, 20013, Guipuzkoa, España

<sup>3</sup> Universidad de Perpignan Via Domitia. Biocapteurs-Analyse-Environnement, 66860, Perpignan, Francia

<sup>4</sup> Departamento de Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación CIVA, Department of Food Technology, CIVA Research Center, University of La Rioja, 26006 Logroño, Spain

<sup>5</sup> INTHERES, Toulouse University, INRA, ENVT, 31300 Toulouse, France

<sup>6</sup> Department of R&D, ZEULAB S.L., 50197, Zaragoza, Spain

### Resumen

Aunque los antimicrobianos son grandes aliados en producción animal, su uso masivo ha contribuido a la aparición de antibiorresistencias. Además, cuando los periodos de supresión no se respetan, sus residuos pueden llegar a la cadena alimentaria, provocando toxicidad directa, alergias y/o disbiosis en la microbiota intestinal de los consumidores.

Puesto que España y Francia son los mayores productores de carne en la UE y están entre los principales consumidores a nivel mundial, el objetivo de nuestro estudio fue investigar la presencia de antimicrobianos en carne comercializada en el área transfronteriza España-Francia. Se recogieron 5.357 muestras de carne de diferentes especies animales en España (Zaragoza, Bilbao y Logroño) y Francia (Toulouse y Perpignan), que se analizaron por un método de cribado (Explorer®+QuinoScan®, Zeulab S.L., Zaragoza, España), obteniendo 194 muestras positivas, que se analizaron por cromatografía UPLC-QTOF para su confirmación. Los análisis cromatográficos revelaron presencia de residuos en 30 muestras, aunque solo 5 de ellas (0,093 % de las muestras iniciales) fueron no-conformes de acuerdo a la legislación. Análisis posteriores sugirieron que esta divergencia entre el cribado y la confirmación se debe a la presencia de metabolitos biológicamente activos derivados de los antimicrobianos originales, no identificados

\* Autor para correspondencia: mjserran@unizar.es

Cita del artículo: Serrano M.J., Elorduy J., Zabaleta I., Istamboulie G., González-Fandos E., Bousquet-Melou A., Mata L., Aymard C., Da Silva J., Lacroix M., Martínez-Laorden A., García-Gonzalo D., Condón S., Abilleira E., Pagán R. (2024). Presencia de residuos antibióticos en carnes comercializadas en el área transfronteriza España-Francia: un enfoque novedoso en los métodos de vigilancia. ITEA-Información Técnica Económica Agraria 120(3): 251-268. <https://doi.org/10.12706/itea.2024.001>



por el método dirigido UPLC-QTOF, generando la inhibición del test Explorer®. Así, aunque las técnicas cromatográficas detectan el compuesto marcador indicado por la legislación y son los métodos de elección para control oficial de antibióticos en alimentos, sus metabolitos pueden escapar al monitoreo, lo que sugiere que los test biológicos son más adecuados para proteger la salud de los consumidores.

**Palabras clave:** Carne, antibióticos, control de residuos antimicrobianos, test biológico de cribado, cromatografía QTOF.

### **Antimicrobial residues assessment over commercialized meat samples from the cross-border area Spain-France: a new approach for effective monitoring**

#### **Abstract**

Although antimicrobials are valuable allies in animal production, their extended use has led to the emergence of antimicrobial resistance. Moreover, when withdrawal periods in food-producing animals are not observed, antimicrobial residues can access the food chain, causing direct toxicity, allergies, and/or intestinal microbiota dysbiosis in consumers. Given that Spain and France are the largest meat producers in the EU and are among the top consumers, our study's aim was to investigate the presence of antimicrobials in commercialized meat purchased in the Spain-France cross-border area (POCTEFA region). 5,357 meat samples were collected from different animal species and a variety of different retailer types in Spain (Zaragoza, Bilbao, and Logroño) as well as in France (Toulouse and Perpignan). Meat samples were analysed by a screening method (Explorer®+QuinoScan®), yielding 194 positive samples, which were further evaluated by UPLC-QTOF (Ultra Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time of Flight) for confirmation. Chromatographic analyses found antimicrobial residues in 30 samples, although only 5 of them (0.093 % of initial samples) were non-compliant according to the current legislation. Further studies suggested that this mismatch between screening and confirmatory analyses might be due to the presence of biologically active metabolites derived from antimicrobials unidentified by the targeted UPLC-QTOF method, causing inhibition of the biological Explorer® test. Although chromatographic techniques detect the marker compounds determined by legislation and are the methods selected for official control of antimicrobials in food, metabolites might escape their monitoring. This thus suggests that biological tests are the most adequate ones in terms of ideal consumer health protection.

**Keywords:** Meat, antibiotics, metabolites, antimicrobial residues control, biological screening test, QTOF chromatography.

#### **Introducción**

La situación sanitaria actual, marcada por la pandemia, ha evidenciado la importancia de una buena salud global bajo el enfoque "One Health". En este contexto, los antibióticos se dibujan como herramientas muy útiles en la salvaguarda de la salud humana y animal. Mientras que en 2014 un 70 % de los antibióticos se destinaban a animales de producción (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades; ECDC *et al.*, 2017), los últimos datos publicados para Europa (ECDC, 2021) muestran que esta situa-

ción se ha revertido, siendo más alto en medicina humana. Aun así, su uso en ganadería tiene repercusión en la salud pública (Brown *et al.*, 2017; Diana *et al.*, 2020).

Por un lado, la ingesta de carne contaminada con residuos de antibióticos puede tener graves consecuencias para los consumidores, generando toxicidad directa, reacciones alérgicas y/o disbiosis de la microbiota intestinal, por no mencionar el incremento de resistencias a antibióticos (AMR) que se pueden acumular en nuestra microbiota intestinal (Wang *et al.*, 2016). Por otro lado, la libera-

ción al medio ambiente de los residuos antimicrobianos utilizados en las granjas puede contribuir al incremento del ya grave problema de AMR (Hamscher et al., 2005; Sarma et al., 2006; Zhou et al., 2020), tanto que la OMS (Organización Mundial de la Salud) ya la considera como uno de los 10 mayores retos a los que se enfrenta la humanidad en las próximas décadas (OMS, 2021).

A pesar de que un buen control de los tratamientos antimicrobianos implementados a nivel de granja es suficiente para evitar su aparición en la carne, la administración también lleva a cabo controles exhaustivos. La unión del buen hacer de ganaderos y veterinarios, apoyada en recomendaciones para un uso racional emitidas por organismos como la Agencia Europea del Medicamento (EMA, 2020), en unión con una legislación conservadora, han conseguido rebajar la notificación de muestras no-conformes hasta un 0,14 % en 2019 en Europa (EFSA, 2021). Sin embargo, no existen datos sobre las muestras que contienen residuos de antibióticos por debajo de los LMR (Límites Máximos de Residuos; Reglamento (UE) n° 37/2010).

Puesto que la región POCTEFA comprende territorios transfronterizos de España y Francia, países con la producción cárnica europea más alta (EUROSTAT, 2020), y entre los mayores consumidores europeos (Kanerva, 2013) e incluso a nivel mundial (FAOSTAT, 2021), el objetivo de este trabajo es evaluar la incidencia de residuos antimicrobianos en carne comercializada en la zona, procedente de 5 de las ciudades POCTEFA más pobladas, procedente de 12 especies animales y diferente tipología de detallista, y tipificar las tendencias de su aparición mediante un análisis secuencial (mediante método de cribado y confirmatorio; Reglamento (UE) 2017/625) análogo al propuesto en control oficial.

## Material y métodos

### *Recogida de muestras comerciales*

La región POCTEFA comprende territorios de la frontera entre España y Francia. Desde enero de 2020 hasta febrero de 2021, se recogieron 5.357 muestras de carne comercial de 5 ciudades de esta zona: Zaragoza, Logroño, Bilbao, Perpignan y Toulouse, de distinta tipología de comercio (grandes superficies, supermercados, comercio de proximidad, halal y carnicerías rurales). La cantidad de muestras recogida por especie se determinó en base a datos de consumo (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA, 2019; Agreste, 2020), disponibilidad y diversidad de marcas comerciales, especialmente alta en carne de vacuno. El número de muestras por especie y ciudad se recoge en la Tabla 1.

Todas las muestras se analizaron de acuerdo a la normativa vigente (Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808): se llevó a cabo un análisis de cribado (Explorer® + QuinoScan®) seguido de un análisis cromatográfico por UHPLC-QTOF (Ultra High Performance Liquid Chromatography – Quadrupole Time of Flight) de las muestras sospechosas (positivas a dos análisis de cribado consecutivos) de acuerdo a lo descrito por Serrano et al. (2022). El test Explorer® es un test de base biológica para el cribado de un amplio espectro de antibióticos, y QuinoScan® detecta específicamente quinolonas, familia para la cual no es sensible Explorer®. El programa GraphPad Prism® (San Diego, California, USA) se utilizó para la representación de resultados y los análisis estadísticos por ANOVA. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $P \leq 0,05$ .

Tabla 1. Número y porcentaje de muestras de cada especie recogido en cada ciudad.  
 Table 1. Number and percentage of samples of each species collected on each city.

	Zaragoza		Bilbao		Logroño		Toulouse		Perpignan		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Vacuno	299	25,9	233	24,2	334	26,7	355	34,5	210	21,9	1.431	26,7
Pollo	300	26,0	307	31,9	258	20,6	319	31,0	146	15,2	1.330	24,8
Cerdo	219	19,0	202	21,0	219	17,5	171	16,6	129	13,4	940	17,5
Pavo	109	9,4	112	11,6	103	8,2	77	7,5	152	15,8	553	10,3
Cordero	145	12,6	50	5,2	127	10,2	42	4,1	115	12,0	479	8,9
Conejo	83	7,2	59	6,1	109	8,7	14	1,4	52	5,4	317	5,9
Pato					31	2,5	48	4,7	94	9,8	173	3,2
Caballo					19	1,5	1	0,1	60	6,3	80	1,5
Codorniz					37	3,0					37	0,7
Cabra					11	0,9					11	0,2
Pintada							2	0,2	2	0,2	4	0,1
Perdiz					2	0,2					2	0,04
TOTAL	299	25,9	233	24,2	334	26,7	355	34,5	210	21,9	1.431	26,7

No: Número de muestras totales recogidas; %: Porcentaje de muestras de cada especie.

### ***Estudios adicionales para detectar las causas de la divergencia entre los resultados del cribado y la confirmación cromatográfica***

Por su parte, la cromatografía detecta las moléculas buscadas en una muestra en base a su composición química. Es por ello que se plantearon diversas hipótesis que pudieran explicar la presencia de estas moléculas que inhiben el test biológico Explorer® pero que no son detectables por la cromatografía dirigida.

a) La presencia de antimicrobianos no incluidos en la lista de detección de la cromatografía dirigida, como es el caso de los aminoglucósidos. Sin embargo, ésta no debería ser la causa principal de las diferencias entre los resultados de Explorer® y QTOF, ya que la administración de amino-

glucósidos en animales de producción a nivel europeo es, por ejemplo, 4 veces menor a la de las penicilinas y 5 menor que la de las tetraciclinas (EMA, 2021).

- b) La presencia en carne de antimicrobianos alternativos de origen natural del tipo de los aceites esenciales, cuyo uso está actualmente en auge.
- c) La presencia en carne de metabolitos biológicamente activos procedentes de la degradación de los antimicrobianos originales, que pasan desapercibidos para la cromatografía dirigida.

Para comprobar el papel que jugaron las dos últimas hipótesis en el gap detectado entre los resultados del test biológico y la cromatografía, se llevaron a cabo los experimentos adicionales que se detallan a continuación.

*Evaluación de la actividad de aceites esenciales como compuestos responsables de resultados falsos positivos del test biológico*

En las últimas décadas, las autoridades sanitarias, veterinarios y productores han centrado sus esfuerzos en racionalizar el uso de los antibióticos a nivel de granja. Es por ello que actualmente se añaden a piensos algunos compuestos naturales con actividad antibiótica, entre los que destacan los aceites esenciales, ya que mejoran la salud general de los animales, el rendimiento e incluso la calidad de la carne (Omonijo et al., 2018). Los aceites esenciales tienen una actividad antibacteriana ampliamente reconocida y estudiada y pueden tener incluso efectos positivos sobre el perfil de ácidos grasos de la carne (Smeti et al., 2018). De hecho, algunos estudios han revelado que los aceites esenciales pueden acumularse en músculo (de Haro, 2015), y algunos autores han descrito cómo afectan a la capacidad de germinación y crecimiento de bacterias esporuladas, específicamente, de *Geobacillus stearothermophilus* (Voundi et al., 2015), microorganismo esporulado en que está basado el test Explorer®. Así, la bioacumulación a nivel muscular de los aceites esenciales añadidos a los piensos podría ser responsable de su inhibición y, por tanto, de las altas tasas de muestras positivas a Explorer® que no se confirmaron por QTOF.

Con el objeto de evaluar esta hipótesis, se determinaron inicialmente las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de los aceites esenciales o de sus componentes, usualmente utilizados en alimentación animal y que eventualmente podrían acumularse en músculo y ser responsables así de la inhibición del test. Puesto que son prácticamente inmiscibles en agua, se aplicó el método desarrollado por Friedman et al. (2002) para su adición a muestras de carne libre de antibióticos.

*Presencia en carne de metabolitos biológicamente activos derivados de los antibióticos originales*

En el caso de que estos metabolitos existiesen en las muestras de carne, éstos deberían proceder, obviamente, de la degradación de los compuestos originales. A pesar de que estos metabolitos podrían mantener su actividad biológica y ser responsables de la inhibición del crecimiento microbiano, dando así lugar a la alta tasa de positivos detectada por Explorer®, su estructura química sería diferente a la del compuesto original, pasando así inadvertidos para las técnicas cromatográficas empleadas en control oficial, dirigidas a la detección de compuestos marcador definidos por la legislación (Reglamento (UE) n° 37/2010 para sustancias autorizadas y Reglamento (UE) 2019/1871 para las no autorizadas). Para comprobar esta hipótesis, se estudiaron 26 muestras de carne congeladas procedentes del banco de muestras construido por Serrano et al. (2020), con concentraciones conocidas de antibióticos (determinadas por QTOF en 2018), envasadas a vacío y mantenidas en congelación a -20 °C desde entonces hasta su re-análisis por Explorer® y QTOF en 2021. Brevemente, el banco se construyó con muestras pareadas de músculo, sangre y otros fluidos procedentes de 93 cerdos. De ellos, 15 fueron sacrificados sin recibir tratamiento, considerándose animales blanco de referencia y 78 fueron administrados vía intramuscular con diferentes antibióticos (amoxicilina, oxitetraciclina, sulfametoxipiridazina, oxitetraciclina y enrofloxacina). Estos cerdos se sacrificaron a lo largo del periodo de supresión y las muestras obtenidas se caracterizaron por cromatografía, determinando la concentración de antibiótico presente, lo que permitió estudiar tanto su evolución en las distintas matrices como estudiar comparativamente su presencia en los diversos fluidos.

*Presencia de metabolitos de  $\beta$ -lactámicos biológicamente activos en muestras de carne naturalmente contaminadas con amoxicilina*

BTScan® (Zeulab, Zaragoza, España) es un test actualmente comercializado, basado en inmunocromatografía de flujo lateral que detecta la presencia de  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas en leche. Este test está optimizado para leche, por lo que para evaluar la presencia potencial de metabolitos activos de  $\beta$ -lactámicos en muestras de carne, se comprobó la dilución más adecuada de suero de carne en leche, que resultó ser de 20/80 v/v.

*Detección de metabolitos de sulfamidas basada en inhibición competitiva de su actividad biológica*

Las sulfamidas son antimicrobianos con actividad bacteriostática relacionada con la inhibición de la síntesis del ADN. Concretamente, son moléculas análogas al ácido paraminobenzóico (pABA), necesario para la síntesis de ácido fólico en bacterias. Los folatos son cruciales para la síntesis del ADN y el ARN en mamíferos y bacterias, pero mientras que los mamíferos pueden obtenerlo mediante su ingesta a través de la dieta, las bacterias tienen que sintetizarlo. El mecanismo de acción de las sulfamidas reside en la competición con el pABA por su unión a la enzima dihidropteorato sintasa y la consiguiente inhibición de la síntesis de folatos (Escribano Moriana et al., 2002).

## Resultados y discusión

### Cribado

#### *Resultados de Explorer®*

Las Tabla 2 muestra los resultados de los análisis por Explorer® de las 5.357 muestras de carne comercial, clasificados por especies y

ciudades. Globalmente, un 3,5 % de las muestras recogidas resultaron positivas (185 muestras). Los mayores porcentajes se describieron en aves (pato, pavo y pollo), mientras que los menores se describieron en vacuno ( $P \leq 0,05$ ). Aunque la positividad observada en cabra y pintada destacó por valores altos, y la de codorniz y perdiz, por lo contrario, no se consideraron en la comparativa ya que el tamaño muestral no fue representativo ( $n \leq 50$ ).

#### *Resultados de QuinoScan®*

Los resultados se muestran en la Tabla 3, clasificados por especies y ciudades. En total, el 0,2 % de las muestras resultaron positivas a la presencia de quinolonas.

#### *Resultados del cribado*

Los resultados finales del cribado están representados en la Tabla 4, organizados por especies y ciudades, y son resultado de sumar los resultados de Explorer® y QuinoScan®. En total, 194 muestras fueron positivas al cribado (2 de ellas a los dos métodos de cribado), lo que corresponde a un 3,6 % de las muestras recogidas.

### **Análisis cromatográficos de confirmación**

Tras el cribado, los 194 positivos se analizaron por UPLC-QTOF (de aquí en adelante, QTOF), por el Laboratorio de Salud Pública del Gobierno Vasco (Derio, España), autorizado para el análisis de antibióticos en el marco del control oficial. Se confirmó que 30 de ellas (Tabla 5) contenían residuos (15,2 %), con la siguiente distribución: tetraciclinas (40,6 %), sulfamidas (37,5 %), quinolonas (18,8 %) y lincomicina (3,1 %). Sin embargo, sólo el 0,093 % del total de las muestras recogidas fue no conforme, es decir, contuvo residuos antibióticos por encima de los niveles que marca el Reglamento (UE) n° 37/2010 (Límites Máximos de Residuos, LMR), valor incluso mejor que los últimos datos publicados por la

Tabla 2. Número y porcentaje de muestras de cada especie positivas a Explorer® recogidas en cada ciudad (comparadas con el número total de muestras de cada especie recogidas en cada ciudad).

Table 2. Number and percentage of samples of each species positive to Explorer® collected on each city (compared to the total number of samples of each species collected on each city).

	Zaragoza		Bilbao		Logroño		Toulouse		Perpignan		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Vacuno	7	2,3	3	1,3	4	1,2	5	1,4	0	0	19	1,3
Pollo	14	4,7	7	2,3	5	1,9	25	7,8	1	0,7	52	3,9
Cerdo	10	4,6	12	5,9	2	0,9	11	6,4	0	0	35	3,7
Pavo	7	6,4	5	4,5	6	5,8	12	15,6	5	3,3	35	6,3
Lamb	5	3,4	3	6	2	1,6	0	0	1	0,9	11	2,3
Conejo	4	4,8	4	6,8	1	0,9	0	0	3	5,8	12	3,8
Pato					11	35,5	5	10,4	0	0	16	9,2
Caballo					0	0	0	0	2	3,3	2	2,5
Codorniz					0	0					0	0
Cabra					2	18,2					2	18,2
Pintada							1	50	0	0	1	25
Perdiz					0	0					0	0
<b>TOTAL</b>	<b>47</b>	<b>4,1</b>	<b>34</b>	<b>3,5</b>	<b>33</b>	<b>2,6</b>	<b>59</b>	<b>5,7</b>	<b>12</b>	<b>1,3</b>	<b>185</b>	<b>3,5</b>

No.: Número de muestras positivas a Explorer®; %: Porcentaje de muestras positivas a Explorer®.

Tabla 3. Número y porcentaje de muestras de cada especie positivas a QuinoScan® recogidas en cada ciudad (comparadas con el número total de muestras de cada especie recogidas en cada ciudad).

Table 3. Number and percentage of samples of each species positive to QuinoScan® collected on each city (compared to the total number of samples of each species collected on each city).

	Zaragoza		Bilbao		Logroño		Toulouse		Perpignan		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Vacuno	0	0	0	0	0	0,6	1	0,3	1	0,5	2	0,3
Pollo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Cerdo	0	0	0	0	0	0,9	1	0,6	0	0	1	0,3
Pavo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Lamb	0	0	0	0	2	1,6	0	0	0	0	2	0,4
Conejo	1	1,2	1	1,7	0	0	0	0	2	3,8	4	1,3
Pato					0	0	0	0	2	2,1	2	1,2
Caballo					0	0	0	0	0	0	0	0,0
Codorniz					0	0					0	0,0
Cabra					0	0					0	0,0
Pintada							0	0	0	0	0	0,0
Perdiz					0	0					0	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>0,1</b>	<b>1</b>	<b>0,1</b>	<b>2</b>	<b>0,5</b>	<b>2</b>	<b>0,2</b>	<b>5</b>	<b>0,5</b>	<b>11</b>	<b>0,2</b>

No.: Número de muestras positivas a QuinoScan®; %: Porcentaje de muestras positivas a QuinoScan®.

Tabla 4. Número y porcentaje de muestras de cada especie positivas al cribado recogidas en cada ciudad (comparadas con el número total de muestras de cada especie recogidas en cada ciudad).

Table 4. Number and percentage of samples of each species positive to the screening collected on each city (compared to the total number of samples of each species collected on each city).

	Zaragoza		Bilbao		Logroño		Toulouse		Perpignan		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Vacuno	7	2,3	3	1,3	4	1,8	6	1,7	1	0,5	21	1,5
Pollo	14	4,7	7	2,3	5	1,9	25	7,8	1	0,7	52	3,9
Cerdo	10	4,6	12	5,9	2	1,8	12	7,0	0	0,0	36	3,8
Pavo	7	6,4	5	4,5	6	5,8	12	15,6	5	3,3	35	6,3
Lamb	5	3,4	3	6,0	4	3,1	0	0,0	1	0,9	13	2,7
Conejo	5	6,0	4*	8,5	1	0,9	0	0,0	4*	9,6	16	5,0
Pato	0		0		11	35,5	5	10,4	2	2,1	18	10,4
Caballo	0		0		0	0,0	0	0,0	2	3,3	2	2,5
Codorniz	0		0		0	0,0	0		0		0	0,0
Cabra	0		0		2	18,2	0		0		2	18,2
Pintada	0		0		0		1	50,0	0	0,0	1	25,0
Perdiz	0		0		0	0,0	0		0		0	0,0
TOTAL	48	4,2	34	3,6	35	2,8	61	5,9	16	1,8	194	3,6

No: Número de muestras positivas al cribado; %: Porcentaje de muestras positivas al cribado.

\*Se ha eliminado una muestra de conejo de Bilbao y otra de Perpignan porque daban resultado positivo a ambos test.

Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, que declararon un 0,14 % de muestras no conformes para 2019 (EFSA, 2021). A pesar de que estos datos apuntan a que la condición de la carne del área transfronteriza España-Francia es mejor que la de Europa, otras 5 muestras contuvieron concentraciones próximas a los LMR (56-96 µg/Kg), y otras 20, concentraciones muy bajas, si bien no se identificaron residuos de antibióticos en las 164 restantes.

No obstante, existe un amplio gap entre el 3,6 % de positivos al cribado y el ~0,1 % de positivos a la cromatografía. Como ambos test, Explorer® y QuinoScan®, están validados y ajustados a los LMR, no pueden ser responsables de la desviación.

#### **Estudios adicionales para detectar las causas de la divergencia entre los resultados del cribado y la confirmación cromatográfica**

Los positivos al test Explorer®, el cual detectó el mayor porcentaje de positivos del cribado, son reflejo de la presencia de metabolitos activos biológicamente, ya que estos son responsables de la inhibición del crecimiento del microorganismo en que se basa el test.

#### **Antimicrobianos alternativos: aceites esenciales**

De entre todos los antimicrobianos testados, el carvacrol, el orégano y el cinemaldehído inhibieron el crecimiento de *G. stearother-*



Tabla 5. Residuos de antibiótico identificados por cromatografía QTOF entre las muestras positivas al cribado (30 muestras en total).

Table 5. Antibiotic residues identified by QTOF chromatography between the samples positive to the screening (30 samples in total).

		Ciudad	Especies	Antibiótico	Concentración (µg/kg)	
No conformes		Logroño	Cordero	Enrofloxacina	218,8	
				Ciprofloxacina	34,34	
			Cabra	Sulfadiazina	164,3	
			Cabra	Doxiciclina	813	
		Toulouse	Cerdo	Sulfadimetoxina	110	
		Perpignan	Conejo	Sulfadimetoxina	187	
Conformes	Cercanas al LMR	Zaragoza	Cordero	Sulfadiazina	81,89	
				Bilbao	Cordero	Sulfadoxine
					Oxytetracyclina	21,7
			Logroño	Cordero	Sulfadiazina	56,2
			Toulouse	Cerdo	Enrofloxacina	88
			Perpignan	Conejo	Sulfadimetoxina	80
		Negativas	Zaragoza	Pollo	Doxiciclina	<LD*
					Doxiciclina	25,46
					Doxiciclina	<LD*
				Cerdo	Doxiciclina	<LD*
	Cerdo			Doxiciclina	9,24	
	Cordero			Sulfadiazina	12,4	
	Cordero			Sulfadiazina	14,68	
	Pavo			Doxiciclina	<LD*	
					Enrofloxacina	10,42
				Pavo	Doxiciclina	<LD*
		Conejo	Sulfadimetoxina	22,7		
		Conejo	Enrofloxacina	6,84		
		Bilbao	Pollo	Lincomicina	3,4	
	Pavo		Doxiciclina	7,05		
	Conejo	Enrofloxacina	39,5			
	Logroño	Pollo	Doxiciclina	27,71		
		Cordero	Enrofloxacina	9,7		
		Pavo	Doxiciclina	6,6		
	Toulouse	Pollo	Sulfadimetoxina	12,5		
		Pollo	Doxiciclina	31,5		
		Pavo	Sulfadimetoxina	<LD*		

\*LD: Límite de detección de la técnica cromatográfica.

*mophilus*, dando resultados positivos a Explorer®, tal y como se muestra en la Tabla 6. No obstante, hay que señalar que, para lograr resultados positivos, fue necesario añadir concentraciones  $\geq 200 \mu\text{L/L}$ , lo cual aportaría un olor y sabor tan intenso que resultaría desagradable. Como las muestras de este estudio no poseían un aroma especial y las con-

centraciones normalmente detectadas son del orden de  $\mu\text{L/mL}$  (de Haro, 2015), lo que significa 1.000 veces menores a la concentración inhibitoria descrita en este estudio, la inhibición de Explorer® por aceites esenciales se descartó como responsable de la elevada positividad de Explorer® (en comparación con los resultados de la cromatografía QTOF).

Tabla 6. Resultados de Explorer® obtenidos del análisis de suero de carne libre de antibióticos contaminado con diferentes concentraciones de algunos de los aceites esenciales más comúnmente usados y con mayor actividad antimicrobiana. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado, y la última columna incluye el resultado del control blanco.

*Table 6. Explorer® results obtained from the analyses of meat serum free of antibiotic stained with different concentrations of some of the most commonly used and higher antimicrobial activity essential oils. Each experiment was performed in triplicate, and the last column shows the result of a blank control.*

	1000 $\mu\text{L/L}$	600 $\mu\text{L/L}$	400 $\mu\text{L/L}$	200 $\mu\text{L/L}$	100 $\mu\text{L/L}$	Blanco
Carvacrol 1	+	+	+	-	-	-
Carvacrol 2	+	+	+	+	-	-
Carvacrol 3	+	+	+	-	-	-
Orégano 1	+	+	-	-	-	-
Orégano 2	+	+	+	+	-	-
Orégano 3	+	+	+	-	-	-
Cinimaldehído 1	+	-	-	-	-	-
Cinimaldehído 2	+	+	-	-	-	-
Cinimaldehído 3	+	+	-	-	-	-

+: El símbolo + se corresponde con resultados positivos a Explorer®.

-: El símbolo - se corresponde con resultados negativos a Explorer®.

#### *Presencia de metabolitos biológicamente activos procedentes de la degradación de los antibióticos originalmente presentes en músculo*

Aunque diferencias en la sensibilidad entre el método de cribado y el método confirmatorio podrían explicar desviaciones en los resultados de las 25 muestras en las que, aun siendo conformes, se detectaron residuos de

antibióticos, debían existir otras razones que explicaran las desviaciones en el resto de las muestras de carne (159 muestras en total, 5 menos que las 164 restantes, ya que hubo 5 muestras en las que sí se detectó el compuesto antibiótico aunque a concentraciones bajas, menores al límite de detección de la técnica). Es por ello que se planteó la necesidad de profundizar en la posible presencia de residuos antibióticos en muestras conformes,

incluso moléculas con propiedades antimicrobianas no incluidas en la lista de compuestos diana de los análisis cromatográficos QTOF, como los metabolitos de los compuestos originales con los que se trataron los animales.

1. Análisis confirmatorios de residuos antibióticos en muestras aleatorias negativas al cribado.

De entre las muestras de carne comercial negativas a Explorer®, se tomaron 138 (2,7 %) de forma aleatoria y se analizaron por QTOF

para comprobar la presencia de trazas de antibióticos entre las muestras negativas y corroborar el buen funcionamiento de los test, ya validados. Tal y como muestra la Tabla 7, 17 de las 138 muestras (12,3 %) contenían residuos de antibióticos siempre por debajo de los LMRs (no se encontraron falsos negativos, es decir, todas ellas eran conformes, lo que corrobora el buen funcionamiento del método de cribado). De nuevo, la familia más detectada fueron las tetraciclinas (63,2 % de las muestras con residuos), seguida por

Tabla 7. Residuos de antibiótico identificados por cromatografía QTOF entre 138 muestras negativas al cribado.

Table 7. Antibiotic residues identified by QTOF chromatography between 138 samples negative to the screening.

Ciudad	Especie	Antimicrobiano	Concentración (µk/kg)	
Bilbao	Conejo	Enrofloxacina	<LD*	
		Oxitetraciclina	<LD*	
	Cerdo	Lincomicina	14	
		Pavo	Doxiciclina	<LD*
			Doxiciclina	21
	Cordero	Doxiciclina	13	
		Sulfadiazina	16,2	
Zaragoza	Conejo	Oxitetraciclina	20,9	
		Oxitetraciclina	11	
		Doxiciclina	33,5	
		Oxitetraciclina	9,8	
	Pollo	Norfloxacina	7,3	
	Cerdo	Doxiciclina	11,5	
		Flumequina	31,6	
		Dicloxacilina	10,9	
		Lincomicina	7,8	
	Pavo	Doxiciclina	8,27	
	Cordero	Doxiciclina	<LD*	

\* LD. Límite de detección de la técnica cromatográfica.

las quinolonas (15,8 %), lincomicina (10,5 %) y sulfamidas y  $\beta$ -lactámicos (5,3 % para cada una de ellas).

La diferencia entre el porcentaje de muestras positivas al cribado que contenía residuos de antibióticos identificados por QTOF (15,5 %) y el porcentaje de muestras negativas al cribado que contenían estos residuos analizadas por el mismo método (12,3 %), fue del 3,2 %. Este valor es muy próximo al porcentaje de muestras positivas al cribado, excluyendo aquellas que fueron no-conformes (5 muestras) y aquellas conformes próximas al LMR (5 muestras), que resulta en un 2,4 % (184 de 5.357). Estas muestras adicionales, positivas a Explorer® y con trazas de antibióticos, podrían contener metabolitos biológicamente activos derivados del compuesto original. Así, tanto los antibióticos originales

como sus metabolitos, que pasarían inadvertidos para la cromatografía dirigida, serían responsables de la inhibición de Explorer®, dando lugar a muestras de carne comercial positivas al cribado que no son detectadas por cromatografía. No obstante, aunque estos resultados apoyan la hipótesis de la presencia de metabolitos biológicamente activos, fue necesario llevar a cabo experimentos adicionales para demostrar su presencia.

2. Presencia en carne de metabolitos biológicamente activos derivados de los antibióticos originales.

Los análisis cromatográficos detectaron degradación de los antibióticos ( $P \leq 0,05$ ) en 14 muestras congeladas en magnitud diferente en función del compuesto (Figura 1). Mientras que la oxitetraciclina no mostró de-

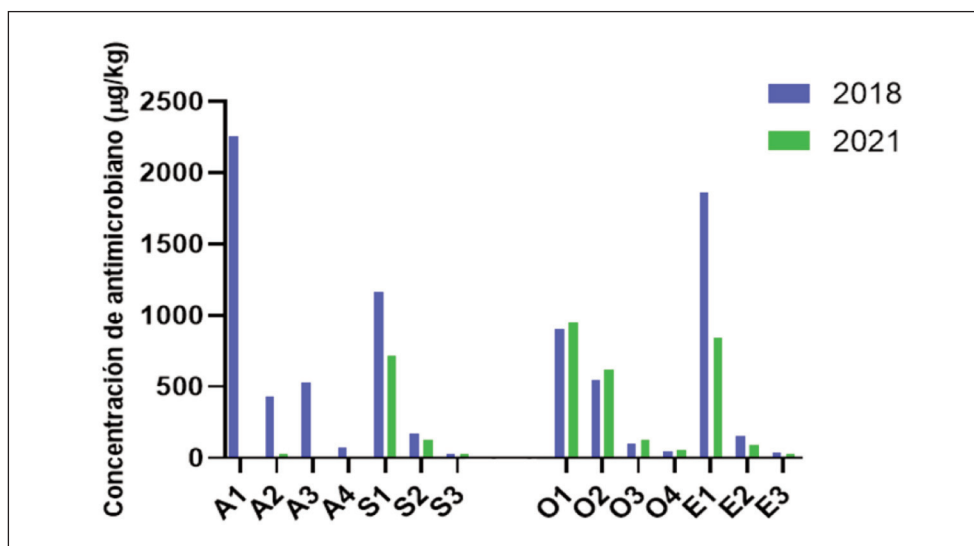


Figura 1. Concentraciones de antimicrobianas detectadas por cromatografía HPLC-FLD en 2018 (■) y QTOF en 2021 (■) en muestras de carne del banco de muestras contaminadas de forma natural con amoxicilina (A1, A2, A3, A4), sulfametoxipiridazina (S1, S2, S3), oxitetraciclina (O1, O2, O3, O4) y enrofloxacina (E1, E2, E3).

Figure 1. Antimicrobial concentrations detected by HPLC-FLD chromatography in 2018 (■) and QTOF in 2021 (■) in meat samples coming from the sample bank, naturally tainted with amoxicillin (A1, A2, A3, A4), sulfamethoxy-pyridazine (S1, S2, S3), oxytetracycline (O1, O2, O3, O4) and enrofloxacin (E1, E2, E3).

gradación, la amoxicilina se degradó de forma completa. La enrofloxacin (26-55 % de degradación) y la sulfametoxipiridazina (5-39 %) mostraron un comportamiento intermedio. La degradación de antibióticos tras el almacenamiento en congelación ya ha sido descrita previamente (Shaltout et al., 2019).

De acuerdo a los análisis cromatográficos, algunas de las muestras de amoxicilina y sulfametoxipiridazina (A1, A3, A4 y S3; Figura 1), experimentaron una degradación a niveles menores al LD de la técnica cromatográfica, pero seguían siendo positivas a Explorer<sup>®</sup>, lo que apuntaba a la presencia de actividad antibacteriana derivada de los compuestos de degradación de los antibióticos originales, que pasarían desapercibidos para la técnica cromatográfica empleada. Para confirmarlo, se llevaron a cabo los experimentos que se detallan a continuación.

2.1. Presencia de metabolitos de  $\beta$ -lactámicos biológicamente activos en muestras de carne naturalmente contaminadas con amoxicilina: detección basada en reconocimiento bioquímico estructural.

Para evaluar la presencia potencial de metabolitos activos de  $\beta$ -lactámicos en muestras de carne, se tomaron 4 muestras de carne procedentes del banco de muestras construido en 2018 por Serrano et al. (2020), caracterizadas por cromatografía HPLC-FLD en 2018, y se reanalizaron en 2021 con el test BTScan<sup>®</sup>. La Tabla 8 muestra cómo, a pesar de que el antibiótico se degradaba por completo tras 3 años de almacenamiento, seguían siendo capaces de inhibir el crecimiento del microorganismo diana del test Explorer<sup>®</sup>, no sólo en 2018, cuando se detectaban elevadas concentraciones, sino también en 2021, a concentraciones bajas incluso menores al LD del

Tabla 8. Análisis cromatográficos (HPLC-FLD) y resultados de Explorer<sup>®</sup> de 4 muestras de carne contaminadas con amoxicilina, obtenidos tras el análisis de estas muestras en 2018 y 2021, momento en el cual también se analizaron por BTScan<sup>®</sup>. Los valores numéricos están expresados en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , los resultados positivos con el símbolo +, y los resultados próximos al positivo, con el símbolo  $\pm$ .

Table 8. Chromatographic analyses (HPLC-FLD) and Explorer<sup>®</sup> results of 4 meat samples tainted with amoxicillin, obtained after the analysis of these samples in 2018 and 2021, when they were also analyzed by BTScan<sup>®</sup>. Numeric values are expressed in  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , positive results with the symbol +, and those results close to positive, with the symbol  $\pm$ .

	HPLC-FLD		Explorer <sup>®</sup>		BTScan <sup>®</sup> 1/5*
	2018	2021	2018	2021	2021
A1	2254	<LD**	+	+	+
A2	429	29	+	+	+
A3	532	<LD**	+	+	$\pm$
A4	72	<LD**	+	+	$\pm$

\* Puesto que la técnica está optimizada para el análisis de  $\beta$ -lactámicos en leche, para evitar el efecto matriz, se llevó a cabo una dilución 20/80 v/v de suero de carne en leche. Las muestras con resultados  $\pm$  se corresponden con muestras cuyos resultados encajan con la presencia de  $\beta$ -lactámicos, teniendo en cuenta el factor dilución 1/5.

\* LD. Límite de detección de la técnica cromatográfica.

QTOF, mientras que el análisis en tándem de estas muestras con BTScan® demostró la presencia de metabolitos de  $\beta$ -lactámicos en todas las muestras analizadas. Es necesario mencionar que el LD del test bioquímico está en torno a 15  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , ligeramente por encima al LD del QTOF (datos no mostrados), apuntando así hacia un correcto reconocimiento no sólo de la molécula parental sino de sus derivados que mantienen propiedades biológicas (detectadas por Explorer®) y estructurales (detectadas por BTScan®).

Estos hallazgos revelan la presencia de metabolitos biológicamente activos de amoxicilina en muestras de músculo, procedentes de su degradación durante el almacenamiento en congelación, y que podrían ser responsables de resultados positivos en tests de cribado de base biológica como Explorer®, incluso pasando desapercibidos para técnicas cromatográficas empleadas rutinariamente en control oficial, ya que están dirigidas a la detección específica de compuestos diana indicados por la legislación.

## 2.2. Detección de metabolitos de sulfamidas basada en inhibición competitiva de su actividad biológica.

Para comprobar la presencia de metabolitos de sulfamidas, se tomaron 8 muestras de carne procedentes del banco de muestras (Serrano et al., 2020), contaminadas con sulfamidas a concentraciones menores al LMR, y se analizaron con Explorer® antes y después de la adición de 50  $\text{g}/\text{mL}$  de pABA (FIL/IDF, 1991; Sanz et al., 2015). Hay que puntualizar que el test Explorer® ha sido validado para la detección de sulfamidas (Mata et al., 2014) y que los LDs son próximos a los LMRs establecidos por la legislación, oscilando entre 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . La Figura 2a ilustra la positividad de las muestras antes de la adición de pABA (valores de Explorer® acoplado a e-Reader® por encima del *cut-off* o valor del método por encima del cual una muestra se considera positiva) y cómo el efecto inhibitorio des-

apareció tras la adición de pABA ( $P \leq 0,05$ ), lo que es muestra de la competición de este compuesto con metabolitos biológicamente activos presentes en carne, presumiblemente procedentes de la degradación de la sulfamida original con la que se trataron a los animales que no se detectaron por la técnica cromatográfica dirigida.

Se demostró la presencia de metabolitos biológicamente activos de sulfamidas en muestras de músculo conservadas en congelación durante 3 años, procedentes de animales tratados con sulfamidas. Además, se re-analizaron 18 muestras de carne comercial recogidas en el presente estudio, positivas a Explorer® pero negativas de acuerdo a los análisis cromatográficos por QTOF, tras 4 y 8 meses mantenidas en congelación tras la compra. Después de 4 meses, únicamente 7 muestras siguieron siendo positivas al test biológico, mientras que solamente 4 siguieron siendo positivas tras 8 meses (S12-S14, Figura 2b). Con el objetivo de evidenciar la presencia de metabolitos en estas tres muestras, se añadió pABA, y se constató que su adición revertía el efecto inhibitorio ( $P \leq 0,05$ ) en 3 de las 4 muestras (S13 y S14), hecho que apunta a la presencia de metabolitos biológicamente activos de sulfamidas. La fiabilidad del pABA para revertir la inhibición de las sulfamidas sobre el test Explorer® se comprobó con la muestra S15, una muestra de carne comercial que, caracterizada por QTOF, contenía 82  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de sulfadiazina en el momento de su recogida, y positiva a Explorer® incluso tras 8 meses de almacenamiento en congelación, ya que la Figura 2 muestra la pérdida de la capacidad inhibitoria de la sulfamida tras la adición de pABA. Este hecho refuerza la hipótesis de la presencia en carne de metabolitos biológicamente activos procedentes de la degradación de sulfamidas como responsables de la inhibición del test Explorer®, y, por ende, potenciales causantes de positivos no detectados por cromatografía dirigida.

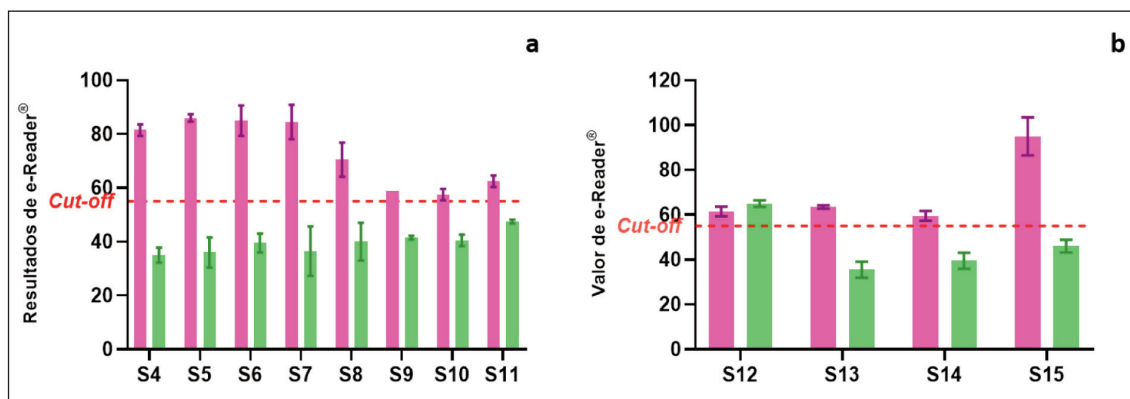


Figura 2. 2a. Resultados de Explorer® acoplado a e-Reader® tras el análisis de 8 muestras de carne de animales tratados con sulfametoxipiridazina procedentes del banco de muestras antes (■) y después (■) de la adición de pABA. La línea discontinua roja representa el *cut-off* del test Explorer® por encima del cual los resultados se consideran positivos. 2b. Resultados de Explorer® acoplado a e-Reader® tras el análisis de 4 muestras de carne comercial recogidas en este estudio antes (■) y después (■) de la adición de pABA. La línea discontinua roja representa el *cut-off* del test Explorer® por encima del cual los resultados se consideran positivos.

Figure 2. 2a. Explorer® coupled to e-Reader® results obtained after the analysis of 8 meat samples obtained from animals treated with sulfamethoxy pyridazine coming from the sample bank, before (■) and after (■) the addition of pABA. The red dotted line corresponds to the cut-off value of Explorer® test, over which results are considered positive. 2b. Explorer® coupled to e-Reader® results obtained after the analysis of 4 commercial meat samples collected in this study before (■) and after (■) the addition of pABA. The red dotted line corresponds to the cut-off value of Explorer® test, over which results are considered positive.

Estos hallazgos probaron la presencia en carne de metabolitos biológicamente activos procedentes de los antibióticos originales. Así pues, a pesar de que los análisis cromatográficos ofrecen la ventaja de la caracterización de las muestras en cuanto a la identificación y cuantificación del antibiótico presente en una muestra, su análisis no detecta la presencia de estos metabolitos debido a su carácter dirigido. Es por esto que los test biológicos de cribado ofrecen ciertos beneficios, puesto que son medida directa de la actividad biológica tanto de antibióticos como de sus metabolitos.

## Conclusiones

El análisis secuencial (cribado + confirmación) de 5.357 muestras de carne comercializada

del área transfronteriza España-Francia mostró un 3,6 % de muestras positivas al cribado mientras que los análisis cromatográficos dirigidos (QTOF) mostraron no conformidad en el 0,093 %, datos similares a los publicados por la EFSA para 2019. Las familias más detectadas fueron tetraciclinas, sulfamidas, quinolonas, lincomicina y  $\beta$ -lactámicos. Para explicar las diferencias entre el 3,6 % de positivos al cribado y el 0,093 % de no conformes detectadas por cromatografía, se llevaron a cabo experimentos adicionales que demostraron que estas muestras de carne, aun siendo conformes, contienen metabolitos biológicamente activos procedentes de la degradación del compuesto original, que detecta el test biológico Explorer® pero no la cromatografía dirigida, empleada en este estudio y utilizada en control oficial. Por consiguiente,

la elección del test para control de residuos antibióticos dependerá del objetivo del análisis. Cuando los requerimientos legales son prioridad, serán los análisis cromatográficos dirigidos a la detección de los compuestos marcador (Reglamento (UE) n° 37/2010) los de elección. Sin embargo, los metabolitos derivados de éstos escapan a su vigilancia, por lo que, si se busca ofrecer protección extra a los consumidores, los test biológicos de cribado de tipo biológico serán los de elección.

### Agradecimientos

El proyecto ha sido cofinanciado al 65 % por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Interreg V-A España, Francia, Andorra (POCTEFA 2014-2020). El objetivo de POCTEFA es reforzar la integración económica y social de la zona fronteriza España-Francia-Andorra. Su ayuda se concentra en el desarrollo de actividades económicas, sociales y medioambientales transfronterizas a través de estrategias conjuntas a favor del desarrollo territorial sostenible.

### Referencias bibliográficas

- Agreste (2020). La consommation de viande en France en 2019. Agreste, la statistique, l'évaluation et la prospective agricole. Synthèses conjoncturelles 39. Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. 9 pp.
- Brown K., Uwiera R.R., Kalmokoff M.L., Brooks S.P., Inglis G.D. (2017). Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49(1): 12-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.006>.
- De Haro M.P. (2015). Efecto de los aceites esenciales de plantas aromático-medicinales en la fase de transición de animales monogástricos. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Diana A., Santinello M., Penasa M., Scali F., Magni E., Alborali G.L., Bertocchi L., De Marchi M. (2020). Use of antimicrobials in beef cattle: an observational study in the north of Italy. *Preventive Veterinary Medicine* 81: 105032. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105032>.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority), EMA (European Medicines Agency) (2017). ECDC/EFSA/EMA Second Joint Report on the Integrated Analysis of the Consumption of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Humans and Food-Producing Animals. Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance. Analysis (JIACRA) Report. *EFSA Journal* 15: e04872. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4872>
- ECDC, EFSA, EMA (2021). Third joint inter agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food producing animals in the EU/EEA: JIACRA III 2016 2018. *EFSA Journal* 19(6): e06712. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6712>
- EFSA (European Food Safety Authority) (2021). Report for 2019 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *EFSA Supporting Publications* 18: 1997E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2021.EN-1997>
- EMA (European Medicines Agency) (2020). Categorisation of antibiotics for use in animals for prudent and responsible use. Disponible en: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/infographic-categorisation-antibiotics-use-animals-prudent-and-responsible-use\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/infographic-categorisation-antibiotics-use-animals-prudent-and-responsible-use_en.pdf) (Consultado: el 27 de abril de 2021)
- EMA (2021). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020. Trends from 2010 to 2020 – Eleventh ESVAC report, Publications Office of the European Union. 130 pp. <https://doi.org/10.2809/636389>
- Escribano Moriana J.C., Soto Cárdenas M.J., Tinoco Racero I. (2002). Sulfamidas. Cotrimoxazol. Quinolonas. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 8: 3887-3896. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(02\)70720-8](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(02)70720-8).



- EUROSTAT (2020). *Statistics Explained. Agricultural production – livestock and meat*. Disponible en: [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural\\_production\\_-\\_livestock\\_and\\_meat&oldid=427096#Meat\\_production](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural_production_-_livestock_and_meat&oldid=427096#Meat_production) (Consultado: 28 de octubre de 2021)
- FAO (2021). *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food Supply – Livestock and Fish Primary Equivalent*. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/CL> (Consultado: 29 de junio de 2021)
- FIL/IDF (International Dairy Federation) (1991). *Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products*. IDF Bulletin 258. Bruselas, Bélgica. 99 pp.
- Friedman M., Henika P.R., Mandrell R.E. (2002). *Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* 65(10): 1545-1560. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.10.1545>.
- Hamscher G., Pawelzick H.T., Höper H., Nau H. (2005). *Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(4): 861-868. <https://doi.org/10.1897/04-182R.1>.
- Kanerva M. (2013). *Meat consumption in Europe: Issues, trends and debates*. Artec-paper 187. Universität Bremen, Bremen, Alemania. 58 pp.
- MAPA (2019). *Informe del consume de alimentación en España 2019*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 674 pp. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/en/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe2019\\_v2\\_tcm38-540250.pdf](https://www.mapa.gob.es/en/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe2019_v2_tcm38-540250.pdf) (Consultado: 10 de octubre de 2021)
- Mata L., Sanz D., Razquin P. (2014). *Validation of the Explorer® 2.0 test coupled to e-Reader® for the screening of antimicrobials in muscle from different animal species*. *Food Additives & Contaminants: Part A* 31(9): 1496-1505. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.934303>.
- Omonijo F.A., Ni L., Gong J., Wang Q., Lahaye L., Yang C. (2018). *Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production*. *Animal Nutrition* 4(2): 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2021). *Antimicrobial resistance*. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (Consultado: 20 de noviembre de 2021).
- Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) nº 999/2001, (CE) nº 396/2005, (CE) nº 1069/2009, (CE) nº 1107/2009, (UE) nº 1151/2012, (UE) nº 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) nº 1/2005 y (CE) nº 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) nº 854/2004 y (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo (Reglamento sobre controles oficiales). *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. 95, de 7 de abril de 2017, pp. 1-142.
- Reglamento (UE) nº 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. 15, de 20 de enero de 2010, pp. 1-72.
- Reglamento (UE) 2019/1871 de la Comisión de 7 de noviembre de 2019 relativo a los valores de referencia para las sustancias farmacológicamente activas no autorizadas presentes en los alimentos de origen animal y por el que se deroga la Decisión 2005/34/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. 289, de 8 de noviembre de 2019, pp. 41-46.

- Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 de la Comisión, de 22 de marzo de 2021, relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo, y por el que se derogan las Decisiones 2002/657/CE y 98/179/CE. Diario Oficial de la Unión Europea, núm. 180, de 21 de mayo de 2021, pp. 84-109.
- Sanz D., Razquin P., Condón S., Juan T., Herráiz B., Mata L. (2015) Incidence of antimicrobial residues in meat using a broad spectrum screening strategy. *European Journal of Nutrition and Food Safety* 5: 156-165. <https://doi.org/10.9734/EJNFS/2015/13795>.
- Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65(5): 725-759. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>.
- Serrano M.J., Mitjana O., Bonastre C., Laborda A., Falceto M.V., García-Gonzalo D., Abilleira E., Elorduy J., Bousquet-Melou A., Mata L., Cordón S., Pagán R. (2020). Is blood a good indicator for detecting antimicrobials in meat? Evidence for the development of in vivo surveillance methods. *Antibiotics* 9(4): 175. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040175>.
- Serrano M.J., Elorduy J., Zabaleta I., Istamboulie G., González-Fandos E., Bousquet-Mélou A., Mata L., Aymard C., Martínez-Laorden A., Da Silva-Guedes J., Lacroix M., García-Gonzalo D., Condón S., Abilleira E., Pagán, R. (2022). Antimicrobial residue assessment in 5,357 commercialized meat samples from the Spain-France cross-border area: A new approach for effective monitoring. *Food Control* 138: 109033. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109033>.
- Shaltout F.A.E., Shatter M.A.E., Sayed N.F. (2019). Impacts of different types of cooking and freezing on antibiotic residues in chicken meat. *Journal of Food Science and Nutrition* 5: 045. <http://dx.doi.org/10.24966/FSN-1076/100045>.
- Smeti S., Hajji H., Mekki I., Mahouachi M., Atti, N. (2018). Effects of dose and administration form of rosemary essential oils on meat quality and fatty acid profile of lamb. *Small Ruminant Research* 158: 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.10.007>.
- Voundi S.O., Nyegue M., Lazar I., Raducanu D., Ndoye F.F., Stamate M., Etoa, F.X. (2015). Effect of essential oils on germination and growth of some pathogenic and spoilage spore-forming bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease* 12(6): 551-559. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1892>.
- Wang S., Zeng X., Yang Q., Qiao S. (2016). Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *International Journal of Molecular Sciences* 17(5): 603. <https://doi.org/10.3390/ijms17050603>.
- Zhou X., Wang J., Lu C., Liao Q., Gudda F.O., Ling W. (2020). Antibiotics in animal manure and manure-based fertilizers: Occurrence and ecological risk assessment. *Chemosphere* 255: 127006. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127006>.

(Aceptado para publicación el 16 de enero de 2024)

## Efecto del mucílago de cacao en la bioconservación de carnes

José Villarroel-Bastidas<sup>1</sup>, Jasson Gabriel Argüello-Rivadeneira<sup>2</sup>, Johnny Leonel Mendoza-Zambrano<sup>2</sup>, María de Guía Córdoba<sup>3</sup>, Alicia Rodríguez<sup>3</sup> y Alejandro Hernández<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> State Technical University of Quevedo (UTEQ), Faculty of Engineering and Production Sciences, Master's Degree in Food Processing, Quevedo, Ecuador.

<sup>2</sup> State Technical University of Quevedo (UTEQ), Faculty of Engineering and Production Sciences, Quevedo, Ecuador.

<sup>3</sup> Instituto Universitario de Investigación de Recursos Agrarios, Universidad de Extremadura. Av. de la Investigación s/n, 06006, Badajoz, España.

### Resumen

El mucílago de cacao es uno de los principales subproductos de la producción de cacao, caracterizado por su contenido en carbohidratos, proteínas y compuestos fenólicos. La microbiología del mucílago está compuesta por levaduras, bacterias acéticas y bacterias ácido lácticas, que posibilitan su empleo para controlar bacterias indeseables. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la extensión de la vida útil de carne refrigerada mediante la aplicación de mucílago de cacao de dos variedades (Fino de aroma y CCN-51), que fueron aplicados a diferentes tipos de carne (cerdo, pollo y vacuno) y evaluadas a los 1 y 7 días de almacenamiento a 4 °C. Para evaluar el efecto de los tratamientos se realizaron análisis fisicoquímicos (pH, acidez, humedad, dureza, capacidad de retención de agua, color), y análisis microbiológicos. Los resultados de la aplicación de los mucílagos mostraron un aumento del % de ácido láctico, la humedad, la capacidad de retención de agua, la luminosidad y el color amarillo (b\*) respecto a las carnes de cerdo, pollo y ternera sin mucílago. Además, se disminuyó la dureza y color rojo de las carnes (a\*). Respecto a los análisis microbiológicos, se observaron reducciones medias superiores a 2 log UFC/g del contenido en *Escherichia coli* y levaduras, mientras que las bacterias ácido lácticas presentaron ligeros incrementos. Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto la viabilidad de reutilizar el mucílago de cacao para extender la vida útil de diversas carnes refrigeradas.

**Palabras clave:** Revalorización, *Theobroma cacao*, *Escherichia coli*, vida útil.

### Effect of cocoa mucilage on the biopreservation of meats

#### Abstract

Cocoa mucilage is one of the main by-products of cocoa production, characterized by its content of carbohydrates, proteins, and phenolic compounds. The microbiology of mucilage is ruled by yeasts, acetic acid bacteria, and lactic acid bacteria, which enable its use to control undesirable bacteria. The objective of the present work was to evaluate the extension of the shelf-life of refrigerated meat by the

\* Autor para correspondencia: ahernandez@unex.es

Cita del artículo: Villarroel-Bastidas J., Argüello-Rivadeneira J.G., Mendoza-Zambrano J.L., Córdoba M.G., Rodríguez A., Hernández A. (2024). Efecto del mucílago de cacao en la bioconservación de carnes. ITEA-Información Técnica Económica Agraria 120(3): 269-287. <https://doi.org/10.12706/itea.2024.006>



application of cocoa mucilage of two varieties (Fino de aroma and CCN-51), which were applied to different types of meat (pork, poultry, and beef) and evaluated at 1 and 7 days of storage at 4 °C. To evaluate the effect of the treatments, physicochemical analyses (pH, acidity, humidity, hardness, water retention capacity, color) and microbiological analyses were carried out. The results of the application of mucilage showed an increase in % lactic acid, moisture, water holding capacity, brightness, and yellow color ( $b^*$ ) compared to pork, chicken, and beef without mucilage. In addition, the hardness and red color of the meats decreased ( $a^*$ ). With respect to microbiological analyses, average reductions of more than 2 log cfu/g in *Escherichia coli* and yeast content were observed, while lactic acid bacteria showed slight increases. The results of this work demonstrate the feasibility of reusing cocoa mucilage to extend the shelf-life of various refrigerated meats.

**Keywords:** Revalorization, *Theobroma cacao*, *Escherichia coli*, shelf life.

## Introducción

La carne es un alimento caracterizado por un alto contenido de proteínas, pH ligeramente ácido y una elevada actividad de agua. Esto la convierte en un excelente ambiente para el crecimiento de microorganismos, principalmente bacterias, que participan activamente en su alteración. El perfil microbiológico de la carne fresca, responsable principal de su alteración, es la suma de las aportaciones durante las operaciones de faenado, condiciones de almacenamiento, transporte y distribución (Signorini, 2007). La microflora de la carne está usualmente dominada por las bacterias ácido-lácticas (BAL). Además de las BAL, en los procesos de alteración de la carne se han identificado especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Carnobacterium*, *Brochothrix*, *Buttiauxella*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, entre otras (Doulgeraki et al., 2012). Entre los riesgos sanitarios asociados con el consumo de carne destaca la posibilidad de vehicular bacterias patógenas como *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* (Omer et al., 2018). Por otro lado, los atributos organolépticos de la carne fresca con más importancia para el consumidor son el color (intensidad y coloración), la apariencia (grasa intramuscular, exu-

dación), la jugosidad, el sabor y el aroma (Adamski et al., 2017); mientras que la industria centra más la atención en factores como pH, la capacidad de retención de agua (CRA), textura, y estabilidad oxidativa. Estos atributos están influenciados por factores como la raza, la edad, la dieta, el manejo *ante-mortem*, los procesos de matanza y las prácticas de manejo *post-mortem* (Tougan et al., 2013). Todos estos atributos deben ser mantenidos dentro de unos márgenes durante la vida útil de la carne, para lo cual se utilizan diferentes técnicas de conservación y/o prolongación de la vida útil. Entre las alternativas para prolongar la vida útil de los alimentos se encuentra la bioconservación o biopreservación, que es un método en el que se usan sustancias naturales provenientes de bacterias, hongos, plantas y animales para mantener la vida útil de los alimentos mientras garantizan su seguridad (Pisoschi et al., 2018; Barcenilla et al., 2022). En este sentido destacan las BAL, que son usadas como cultivos bioprotectores por su capacidad de producir ácido láctico y otros metabolitos que contrarrestan el crecimiento de bacterias no deseadas (Fiorentini et al., 2001). Entre los metabolitos producidos por las BAL destacan las bacteriocinas, que son péptidos antimicrobianos principalmente activos frente a microorganismos taxonómicamente emparentados, generalmente bacterias Gram positivas en el caso de las BAL (Parada et al.,

2007). Además, las BAL tienen la capacidad de inhibir a bacterias Gram negativas como *E. coli* y *Salmonella* mediante la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos (Volzing et al., 2013). El origen de las BAL empleadas en la bioconservación puede ser diverso, y estas, a su vez, pueden ser aplicadas directamente como cultivos purificados o mediante el empleo de materias fermentadas que las vehiculen. Este es el caso del mucílago del cacao (*Theobroma cacao* L.), uno de los principales subproductos en la producción del cacao. El mucílago o pulpa de cacao es una sustancia viscosa, generalmente hialina, blancuzca y azucarada que contienen las plantas de cacao recubriendo a las 30-50 semillas o almendras. Está compuesta por células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10-13 %), pentosas (2-3 %), ácido cítrico (1-2 %), y sales (8-10 %) (Neto et al., 2016). Además, presenta un interesante contenido en compuestos con actividad antioxidante y antimicrobiana como son los compuestos fenólicos (Martínez et al., 2012; Llerena et al., 2023). En la fermentación aeróbica que ocurre tras la separación de la vaina del cacao, conducida fundamentalmente por levaduras, BAL y bacterias ácido-acéticas (Almeida et al., 2020), el mucílago que rodea el grano de cacao se degrada por la acción de los microorganismos del medio ambiente natural (Rojo-Poveda et al., 2020), con la producción de metabolitos tales como etanol y ácidos orgánicos como el acético, cítrico, láctico, y oxálico (Amorim et al., 2017). Las BAL presentes en el mucílago de cacao producen bacteriocinas (Nandha y Sukla, 2023), brindando la oportunidad de ser utilizado como conservante alargando la vida útil de las carnes (Morante-Carriel et al., 2023).

Debido a los precedentes anteriores, el uso como bioconservantes de subproductos vegetales fermentados como el mucílago del cacao es una potencial alternativa para la conservación de la carne, contribuyendo a la

prolongación de la vida útil y su seguridad e higiene. Esta investigación se dirigió a la evaluación de la bioconservación de carnes de cerdo, pollo y ternera mediante la aplicación del mucílago de cacao de las dos variedades más importantes cultivadas en Ecuador (Fino de Aroma y CCN-51).

## **Materiales y métodos**

### **Material biológico**

Para el presente trabajo se utilizaron carnes de cerdo, pollo y ternera, obtenidas de supermercados locales de la región del cantón Quevedo (Ecuador). Estas carnes fueron refrigeradas a 4 °C hasta su uso, en un tiempo no superior a las 24 h. Se utilizó mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de aroma que se obtuvieron de la finca ubicada en el km 29 de la vía Buena Fe-Santo Domingo (Ecuador).

### **Bioconservación de la carne con la aplicación de mucílago de cacao**

Tras la recepción de las carnes, se realizó una selección y lavado para eliminar cualquier impureza. En el caso de la carne de cerdo (4 a 6 meses de engorde) se tomó la parte superior de la pierna trasera del cerdo. Para la carne de pollo de raza Broiler se tomó del muslo de pollo, cuyas edades se encuentran entre la sexta y séptima semana. Finalmente, para la investigación se trabajó con contrapata de ternera de la raza Brahman. Las edades de ternera estuvieron alrededor de 1,5 años. Posteriormente se aplicó agua purificada para eliminar residuos (grasa y sangre). Todos los cortes de cada especie fueron refrigerados a una temperatura de 4 °C durante un periodo de 24 h colocados sobre almohadillas absorbentes para evitar la proliferación de microorganismos. Una vez transcu-

rridas las 24 h se realizaron cortes de 7 cm de longitud por 4 cm de ancho y 0,5 cm de espesor a cada muestra. A cada corte se aplicó 100 mL de mucílago por un tiempo de 45 min. Posterior a esto, se llevó a refrigeración a 4 °C por un periodo de 7 días. Para los lotes control, se realizó cada uno de los pasos anteriores en los que únicamente se omitió la adición de mucílago de cacao.

Se realizaron combinaciones del mucílago entre variedades de cacao (CCN-51 y Fino de aroma), tiempo de conservación entre (1 y 7 días), a diferentes carnes (cerdo, pollo y ternera). Cada tratamiento se realizó por triplicado con un total de 54 unidades experimentales.

#### **Análisis fisicoquímicos del mucílago de cacao**

Todos los análisis se realizaron en tres muestras independientes. Para ello, se determinaron los siguientes parámetros:

##### *Determinación de pH del mucílago*

Se utilizó un potenciómetro o pH-metro marca HANNA modelo HI 98130.

##### *Determinación de la acidez titulable*

Se realizó la titulación de 10 mL de muestra con 0,1 N NaOH y utilizando fenolftaleína como indicador como porcentaje de ácido láctico. El % de acidez se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ acidez titulable} = (N \times V_{\text{NaOH}} \times \text{Factor ácido predominante}) / PM \times 100 \quad [1]$$

Donde  $V_{\text{NaOH}}$ : volumen gastado de hidróxido de sodio 0,1 N; PM: peso de muestra; Factor ácido dominantes: peso equivalente del ácido láctico 0,09 g/meq

##### *Sólidos solubles totales*

Se realizaron con el equipo Pocket Refractómetro de la marca ATAGO, y los resultados se expresaron en °Brix.

##### *Densidad*

Se utilizó un picnómetro. Los cálculos de la densidad se determinaron mediante la siguiente ecuación:

$$d = m_2 - m_1 / m_3 - m_1 \quad [2]$$

Donde  $d$ : densidad relativa a 20 °C;  $m_1$ : masa del picnómetro vacío (g);  $m_2$ : masa del picnómetro con la muestra (g);  $m_3$ : masa del picnómetro con agua destilada (g).

##### *Turbidez*

El equipo de turbidímetro 2100 AN la marca HACH. Los resultados se expresan en NTU. NTU/FNU.

##### *Sólidos en suspensión*

Se centrifugó 1 mL durante 5 min a 13.000 rpm. Antes de la centrifugación, la muestra se pesó en una balanza analítica. Después, se pesaron nuevamente para obtener el valor consumido durante la centrifugación.

##### *Colorimetría*

La medición del color se llevó a cabo por el método CIE  $L^*a^*b^*$  con un colorímetro marca CHROMA METER CR 400 donde  $L^*$  define la luminosidad,  $a^*$  define el componente de color rojo-verde, y  $b^*$  define el componente de color amarillo-azul.

##### *Transmitancia y Absorbancia*

Se utilizó un espectrofotómetro DR3900 HACH serie 1488262, con una longitud de onda de 460 nm.

### **Análisis fisicoquímicos de las carnes**

#### *Acidez titulable*

La determinación de acidez se realizó pesando 10 g de carne triturada y diluyéndola en 40 mL de agua destilada siguiendo el método descrito en la sección anterior.

#### *Determinación de pH*

Con la preparación descrita anteriormente se registró el pH en un potenciómetro de la marca OHAUS modelo STARTER 5000.

#### *Capacidad de retención de agua (CRA)*

La CRA se determinó mediante el método de Rengifo Gonzales y Ordóñez Gómez (2010). Para el cálculo de la CRA se aplicó la siguiente ecuación:

$$CRA \left( \frac{gH_2O \text{ retenida}}{100 g H_2O} \right) = \frac{(m_1 \times H) - (m_2 - m_3)}{m_1 \times H} \times 100 \quad [3]$$

Donde  $m_1$ : masa de la muestra (g);  $m_2$ : masa del papel de filtro húmedo (g);  $m_3$ : masa del papel de filtro seco (g); y H: contenido en humedad de la muestra (g de  $H_2O$ /g de muestra).

#### *Contenido de humedad*

se determinó aplicando la ecuación:

$$\% \text{Humedad} = \frac{(P1 + P2) - P3}{P2} \times 100 \quad [4]$$

Donde P1: Peso de la placa (g); P2: Peso de la muestra (g); y P3: Peso de la placa + Peso de la muestra.

#### *Colorimetría*

La medición de color se llevó a cabo por el método CIE  $L^*a^*b^*$  utilizando un colorímetro marca CHROMA METER CR 400.

#### *Textura (Dureza)*

Se utilizó el procedimiento de la American Meat Science Association por el método de Compresión y Punción. Se colocó la muestra en un Texturómetro SHIMADZU que es operado por el software TRAPEZIUM versión 1.4.0. Los valores de dureza fueron expresados en Newtons.

### **Análisis microbiológicos**

Se pesaron asépticamente 10 g de carne, que fueron mezclados con 90 mL de agua de peptona estéril. Seguidamente se hicieron las diluciones decimales en medio agua de peptona. Finalmente, se sembraron en superficie 100  $\mu$ L de cada dilución en Potato Dextrose Agar para la detección de levaduras, incubando las placas a 25 °C durante 5 días; en Gelose VRBL para la detección de coliformes totales incubando las placas a 37 °C durante 48 h, y MRS para la detección de BAL incubando las placas a 37 °C en anaerobiosis durante 48 h. Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como log UFC/g de carne.

### **Análisis estadístico**

El efecto de los tratamientos sobre los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos a los 1 y 7 días de almacenamiento se analizó mediante el análisis de varianza ANOVA de una, dos y tres vías. En caso de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, los grupos fueron establecidos mediante la prueba post hoc de Tukey. El intervalo de confianza utilizado para el análisis se fijó en el 95 %, lo que garantiza una evaluación fiable de la significación estadística de los resultados. Para el análisis estadístico de los datos se empleó el software Statgraphics centurion XVI.

## Resultados y discusión

### Caracterización del mucílago de cacao

En cuanto a las determinaciones fisicoquímicas del mucílago de cacao, recogidas en la Tabla 1, se puede observar que el mucílago Fino de Aroma presentó valores ligeramente superiores de pH (pH 4,31) que el mucílago CCN-51 (pH de 4,11). Estas diferencias en el pH estaban asociadas al porcentaje de acidez, en el que el mucílago Fino de Aroma presentó valores de 0,68 % mientras que CCN-51 presentó valores medios de acidez de 1,09 %. Respecto al contenido en sólidos solubles, el mucílago Fino de Aroma presentó mayores valores de sólidos solubles totales (15,50 °Brix) que el CCN-51 (11,30 °Brix), que se asociaron con la turbidez, en la que el mucílago Fino de

Aroma presentó valores superiores. Por el contrario, los sólidos en suspensión fueron 0,01 y 0,04 para los mucílagos Fino de Aroma y CC-51, respectivamente. Respecto a la densidad, se observaron valores superiores en el mucílago CCN-51 con valores de 1,49 g/L que Fino de Aroma con 1,08 g/L y turbidez con un valor inferior de 9,34. Respecto a los parámetros ópticos, el mucílago Fino de Aroma fue más luminoso (L\*) y con coloraciones más amarillas (b\*). Así, este mucílago presentó una tonalidad ámbar clara. Por su parte, el mucílago CCN-51 presentó una coloración más rojiza y menos luminosa, presentando una tonalidad ámbar oscura. En general, los valores observados concuerdan con los trabajos previos presentados por Balladares et al. (2016) y Guirlanda et al. (2021).

Tabla 1. Análisis fisicoquímicos del mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Fino de aroma.  
Table 1. Physicochemical analysis of cocoa mucilage of the varieties Fino de Aroma and CCN-51.

Análisis	Mucílago de Cacao	
	CCN-51	Fino de aroma
pH	4,16	4,31
Acidez Titulable (%)	1,09	0,68
°Brix	11,3	15,5
Densidad (g/L)	1,49	1,08
NTU Turbidez	9,34	16,71
Sólidos en suspensión	0,04	0,01
Colorimetría L*	34,85	46,06
Colorimetría a*	15,18	8,11
colorimetría b*	21,72	30,41
Transmitancia	0,6	0,1
Absorbancia	0,3	0,1



### **Análisis fisicoquímicos de las carnes de cerdo, pollo y ternera**

Entre los métodos para la prolongación de la conservación de la carne han proliferado los ensayos basados en la aplicación de conservantes de origen biológico. La bibliografía muestra múltiples aplicaciones de extractos fenólicos obtenidos de diferentes productos vegetales tal y como muestra la revisión de Munekata *et al.* (2020), y recubrimientos comestibles (Umaraw y Verna, 2017) en los que las principales aportaciones son el retraso de las reacciones de oxidación, los cambios de color y los cambios sensoriales, y el control de la población microbiana. La biopreservación de la carne mediante la aplicación de microorganismos es una técnica ampliamente investigada como demuestran la revisión de Barcenilla *et al.* (2022), en la que se destaca la idoneidad de las BAL para este fin. En el presente trabajo se propone la aplicación de un subproducto de la industria de obtención del cacao, el mucílago del cacao como método de bioconservación de carnes asociada a sus propiedades funcionales y microbiológicas (Silva *et al.*, 2014; Morante-Carriel *et al.*, 2023).

En la tabla 2 se muestra el efecto de los factores tipo de carne (cerdo, pollo, ternera), la variedad de mucílago de cacao (control, Fino de Aroma, y CCN-51) y el tiempo de conservación (1 día y 7 días) de las carnes almacenadas a 4 °C sobre los parámetros físico-químicos de la carne. Los resultados mostraron que las carnes no presentaron diferencias a nivel de pH, % acidez, y capacidad de retención de agua. Los pH observados fueron especialmente bajos, síntoma de una posible baja calidad higiénica de las carnes utilizadas (Signorini, 2007). Este bajo pH puede influir en otros parámetros, ya que se ha observado que la CRA disminuye a bajos pH y con ello aumenta la dureza de las carnes (Pethick *et al.*, 2005), además de influir en el color de la carne (Hamoen *et al.*, 2013). La aplicación de mucílago tuvo un efecto global sobre el

pH desigual, ya que la aplicación de Fino de Aroma provocó los pH medios estadísticamente superiores ( $p < 0,050$ ), mientras que CCN-51 los menores. Los resultados de pH y % de acidez de los tratamientos sobre las carnes se muestran en la figura 1. En cuanto a los valores de pH observados en el cerdo, tras 1 día a 4 °C se observó un valor de 4,61, que aumentó a 4,85 a los 7 días de conservación. La aplicación de mucílago Fino de Aroma modificó significativamente el pH tras su aplicación y tras 7 días de almacenamiento (4,92;  $p < 0,050$ ), mientras que la aplicación de mucílago CCN-51 conservó los valores de pH iniciales tras 7 días, sin diferencias con el control ( $p > 0,050$ ). Respecto al pH del pollo, tras 7 días de almacenamiento, los valores del pollo control descendieron hasta 4,65, siendo significativamente inferior al tratamiento con CCN-51 que presentó valores con 4,88 ( $p < 0,050$ ). Finalmente, en el pH de la ternera se observaron diferencias entre tratamientos a los 7 días de almacenamiento, en los que la ternera control presentó los mayores valores y la tratada con mucílago CCN-51 los menores ( $p < 0,050$ ). En general, los valores de pH observados en este trabajo fueron inferiores a los mostrados en la bibliografía, como los mostrados por Perlo *et al.* (2020) para carne de pollo. En cuanto a los resultados del porcentaje de acidez, en general no se observaron diferencias entre tratamientos y días de conservación, excepto en el caso de la ternera. Hay que señalar que el tratamiento con mucílago Fino de Aroma en la ternera aumentó los valores de acidez significativamente respecto al control tras 7 días de almacenamiento ( $p < 0,050$ ). Los valores de acidez fueron similares a los observados por León *et al.* (2018).

Las aplicaciones de mucílago aumentaron la humedad de las carnes, la CRA y disminuyeron la dureza media de las carnes (Tabla 2). Este último aspecto es interesante ya que las carnes con bajo pH suelen presentar una mayor dureza debido a la inhibición de las enzimas aso-

Tabla 2. Efecto de los factores carne, variedad de mucílago y tiempo de conservación sobre los parámetros físico-químicos de la carne de cerdo, pollo y ternera.  
 Table 2. Effect of meat type, mucilage variety and storage time on physico-chemical parameters in meats of pork, chicken and beef.

Factores niveles	pH		Acidez (% Ac. láctico)		Humedad (%)		CRA (%)		Dureza (N)		Luminosidad (L*)		Color rojo (a*)		Color amarillo (b*)	
	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
<b>Carne (C)</b>																
Cerdo	4,78 ± 0,14		0,143 ± 0,02		71,48 <sup>a</sup> ± 3,47		15,78 ± 5,08		1,41 ± 0,57		51,55 <sup>b</sup> ± 8,75		4,75 <sup>b</sup> ± 1,19		11,51 <sup>a</sup> ± 1,70	
Pollo	4,81 ± 0,16		0,141 ± 0,017		73,33 <sup>b</sup> ± 3,37		14,38 ± 5,06		1,72 ± 0,88		53,05 <sup>b</sup> ± 10,72		3,92 <sup>a</sup> ± 3,93		16,91 <sup>b</sup> ± 5,02	
Ternera	4,77 ± 0,12		0,141 ± 0,023		72,01 <sup>ab</sup> ± 2,85		13,54 ± 3,64		1,48 ± 0,65		46,02 <sup>a</sup> ± 7,48		6,01 <sup>c</sup> ± 1,44		10,66 <sup>a</sup> ± 2,40	
<b>Variedad mucílago (V)</b>																
Control	4,79 <sup>b*</sup> ± 0,14		0,130 <sup>a</sup> ± 0,017		70,87 <sup>a</sup> ± 1,71		11,47 <sup>a</sup> ± 1,75		2,05 <sup>b</sup> ± 0,53		45,95 <sup>a</sup> ± 8,02		5,61 <sup>b</sup> ± 1,62		11,98 <sup>a</sup> ± 1,54	
CCN51	4,72 <sup>a</sup> ± 0,19		0,156 <sup>b</sup> ± 0,016		72,59 <sup>ab</sup> ± 3,48		16,54 <sup>b</sup> ± 3,62		1,16 <sup>a</sup> ± 0,46		52,78 <sup>b</sup> ± 7,49		3,94 <sup>a</sup> ± 1,87		13,28 <sup>b</sup> ± 5,58	
Fino de Aroma	4,85 <sup>c</sup> ± 0,13		0,138 <sup>a</sup> ± 0,017		73,37 <sup>b</sup> ± 4,06		15,68 <sup>b</sup> ± 5,98		1,38 <sup>a</sup> ± 0,80		51,89 <sup>b</sup> ± 10,64		5,14 <sup>b</sup> ± 2,59		13,79 <sup>b</sup> ± 4,83	
<b>Tiempo de almacenamiento (T)</b>																
1 día	4,76 <sup>a</sup> ± 0,16		0,145 ± 0,022		71,60 <sup>a</sup> ± 3,38		14,74 ± 5,18		1,58 ± 0,77		50,65 ± 8,75		5,40 <sup>b</sup> ± 1,87		12,61 <sup>a</sup> ± 3,17	
7 días (%)	4,8 <sup>b</sup> ± 0,14		0,138 ± 0,016		72,95 <sup>b</sup> ± 3,08		14,39 ± 5,15		1,49 ± 0,68		49,77 ± 11,32		4,39 <sup>a</sup> ± 2,32		13,43 <sup>b</sup> ± 5,33	
<b>P-valores</b>																
<b>Pruebas de efectos</b>																
C	0,115		0,909		<b>0,043</b>		0,263		0,312		< <b>0,001</b>		< <b>0,001</b>		< <b>0,001</b>	
V	< <b>0,001</b>		< <b>0,001</b>		<b>0,005</b>		<b>0,001</b>		< <b>0,001</b>		< <b>0,001</b>		< <b>0,001</b>		< <b>0,001</b>	
T	<b>0,005</b>		0,055		<b>0,028</b>		0,754		0,616		0,406		< <b>0,001</b>		<b>0,006</b>	
C×V	<b>0,015</b>		<b>0,001</b>		<b>0,001</b>		0,178		0,729		< <b>0,001</b>		< <b>0,001</b>		< <b>0,001</b>	
C×T	< <b>0,001</b>		0,597		0,679		0,424		0,437		< <b>0,001</b>		< <b>0,001</b>		< <b>0,001</b>	
V×T	< <b>0,001</b>		<b>0,043</b>		< <b>0,001</b>		0,456		0,525		0,688		< <b>0,001</b>		< <b>0,001</b>	
C×V×T	< <b>0,001</b>		<b>0,014</b>		<b>0,021</b>		0,407		0,339		< <b>0,001</b>		< <b>0,001</b>		< <b>0,001</b>	

\* Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,050$ ) dentro de los factores.

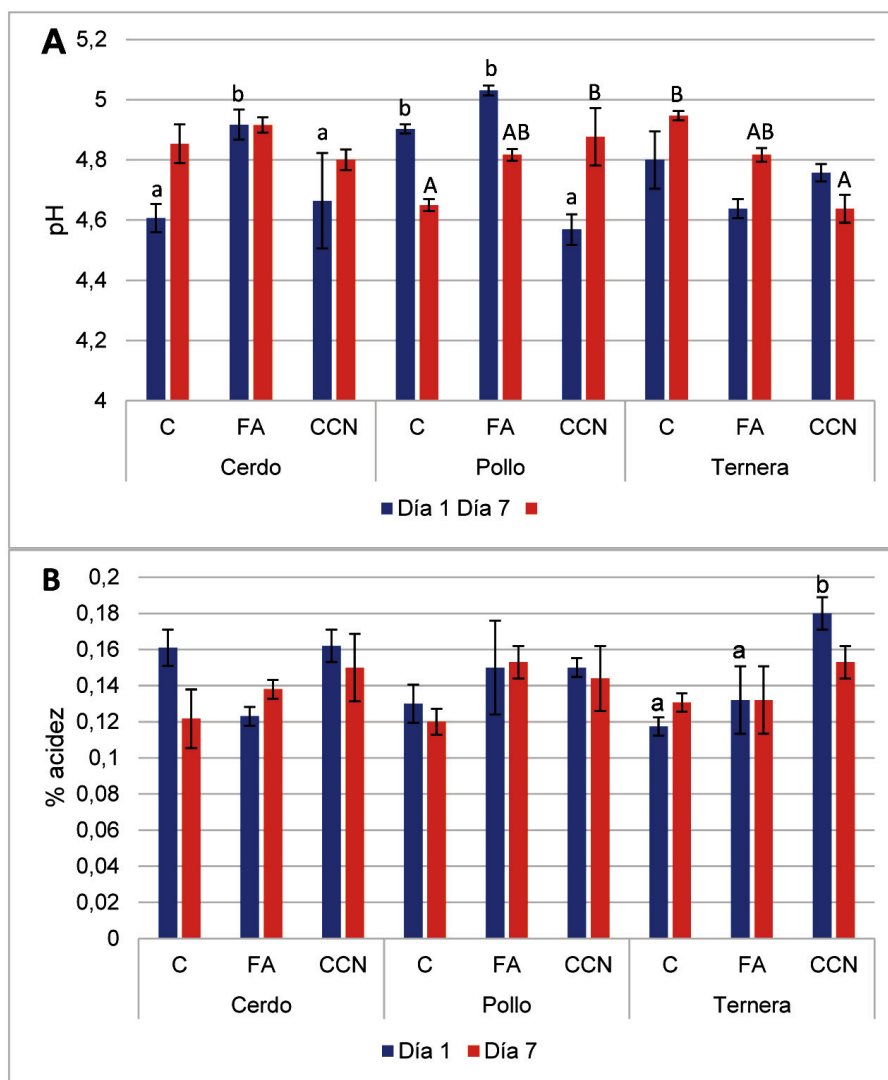


Figura 1. pH (A) y porcentaje de acidez (B) de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4 °C tras la aplicación de mucilago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

Figure 1. pH (A) and percentage acidity (B) of pork, chicken and beef meats stored for 7 days at 4 °C after the application of cocoa mucilage of Fino de Aroma (FA) and CCN-51 (CCN) varieties. Different letters indicate significant differences within each type of meat at 1 day of storage (lower case), and 7 days of storage (upper case).

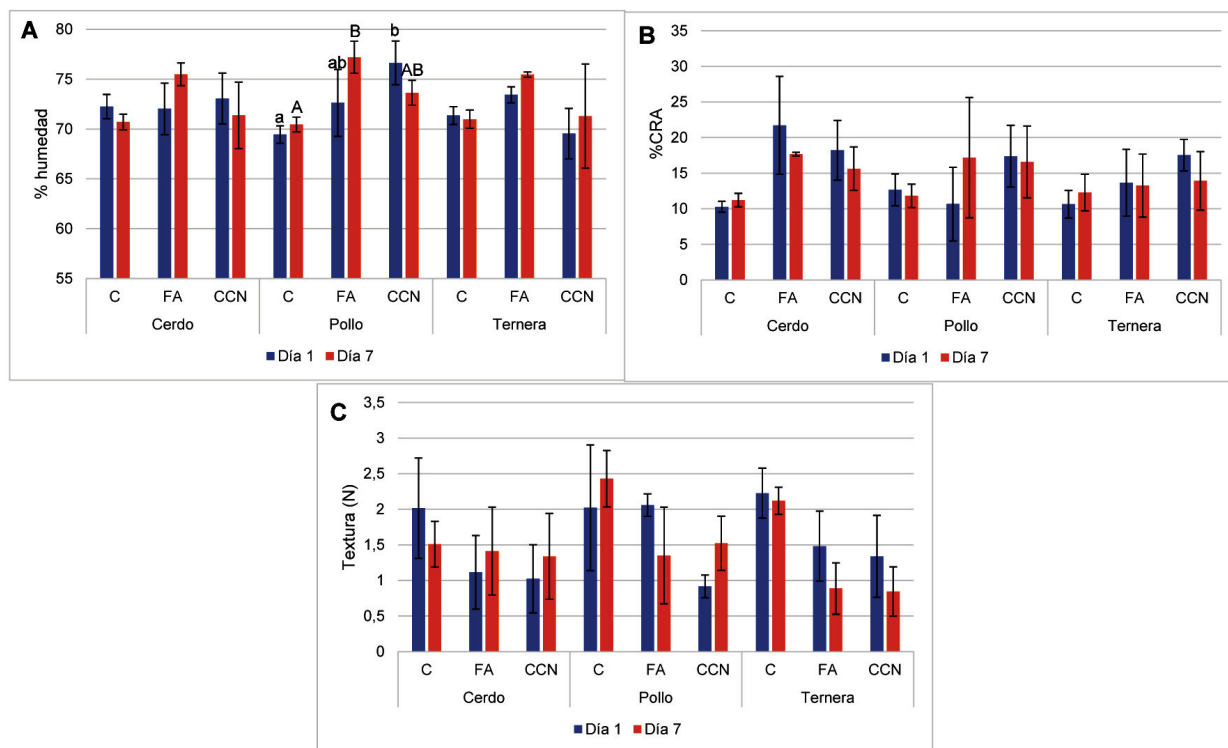


Figura 2. Porcentaje de humedad (A), porcentaje de capacidad de retención de agua (B) y textura expresada en Newtons (C) de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4 °C tras la aplicación de mucilago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

Figure 2. Percentage of moisture content (A), percentage of water-holding capacity (B) and texture expressed in Newtons (C) of pork, chicken and beef meats stored for 7 days at 4 °C after the application of cocoa mucilage of Fino de Aroma (FA) and CCN-51 (CCN) varieties. Different letters indicate significant differences within each type of meat at 1 day of storage (lower case), and 7 days of storage (upper case).

ciadas al ablandamiento de las carnes (Maltin et al., 2003). El mantenimiento de la humedad es un factor muy importante para la conservación de la carne ya que influye en otros parámetros como color, aroma y textura (Ahmad et al., 2015). El porcentaje de humedad, CRA y textura de las carnes con los diferentes tratamientos se muestran en la figura 2. El porcentaje de humedad de la carne de cerdo tras 1 día de almacenamiento fue de 72,3 % y se mantuvo tras 7 días de almacenamiento.

Los tratamientos con mucilago de cacao no modificaron significativamente este parámetro. En cuanto a la carne de pollo, la humedad fue de 69,5 % tras un día de almacenamiento y se mantuvo tras 7 días de almacenamiento. La aplicación de mucilago CCN-51 aumentó la humedad tras un día de almacenamiento hasta 76,3 % ( $p < 0,050$ ), mientras que la aplicación de mucilago Fino de Aroma provocó humedades significativamente superiores al control a los 7 días de almacenamiento con va-

lores medios de 77,2 % ( $p < 0,050$ ). Finalmente, no se observaron diferencias en la humedad en la carne de ternera, que presentó valores de 71,3 % en las carnes control. Estos valores son similares a los encontrados por Gou et al. (2003), Velasco et al. (2017) y Behbahani et al. (2021) para carnes de cerdo, pollo y ternera, respectivamente.

La CRA es uno de los parámetros más importantes en la calidad de la carne, ya que define la capacidad de mantener toda o parte de su agua. No se observaron diferencias en los tratamientos ni en los días de almacenamiento en las diferentes carnes. Los valores obtenidos se encuentran en el rango de 12 % y 23 % indicado por León et al. (2018), pero son inferiores a los indicados por Rengifo Gonzales y Ordoñez Gómez (2010) que se sitúan para la carne de cerdo, pollo y ternera por encima del 20 %. En cuanto al análisis de los tratamientos en las diferentes carnes (Figura 2B), aunque no se obtuvieron diferencias significativas, la aplicación de los mucílagos aumentó la CRA media de las carnes sin diferencias significativas ( $p > 0,050$ ).

La aplicación de mucílago de cacao en las diferentes carnes provocó un descenso de los valores medios de la textura, aunque sin diferencias significativas ( $p > 0,050$ ; Tabla 3). La carne de cerdo presentó una textura de 2,02 N tras un día de almacenamiento que descendió a 1,51 N tras 7 días a 4 °C. Los valores de textura tras la aplicación de los mucílagos se situaron en torno a 1,1 N tras un día de almacenamiento, y aumentaron ligeramente hasta aproximadamente 1,4 N a los 7 días. Respecto al pollo, la textura fue de 2,01 N en el primer muestreo y aumentaron los valores medios hasta 2,43 N. La aplicación de mucílago CCN-51 provocó descensos de textura hasta valores medios inferiores a 1 N, aumentando hasta 1,5 N a los 7 días. Respecto a la ternera, los controles presentaron valores superiores a 2 N, mientras que los tratamientos con mucílago presentaron va-

lores cercanos a 1,5 N tras un día de almacenamiento que descendieron a valores inferiores a 1 N a los 7 días.

Respecto a los parámetros ópticos, se puede observar en la tabla 2 que presentaron diferencias a nivel de los tres factores evaluados, además de presentar interacciones muy significativas entre los factores tanto para la luminosidad, color rojo, como color amarillo. La carne de ternera presentó los menores valores medios de luminosidad y los mayores de color rojo, mientras que la carne de pollo presentó las mayores intensidades de color amarillo ( $p < 0,001$ ). La aplicación de los mucílagos de cacao sobre las carnes provocó un aumento de la  $L^*$  de la carne del orden de 6 unidades, y la coordenada  $b^*$  del orden de dos unidades, mientras que disminuyó el color rojo alrededor de dos unidades en el caso del mucílago CCN-51 ( $p < 0,001$ ). Los valores obtenidos en la carne de cerdo tanto del tratamiento control como de las aplicaciones de mucílago de cacao están dentro de los parámetros observados por Qiao et al. (2007) y Olivas et al. (2017), aunque se indica que se encuadran en parámetros de carnes pálidas, blandas y exudativas (PSE). Del mismo modo, el incremento de la luminosidad de las carnes de pollo tras la aplicación de los mucílagos presenta valores similares a los observados por Velasco et al. (2017 y 2018), aunque la disminución de la coordenada  $a^*$  y el incremento de la coordenada  $b^*$  confieren un color amarillento a los muslos. En el caso de la carne de vacuno, los resultados obtenidos muestran que las carnes presentaban características PSE o pálidas, blandas y exudativas (Salinas Labra et al., 2020) asociado probablemente a un enfriamiento lento de las mismas (Ngapo et al., 2017). En el estudio de Salinas Labra et al. (2020) determinaron que el parámetro  $L^*$  fue el mejor para correlacionar la calidad de la carne con la apreciación de los consumidores y panelistas entrenados. A pesar de las modificaciones otorgadas por la apli-

Tabla 3. Recuentos globales expresados de levaduras, *Escherichia coli* y bacterias ácido-lácticas en función de los factores tipo de carne, variedad de mucílago y tiempo de refrigeración a 4 °C.

Table 3. Mean overall counts of yeasts, *Escherichia coli* and lactic acid bacteria as a function of the factors type of meat, variety of mucilage and refrigeration time at 4 °C.

Factores	Levaduras (Log UFC/g)		<i>E. coli</i> (Log UFC/g)		BAL (Log UFC/g)	
	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
<b>niveles</b>						
<b>Carne (C)</b>						
Cerdo	5,29* ± 1,39		5,35 <sup>b</sup> ± 0,91		5,68 <sup>b</sup> ± 0,26	
Pollo	5,16 ± 1,38		5,24 <sup>b</sup> ± 1,07		5,39 <sup>a</sup> ± 0,27	
Ternera	5,38 ± 1,23		4,88 <sup>a</sup> ± 1,26		5,78 <sup>c</sup> ± 0,34	
<b>Variedad mucílago (V)</b>						
Control	>6,47 <sup>c</sup> ± 0,00		>6,47 <sup>b</sup> ± 0,00		5,51 <sup>a</sup> ± 0,26	
CCN51	4,32 <sup>a</sup> ± 1,31		4,51 <sup>a</sup> ± 0,89		5,68 <sup>b</sup> ± 0,39	
Fino de Aroma	5,06 <sup>b</sup> ± 1,06		4,48 <sup>a</sup> ± 0,39		5,66 <sup>b</sup> ± 0,32	
<b>Tiempo de almacenamiento (T)</b>						
1 día	4,99 <sup>a</sup> ± 1,55		5,02 <sup>a</sup> ± 1,11		5,53 <sup>a</sup> ± 0,37	
7 días (%)	5,58 <sup>b</sup> ± 0,96		5,29 <sup>b</sup> ± 1,07		5,72 <sup>b</sup> ± 0,27	
<b>P-valores</b>						
<b>Pruebas de efectos</b>						
C	0,546		<0,001		<0,001	
V	<0,001		<0,001		<0,001	
T	0,001		0,002		<0,001	
C×V	0,001		0,001		<0,001	
C×T	0,053		0,003		0,457	
V×T	<0,001		0,040		<0,001	
C×V×T	<0,001		<0,001		<0,001	

\* Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,050$ ) dentro de los factores.

cación del mucílago de cacao a la carne de ternera, especialmente por la aplicación de Fino de Aroma, las carnes estarían dentro de los estándares normales de la carne. La aplicación de recubrimientos en la carne tiene un efecto preservador del color asociado al man-

tenimiento de la humedad y a la permeabilidad de los gases (Cardoso et al., 2016). En este sentido, la aplicación de mucílago de cacao tiene un efecto de mantenimiento de la humedad además de una riqueza en compuestos antioxidantes (Silva et al., 2014) que

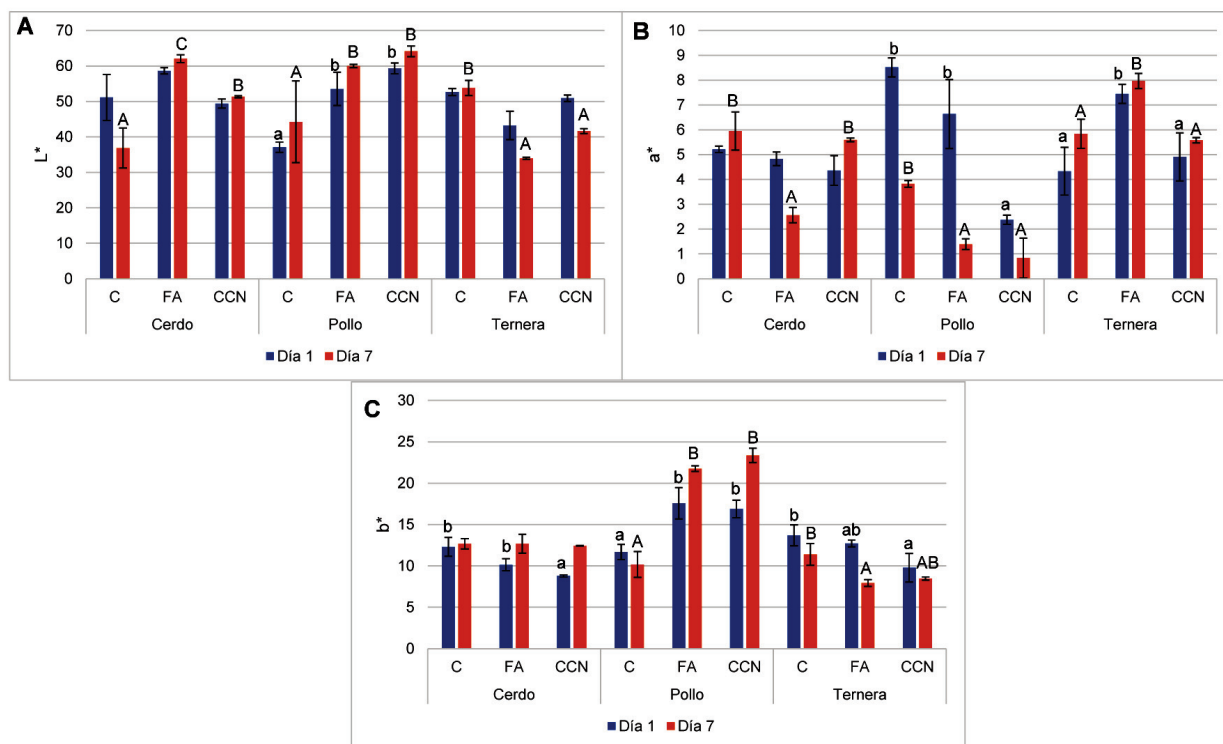


Figura 3. Luminosidad ( $L^*$ ) (A), eje rojo-verde ( $a^*$ ) (B) y eje amarillo-azul ( $b^*$ ) (C) de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4 °C tras la aplicación de mucilago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).  
 Figure 3. Luminosity ( $L^*$ ) (A), red-green axis ( $a^*$ ) (B) and yellow-blue axis ( $b^*$ ) (C) of pork, chicken and beef meats stored for 7 days at 4 °C after application of cocoa mucilage of Fino de Aroma (FA) and CCN-51 (CCN) varieties. Different letters indicate significant differences within each type of meat at 1 day of storage (lower case), and 7 days of storage (upper case).

pueden favorecer el mantenimiento del color. El análisis de los tratamientos de los parámetros ópticos presentado en la Figura 3, muestra como la luminosidad de la carne de cerdo y pollo se vio favorecida por la aplicación de los mucílago de cacao, especialmente tras 7 días de almacenamiento ( $p < 0,050$ ). Sin embargo, la aplicación de los mucílago restó luminosidad a las carnes de ternera, presentando valores inferiores a los 7 días respecto al control ( $p < 0,050$ ). Estos resultados son coincidentes con las observa-

ciones en aplicaciones de recubrimientos comestibles en carne de ternera (Cardoso et al., 2016). Respecto al espectro de color rojo, se puede observar como todas las carnes se situaron entre 2 y 9 unidades. En las aplicaciones de mucílago sobre las carnes de cerdo y pollo se observó un descenso del color rojo tras 7 días de almacenamiento, mientras que en la ternera se observó un mantenimiento de este parámetro. Finalmente, con respecto a la coloración amarilla, se puede observar como la carne de pollo presentó valores su-

periores a las otras dos carnes. Además, se puede observar como la aplicación de los mucílagos aumentó este parámetro en los dos días de muestreo evaluados ( $p < 0,050$ ).

### **Análisis microbiológicos**

La composición de la población microbiana durante la fermentación del cacao ha sido caracterizada en los trabajos de Morante-Carriell et al. (2023) y Pacheco-Montealegre et al. (2020). La fermentación del cacao está dominada por levaduras productoras de etanol como *Pichia kudriavzevii* y *S. cerevisiae*, entre otras. Entre las BAL, se han descrito *Leuconostoc pseudomesenteroides* (fermentadoras de glucosa y fructosa), *Fructobacillus tropaeoli* (fermentadora de fructosa), *Lactiplantibacillus plantarum* (fermentadora de fructosa y glucosa) *Lactococcus* spp. y *Limosilactobacillus fermentum* (productora de manitol), entre otras. Entre las enterobacterias, se han encontrado *Tatumella saanichen-sis* y *Tatumella punctata* presentes en la fase inicial de la fermentación. Otro grupo dominante son las bacterias acéticas, destacando las especies *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter ghanensis/syzygii*, que aparecen en las etapas finales de la fermentación y transforman el etanol en ácido acético.

La población de BAL descrita en fermentación del cacao ha sido ampliamente caracterizada respecto a su actividad antimicrobiana asociada al metabolismo de los azúcares y la producción de bacteriocinas y otras sustancias activas. Así, Rocchetti et al. (2021) han revisado los mecanismos antimicrobianos de *Lactiplantibacillus plantarum*; Pakroo et al. (2022) y Enan et al. (2013) han caracterizado la actividad de *Limosilactobacillus fermentum* y *Lactococcus* sp., respectivamente, frente a bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli*. Por lo tanto, el mucílago de cacao es una fuente de diversas cepas anti-

microbianas que pueden ser aplicadas en la bioconservación de carnes tal y como han demostrado Morante-Carriell et al. (2023).

En la tabla 3 se muestra el efecto de los factores tipo de carne, variedad de mucílago y tiempo de conservación sobre los recuentos de levaduras, *E. coli* y BAL. En general los recuentos microbiológicos observados en los tres tipos de carnes fueron elevados probablemente asociados a un mal faenado de la carne o a un periodo prolongado de conservación previo a la adquisición (Signorini et al., 2018; Solórzano et al., 2019). Los valores medios globales de recuentos de levaduras, *E. coli* y BAL se situaron, en todas las carnes, cercanos o superiores a 5 log UFC/g. El efecto antimicrobiano de los mucílagos pudo observarse tanto en los recuentos de levaduras como *E. coli*, mientras que en las BAL los recuentos fueron significativamente superiores en las aplicaciones de mucílago ( $p < 0,050$ ). En el caso de las levaduras, los controles presentaron valores medios globales superiores a 6 log UFC/g, mientras que los valores obtenidos con los mucílagos se sitúan en reducciones medias de 1,5 log UFC/g ( $p < 0,050$ ). Por su parte, los recuentos de *E. coli* de los controles fueron reducidos en más de 2 log UFC/g tras la aplicación de los mucílagos ( $p < 0,050$ ). En la figura 4 se muestra como la aplicación de los mucílagos de cacao redujo los recuentos de levaduras en todas las carnes, con niveles de reducción comprendidos entre aproximadamente 0,5 log UFC/g en la carne de ternera tras 7 días de almacenamiento con el mucílago Fino de Aroma y 4 log UFC/g para la carne de cerdo tras 1 día de almacenamiento con el mucílago CCN-51. En el caso de las bacterias coliformes, presentaron reducciones tras la aplicación de mucílago de cacao entre aproximadamente 1 log UFC/g de la carne de pollo tras 7 días de refrigeración con el mucílago CCN-51 y 3 log UFC/g de los tratamientos con mucílago CCN-51 en carne de ternera tras 7 días de almacenamiento. Estos niveles de reducción son



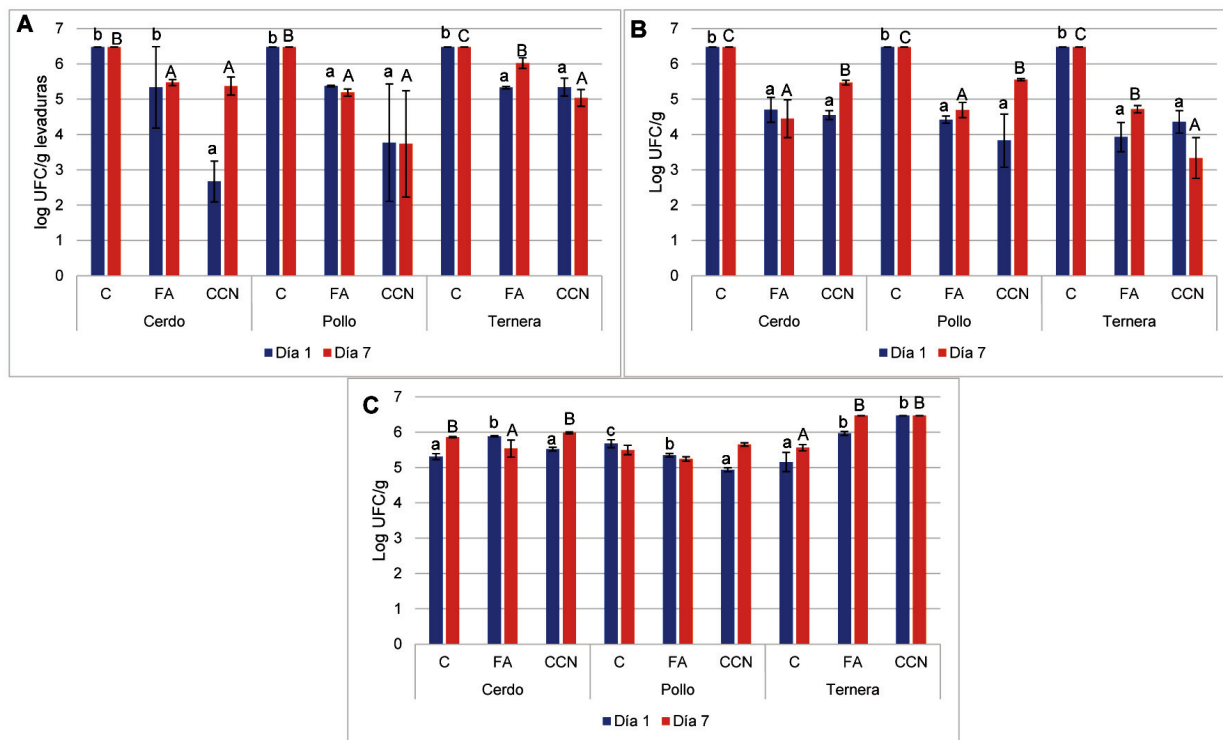


Figura 4. Recuentos de levaduras (A), coliformes (B) y bacterias ácido-lácticas (C) expresadas en log UFC/g de las carnes de cerdo, pollo y ternera conservadas durante 7 días a 4 °C tras la aplicación de mucilago de cacao de las variedades Fino de Aroma (FA) y CCN-51 (CCN). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tipo de carne a 1 día de almacenamiento (minúsculas), y 7 días de almacenamiento (mayúsculas).

Figure 4. Yeast (A), coliforms (B) and lactic acid bacteria (C) counts expressed in log CFU/g of pork, chicken and beef meats stored for 7 days at 4 °C after the application of cocoa mucilage of Fino de Aroma (FA) and CCN-51 (CCN) varieties. Different letters indicate significant differences within each type of meat at 1 day of storage (lower case), and 7 days of storage (upper case).

similares a los obtenidos con recubrimientos comestibles con mucilago de semillas de *Malva silvestris* que contenía 2 % de aceite esencial de cinamomo (Sabahi et al., 2022) y superiores a los obtenidos con el recubrimiento de mucilago de semilla de *Plantago major* enriquecido con 2 % de aceite esencial

de limón (Noshad et al., 2021). En cuanto a los resultados de los recuentos de BAL, se puede observar cómo en todos los tratamientos se situaron por encima de los 5 log UFC/g, encontrando que tras la aplicación de los mucilagos los niveles de BAL se incrementaron en las carnes de ternera.

## Conclusiones

La aplicación de mucílago de cacao de las dos variedades más cultivadas en Ecuador, Fino de Aroma y CCN-51, a carnes de cerdo, pollo y ternera modifica las características físico-químicas de la carne almacenada en refrigeración, aumentando el contenido en ácido láctico, la humedad, capacidad de retención de agua y parámetros ópticos, y disminuyendo la textura. Sin embargo, las diferencias encontradas, aunque significativas, no fueron muy relevantes en cuanto a sus magnitudes. En concreto, en los parámetros ópticos las modificaciones en la luminosidad y color rojo de las carnes de ternera y pollo podrían modificar la aceptación por parte del consumidor. En futuros trabajos será necesario evaluar el impacto sensorial de la aplicación de mucílago de cacao sobre las diferentes carnes refrigeradas.

El aspecto más relevante de la aplicación de mucílago de cacao sobre las carnes fue la capacidad de reducir en más de dos unidades logarítmicas los recuentos de microorganismos indeseables como *E. coli* y levaduras, probablemente asociado a las bacterias ácido-lácticas naturalmente presentes en el mucílago del cacao. Estos niveles de reducción justifican el potencial empleo del mucílago del cacao como bioconservante, con lo cual se contribuiría a la reducción del impacto ambiental que supone la gestión de este subproducto y podría mejorar la economía de los agricultores productores de cacao en Ecuador.

## Agradecimientos

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por permitirme ingresar la cesión de los laboratorios para el desarrollo de la investigación.

## Referencias bibliográficas

- Adamski M., Kuzniacka J., Milczewska N. (2017). Preferences of consumers for choosing poultry meat. *Polish Journal of Natural Sciences* 32(2): 261-271.
- Ahmad S.R., Gokulakrishnan P., Giriprasad R., Yattoo M.A. (2015). Fruit-based natural antioxidants in meat and meat products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(11): 1503-1513. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.701674>
- Almeida O.G.G., Pinto U.M., Matos C.B., Frazilio D.A., Braga V.F., von Zeska-Kress M.R., De Martinis E.C.P. (2020). Does quorum sensing play a role in microbial shifts along spontaneous fermentation of cocoa beans? An *in silico* perspective. *Food Research International* 131: 109034. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109034>
- Amorim G., Reis de Araujo Q., René-Valle R., Andrade-Sodré G., Moreira de Souza S.M. (2017). Influencia de factores agroambientales sobre la calidad del clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) PH-16 en la región cacaotera de Bahia, Brasil. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 4(12): 579-587. <https://doi.org/10.19136/era.a4n12.1274>
- Balladares C., Chóez-Guaranda I., García J., Sosa D., Pérez S., González J.E., Viteri R., Barragán A., Quijano-Avilés M., Manzano P. (2016). Physicochemical characterization of *Theobroma cacao* L. sweatings in Ecuadorian coast. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 28(10): 741-745. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-02-187>
- Barcenilla C., Ducic M., López M., Prieto M., Álvarez-Ordóñez A. (2022). Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Science* 183: 108661. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108661>
- Behbahani B.A., Falah F., Vasiee A., Tabatabaee Yazdi F. (2021). Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidium perfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. *Food Science & Nutrition* 9(5): 2458-2467. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2186>

- Cardoso G.P., Dutra M.P., Fontes P.R., Ramos A.D.L.S., de Miranda Gomide L.A., Ramos E.M. (2016). Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail display. *Meat Science* 114: 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.012>
- Doulgeraki A.I., Ercolini D., Villani F., Nychas G.J.E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology* 157(2): 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>
- Enan G., Abdel-Shafi S., Ouda S., Negm S. (2013). Novel antibacterial activity of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* Z<sub>11</sub> isolated from zabady. *International Journal of Biomedical Science* 9(3): 174-180.
- Florentini Â.M., Sant'Anna E.S., Porto A.C.S., Mazo J.Z., Franco B.D.G.M. (2001). Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. *Brazilian Journal of Microbiology* 32(1): 42-46. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000100010>
- Gou P., Comaposada J., Arnau J. (2003). NaCl content and temperature effects on moisture diffusivity in the *Gluteus medius* muscle of pork ham. *Meat Science* 63(1): 29-34. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00048-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00048-7)
- Guirlanda C.P., da Silva G.G., Takahashi J.A. (2021). Cocoa honey: Agro-industrial waste or underutilized cocoa by-product? *Future Foods* 4: 100061. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100061>
- Hamoen J.R., Vollebregt H.M., Van Der Sman R.G.M. (2013). Prediction of the time evolution of pH in meat. *Food Chemistry* 141(3): 2363-2372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.127>
- León M., Orduz A., Velandia, M. (2018). Composición fisicoquímica de la carne de ovejo, pollo, res y cerdo. @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria 15(2): 62-75. <https://doi.org/10.24054/16927125.v2.n2.2017.2969>
- Llerena W.M., Samaniego I., Vallejo C., Arreaga A., Zhunio B., Coronel Z., Quiroz J., Angós I., Carrillo W. (2023). Profile of bioactive components of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by-products from Ecuador and evaluation of their antioxidant activity. *Foods* 12: 2583. <https://doi.org/10.3390/foods12132583>
- Maltin C., Balcerzak D., Tilley R., Delday M. (2003). Determinants of meat quality: tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society* 62(2): 337-347. <https://doi.org/10.1079/PNS2003248>
- Martínez R., Torres P., Meneses M.A., Figueroa J.G., Pérez-Álvarez J.A., Viuda-Martos M. (2012). Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International* 49(1): 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.005>
- Morante-Carriel L., Abasolo F., Bastidas-Caldes C., Paz E.A., Huaquipán R., Díaz R., Valdés M., Cancino D., Sepúlveda N., Quiñones J. (2023). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from cocoa mucilage and meat: exploring their potential as biopreservatives for beef. *Microbiology Research* 14(3): 1150-1167. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14030077>
- Munekata P.E.S., Rocchetti G., Pateiro M., Lucini L., Domínguez R., Lorenzo J.M. (2020). Addition of plant extracts to meat and meat products to extend shelf-life and health-promoting attributes: An overview. *Current Opinion in Food Science* 31: 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.003>
- Nandha M.C., Shukla R.M. (2023). Exploration of probiotic attributes in lactic acid bacteria isolated from fermented *Theobroma cacao* L. fruit using *in vitro* techniques. *Frontiers in Microbiology* 14: 1274636. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1274636>
- Neto B.A., Bonomo R.C.F., Fontan R.D.C.I., Ferreira A.C.R., Gonçalves G.R.F., Mello D.L.N. (2016). Physicalchemical characterization and thermophysical properties of cocoa honey. *Revista Geintec: Gestao, Inovacao e Tecnologias* 6(1): 2944-2953. <https://doi.org/10.7198/S2237-0722201600010016>
- Ngapo T.M., Braña Varela D., Rubio Lozano M.S. (2017). Mexican consumers at the point of meat purchase. *Beef choice*. *Meat Science* 134: 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.07.013>
- Noshad M., Alizadeh Behbahani B., Jooyandeh H., Rahmati Joneidabad M., Hemmati Kaykha M.E.,

- Ghods Sheikhan M. (2021). Utilization of *Plantago major* seed mucilage containing *Citrus limon* essential oil as an edible coating to improve shelf life of buffalo meat under refrigeration conditions. *Food Science & Nutrition* 9(3): 1625-1639. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2137>
- Olivas J.A., Díaz-Tenorio L.M., Munguía-Xóchihua J.M., Molina-Barrios R.M., Hernández-Chávez J.F. (2017). Indicadores de calidad en carne de cerdo de diferentes centros comerciales de Ciudad Obregón, Sonora. *Nacameh* 11(2): 50-51.
- Omer M.K., Álvarez-Ordoñez A., Prieto M., Skjerve E., Asehun T., Alvseike O.A. (2018). A systematic review of bacterial foodborne outbreaks related to red meat and meat products. *Foodborne Pathogens and Disease* 15(10): 598-611. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2393>
- Pacheco-Montealegre M.E., Dávila-Mora L.L., Botero-Rute L.M., Reyes A., Caro-Quintero A. (2020). Fine resolution analysis of microbial communities provides insights into the variability of cocoa bean fermentation. *Frontiers in Microbiology* 11: 650. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00650>
- Pakroo S., Tarrah A., Takur R., Wu M., Corich V., Giacomini A. (2022). *Limosilactobacillus fermentum* ING8, a potential multifunctional non-starter strain with relevant technological properties and antimicrobial activity. *Foods* 11(5): 703. <https://doi.org/10.3390/foods11050703>
- Parada J.L., Caron C.R., Medeiros A.B.P., Soccol C.R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50: 512-542. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000300018>
- Perlo F.M., Fabre R., Bonato P., Jenko C., Tisocco O., Teira G. (2020). Uso de extracto de romero y ácido ascórbico en la conservación refrigerada de carne de cerdo. *Ciencia, Docencia y Tecnología* 31(60): 208-227. <https://doi.org/10.33255/3160/738>
- Pethick D.W., Fergusson D.M., Gardner G.E., Hocquette J.F., Thompson J.M., Warner R. (2005). Muscle metabolism in relation to genotypic and environmental influences on consumer defined quality of red meat. 55th Annual Meeting of the European Association for Animal Protection, 5-9 de mayo, Bled, Slovenia. pp. 95-110.
- Pisoschi A.M., Pop A., Georgescu C., Turcu V., Olah N.K., Mathe E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry* 143: 922-935. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>
- Qiao J., Wang N., Ngadi M.O., Gunenc A., Monroy M., Gariépy C., Prasher S.O. (2007). Prediction of drip-loss, pH, and color for pork using a hyperspectral imaging technique. *Meat Science* 76(1): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.06.031>
- Rengifo Gonzales L.I., Ordoñez Gómez E.S. (2010). Efecto de la temperatura en la capacidad de retención de agua y pH en carne de res, cerdo, pollo, ovino, conejo y pescado paco. *Revista ECI Perú* 7(2): 77-85. <https://revistaeciperu.com/wp-content/uploads/2019/01/20100024.pdf>
- Rocchetti M.T., Russo P., Capozzi V., Drider D., Spano G., Fiocco D. (2021). Bioprospecting antimicrobials from *Lactiplantibacillus plantarum*: Key factors underlying its probiotic action. *International Journal of Molecular Sciences* 22(21): 12076. <https://doi.org/10.3390/ijms222112076>
- Rojo-Poveda O., Barbosa-Pereira L., Zeppa G., Stévigny C. (2020). Cocoa bean shell-a by-product with nutritional properties and biofunctional potential. *Nutrients* 12(4): 1123. <https://doi.org/10.3390/nu12041123>
- Sabahi S., Abbasi A., Mortazavi S.A. (2022). Characterization of cinnamon essential oil and its application in *Malva sylvestris* seed mucilage edible coating to the enhancement of the microbiological, physicochemical and sensory properties of lamb meat during storage. *Journal of Applied Microbiology* 133(2): 488-502. <https://doi.org/10.1111/jam.15578>
- Salinas Labra S., Rubio Lozano M.S., Braña Varela D., Méndez Medina R.D., Delgado Suárez E.J. (2020). Desarrollo y validación de un patrón visual para la evaluación del color de la carne de bovino en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 11(2): 479-497.
- Signorini M. (2007). Microbiología de carnes envasadas al vacío y la biopreservación como medio para prolongar la vida de anaquel. *Nacameh* 1: 26-40.

- Signorini M., Costa M., Teitelbaum D., Restovich V., Brasco H., García D., Superno V., Petrolí S., Bruzzone M., Arduini V., Vanzini M., Sucari A., Suberbie G., Marice T., Rodríguez R., Leotta G.A. (2018). Evaluation of decontamination efficacy of commonly used antimicrobial interventions for beef carcasses against Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Meat Science* 142: 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.009>
- Silva E.N.D., Ramos D.D.C., Menezes L.M., Souza A.O.D., Lannes S.C.D.S., Silva M.V.D. (2014). Nutritional value and antioxidant capacity of "cocoa honey" (*Theobroma cacao* L.). *Food Science and Technology* 34: 755-759. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6447>
- Solórzano J.V.S., Bravo Y.J.M., Demera Y.H.B., Pin J.C.L. (2019). Calidad microbiológica de la carne de res comercializada en la ciudad de Calceta. *Revista ESPAMCIENCIA* 10(2): 63-70.
- Tougan P.U., Dahouda M., Salifou C.F.A., Ahounou S.G.A., Kpodeko, M.T., Mensah G.A., Thewis A., Karim I.Y. (2013). Conversion of chicken muscle to meat and factors affecting chicken meat quality: a review. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research* 3(8): 1-20.
- Umaraw P., Verma A.K. (2017). Comprehensive review on application of edible film on meat and meat products: An eco-friendly approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(6): 1270-1279. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.986563>
- Velasco V., Bravo P., Williams P., Campos J., Astudillo R., Melín P., Velasco V., Bravo P., Williams P., Campos J., Astudillo R., Melín P. (2017). Estabilidad durante el almacenamiento de carne de pollos alimentados con orégano seco (*Origanum vulgare* L.) en la dieta. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences* 33(1): 28-38. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902017005000104>
- Velasco V., Soto V.H., Williams P., Campos J., Astudillo R., Rodríguez H. (2018). Meat quality parameters of broiler chickens fed diets containing chicory (*Cichorium intybus*) vinasse. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences* 34(1): 26-32.
- Volzing K., Borrero J., Sadowsky M.J., Kaznessis Y.N. (2013). Antimicrobial peptides targeting Gram-negative pathogens, produced and delivered by lactic acid bacteria. *ACS Synthetic Biology* 2(11): 643-650. <https://doi.org/10.1021/sb4000367>
- (Aceptado para publicación el 27 de mayo de 2024)

# Actitudes y percepción de los consumidores hacia miel de origen local

Pilar Uldemolins<sup>1,2,3,\*</sup>, María Teresa Maza<sup>1,3</sup> y Tiziana De-Magistris<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Dpto. de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Facultad de Veterinaria, Univ. de Zaragoza.

<sup>2</sup> Ud. Transversal de Economía Agroalimentaria, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA).

<sup>3</sup> IA2-Instituto Agroalimentario de Aragón.

## Resumen

En las últimas décadas, ante la necesidad de alcanzar un equilibrio entre la actividad económica y el medio ambiente, ha aumentado el interés por analizar el comportamiento sostenible y los factores que influyen en él. Este estudio tiene dos objetivos, el primero es analizar las actitudes y percepciones de los consumidores hacia la miel de origen local ya que un mejor conocimiento de éstas puede ayudar a formular estrategias comerciales más efectivas. El segundo objetivo es identificar diferentes grupos de consumidores de miel con diferentes perfiles para ayudar a los apicultores a implementar diferentes estrategias de marketing y ayudarles a ser más competitivos en los mercados. Para alcanzar estos objetivos se ha llevado a cabo un estudio mediante encuestas con una muestra representativa de 400 individuos. La metodología estadística ha sido de tipo multivariante aplicando un análisis factorial de componentes principales y un análisis clúster de k-medias. Para la segmentación se han tenido en cuenta las actitudes y percepciones de los consumidores sobre miel de origen local. Se han obtenido tres grupos diferenciados por la distinta importancia que reporta su consumo en cuanto al bienestar moral y ambiental, al valor nutritivo y a sus percepciones sobre el etiquetado de miel local. Este estudio aporta información sobre las características de los consumidores de miel, lo que podría ayudar a productores y comercializadores locales a diseñar estrategias de marketing más efectivas orientadas a los segmentos más interesantes.

**Palabras clave:** Análisis clúster, análisis factorial, apicultura, consumo sostenible.

## Consumer attitudes and perceptions towards local honey

### Abstract

In recent decades, given the need to achieve a balance between economic activity and environment, there has been a growing interest in analysing sustainable behaviour and the factors that influence it. This study has two objectives. Firstly, to analyse consumer attitudes and perceptions towards locally sourced honey, since a better understanding can help to formulate more effective marketing strategies. Secondly, to identify different groups of honey consumers in order to help beekeepers implement different marketing strategies and help them to be more competitive in the markets. To achieve these objectives, a survey has been carried out with a representative sample of 400 individuals. The metho-

---

\* Autor para correspondencia: [puldemolins@cita-aragon.es](mailto:puldemolins@cita-aragon.es)

Cita del artículo: Uldemolins P., Maza M.T., De-Magistris T. (2024). Actitudes y percepción de los consumidores hacia miel de origen local. ITEA-Información Técnica Económica Agraria 120(3): 288-302. <https://doi.org/10.12706/itea.2024.003>



dology used to analyse data was multivariate, applying principal component factor and k-means cluster analysis. Consumer attitudes and perceptions about locally sourced honey were considered for segmentation. Results show three distinct groups, differing on the importance they attach to moral and environmental well-being, nutritional value, and their perceptions of local honey labelling. This study provides information on the characteristics of honey consumers, which could help local producers and marketers to design more effective marketing strategies targeting the most interesting segments.

**Keywords:** Cluster analysis, factor analysis, beekeeping, sustainable consumption.

## Introducción

En España, el conjunto de la actividad apícola (básicamente miel, polen y cera) representa el 0,44 % de la Producción Final Ganadera (PFG) y el 0,17 % de la Producción Final Agraria (PFA) por lo que no estamos ante un sector relevante desde de punto de vista económico. Sin embargo, la perspectiva cambia totalmente cuando analizamos su importancia social, ambiental y territorial. La FAO señala que a través de esta actividad se pueden crear sistemas de vida más sostenibles ya que genera una actividad productiva que, dependiendo del contexto y los medios, puede llegar a convertirse en un motor económico, y además asegura la continuidad de los hábitats y la diversidad biológica (FAO, 2005). Otra característica de la práctica apícola es que está muy ligada al territorio. La apicultura depende intensamente de las condiciones físicas y ambientales del entorno, moldea el paisaje, y dado su carácter tradicional influye en las costumbres y la cultura del lugar. En muchos casos debido a las características geográficas y medioambientales del territorio la apicultura puede ser un sector atractivo para la generación de empleo y la recuperación de áreas despobladas.

No obstante, a pesar de la importancia que tiene la apicultura en la polinización, biodiversidad, medioambiente y en la sociedad, por su capacidad de fijar población en el medio rural, económicamente representa un sector pequeño y con bajo grado de profesionalización (De-Magistris y López-Galán,

2018). España cuenta con 36.494 explotaciones apícolas, lo que supone un aumento del 0,6 % respecto al anterior ejercicio, pero tan sólo el 17 % son profesionales (aquellas explotaciones que reúnen más de 150 colmenas) (REGA, 2023).

Por otro lado, aunque se observa un cierto grado de concentración en el sector, de la producción total de miel, 34.065 toneladas en 2021 (REGA, 2023), el 65 % se concentra en cuatro comunidades autónomas (MAPA, 2021), el sector apícola está atomizado. Existe un gran número de pequeños apicultores que se encuentran dispersos geográficamente y no realizan acciones conjuntas. La mayor parte de los apicultores lleva a cabo su actividad de manera artesanal o semi-artesanal, como actividad complementaria a otras ocupaciones, con escasa infraestructura y con el objetivo de obtener un producto para el autoconsumo o para el entorno cercano (Barberán, 2021). La producción de miel por tanto no es muy elevada, pero sí posee una gran calidad.

A ello hay que unir que los apicultores prefieren comercializar la miel a granel o a través de intermediarios, y muy pocos cuentan con un registro sanitario que les permita envasar y comercializar el producto con una marca propia (De-Magistris y López-Galán, 2018). De allí que se genere un bajo valor añadido en el producto final y un bajo grado de conocimiento por parte de los consumidores, lo que resta competitividad al sector.

En efecto, el bajo conocimiento de los consumidores sobre el producto hace que pre-

fieran pagar un precio más bajo y que por tanto elijan mieles de otras procedencias, sobre todo en grandes superficies. Estas mieles, que encuentran los consumidores locales en las grandes superficies y supermercados a precios más competitivos, son por lo general importadas, aunque también de peor calidad (De-Magistris y Enseñat, 2021). Este comportamiento cambia cuando se trata de otros canales de comercialización, como tiendas especializadas, venta directa del apicultor o mercados locales.

El vínculo entre la calidad de la miel y su origen ha hecho que desde el sector y desde los consumidores se hayan producido demandas para exigir la obligatoriedad de incluir el origen en la información presentada en el etiquetado (Real Decreto 523/2020) que beneficiaría a los apicultores con menor capacidad de producción y a través de técnicas más artesanales. Actualmente el etiquetado de miel debe incluir el lugar de origen a nivel nacional cuando se trata de una única procedencia, aunque no se exige detallar el nivel regional o local, mientras que cuando se trata de mezclas, solo es necesario detallar si son procedentes de la UE o de países no pertenecientes a UE. Sin embargo, tras la publicación de los resultados de una investigación realizada por la Comisión Europea, en el que el 46 % de las muestras estudiadas presentaban algún tipo de fraude, se ha vuelto a abrir el debate sobre la inclusión más detallada del origen en el etiquetado (Ždiniaková et al., 2023).

Por tanto, el etiquetado es una fuente de información y puede influir en las decisiones de compra del consumidor, lo que repercute en el sistema productivo y alimentario (GAP, 2018). En este trabajo nos centramos en analizar diversos factores del consumidor que podrían estar presentes en la elección de miel local. La relevancia de este producto radica en que sus características productivas inciden favorablemente en un sistema productivo y alimentario más sostenible, en línea con las premisas de la Comisión europea y el

objetivo 12 de los ODS, "Producción y consumo responsables". Diversos estudios han analizado la relación entre el comportamiento sostenible en la vida diaria y la preferencia de los consumidores por los alimentos locales (Bimbo et al., 2020); al mismo tiempo se ha demostrado que los consumidores consideran los alimentos orgánicos y locales como alternativas sostenibles (Annunziata y Mariani, 2018). Los consumidores más concienciados con el medioambiente son los que trasladan esta inquietud al comportamiento de compra y eligen productos más sostenibles (Gallo et al., 2023). Por ello en este trabajo se ha recogido información sobre los hábitos de comportamiento sostenibles de los consumidores y se han puesto en relación con la percepción hacia la miel local. En la literatura también se ha estudiado el comportamiento de compra sostenible con la accesibilidad a los alimentos y las características sociodemográficas del consumidor (Waldman et al., 2023) y se ha sugerido, que a mayor conocimiento sobre un producto orgánico, más positivas son las actitudes hacia el mismo (Smith y Paladino, 2010). Por ello este estudio también ha analizado las características sociodemográficas de los consumidores, la frecuencia y el nivel de experiencia en el consumo de miel, ya que, dependiendo del conocimiento hacia la miel y el grado de experiencia en la compra del producto, los consumidores presentarán unas actitudes y percepciones diferentes.

Los comportamientos de compra están determinados por diversos factores, algunos de ellos psicológicos como demuestra la teoría del comportamiento planificado de Ajzen (1991) o la teoría de valores, creencias y normas (Stern et al., 1999). Estas teorías se han aplicado para explicar la motivación que está detrás de un consumo de alimentos más sostenible o al menos más consciente de las consecuencias sobre medio ambiente (Stern et al., 1995; Whitley et al., 2016; Carfora et al., 2021; Sánchez-Jiménez et al., 2021). Ambas ponen de manifiesto que dimensiones como



las actitudes, las normas subjetivas, el control que percibimos sobre nuestras acciones, la conciencia de las consecuencias de las decisiones que tomamos como consumidores o las normas personales, tienen un impacto en nuestra intención de compra y ésta a su vez puede verse como un reflejo del comportamiento futuro. Además, en la literatura se han identificado otros aspectos que influyen en la decisión de compra como la preocupación o el interés hacia la salud o la percepción de la calidad (Carzedda *et al.*, 2021) y la confianza en el etiquetado (Yeh *et al.*, 2021). Por todo ello, este trabajo utiliza algunas de estas características para segmentar la muestra recogida de consumidores de miel.

Este estudio tiene dos objetivos. El primero es analizar factores psicométricos como las normas personales y la conciencia de las consecuencias, que pueden explicar el comportamiento de los consumidores de miel local<sup>1</sup>. Dentro del primer objetivo, también se analiza la percepción sobre la calidad de la miel, la confianza en el etiquetado, el grado de conocimiento y experiencia con el producto y el comportamiento sostenible. El segundo objetivo es identificar diferentes grupos de consumidores de miel con diferentes perfiles ya que un mejor conocimiento del consumidor puede ayudar a formular estrategias comerciales que promuevan la elección de productos locales, lo que contribuye a un consumo más sostenible y a apoyar el desarrollo de territorios rurales.

Este estudio tiene implicaciones empíricas relevantes. En primer lugar, los resultados obtenidos a través de la identificación de varios grupos de consumidores de miel con di-

ferentes perfiles pueden ayudar a diseñar estrategias comerciales que potencien la miel local, puede contribuir a aumentar el interés del sector en aportar mayor valor añadido en el inicio de la cadena apícola y así favorecer un modelo de consumo más sostenible y el desarrollo rural. Por otra parte, existen pocos trabajos científicos que traten el tema de la apicultura y la miel desde un enfoque socio-económico y de marketing, que aporten evidencias de los beneficios de la actividad apícola en las zonas rurales mediterráneas cuyo papel multifuncional produce gran capacidad para aprovechar territorios pocos productivos, generando múltiples externalidades y servicios ecosistémicos de gran utilidad para la sociedad.

## Material y métodos

### *Encuesta y escalas utilizadas*

Para analizar las actitudes y percepciones sobre miel de origen local se recogió información de consumidores a través de una encuesta. Antes de lanzar el cuestionario online se realizó una prueba piloto con 10 voluntarios para comprobar que todas las preguntas estuvieran bien redactadas y fueran comprensibles, así como para controlar el tiempo que se tardaba en contestar.

Se recogieron datos de 400 individuos durante febrero y abril del 2022. El error muestral<sup>2</sup> alcanzado con este tamaño de muestra fue del 4,9 %. Se realizó un muestreo por cuotas según la CCAA, la edad y el género.

<sup>1</sup> En este caso de estudio, cuando nos referimos a miel local estamos hablando de miel producida en la provincia de Teruel y distribuida a través de canales cortos de comercialización.

<sup>2</sup> Para calcular el error muestral se ha utilizado la siguiente fórmula (Santesmases, 2007):

$$N = \frac{z^2 \times p \times q}{e^2}$$

Siendo N el tamaño de muestra,  $z = 1,96$  para un 95% de confianza, p es la población que posee el atributo y q es la población que no posee dicho atributo (1-p), en este caso asumimos que p y q son iguales a 0,5.

Una empresa externa especializada fue la encargada de enviar el cuestionario online a consumidores de Cataluña, Aragón, Madrid, Valencia y País Vasco. Se eligieron estas cinco Comunidades Autónomas porque es de donde Aragón recibe el mayor número de visitantes. Por lo tanto, esta población sería el potencial mercado objetivo, junto con la población local, para consumir el producto estudiado. Se utilizó el porcentaje de visitantes para estratificar la muestra por CCAA. Para la estratificación también se tuvo en cuenta la edad y se aplicó a cada CCAA la cuota correspondiente a cada grupo de edad según la proporción de la población española<sup>3</sup>. La encuesta incluía una serie de ítems pertenecientes a diversas escalas. Se explican con más detalle a continuación y se presentan en la tabla 1.

#### *Normas personales y conciencia de las consecuencias del consumo de miel local*

Para analizar las normas personales y la conciencia de las consecuencias del consumo de miel local se utilizaron ítems que miden estas dimensiones basándonos en Carfora et al. (2021). Se pedía a los participantes que evaluaran las afirmaciones en una escala de Likert de 7 puntos (siendo 1 totalmente en desacuerdo, 4 el punto neutral y 7 totalmente de acuerdo). Para comprobar la fiabilidad de las escalas se calculó el alfa de Cronbach, obteniendo un coeficiente de 0,859 para "normas personales" y 0,843 para "conciencia de las consecuencias".

#### *Percepciones sobre calidad y repercusiones en la salud*

Para medir la calidad percibida y la percepción de lo saludable que es la miel local, se utilizaron los ítems propuestos en Carzedda

et al. (2021). Se utilizó como en el caso anterior una escala de Likert de 7 puntos (siendo 1 totalmente en desacuerdo, 4 el punto neutral y 7 totalmente de acuerdo). Para comprobar la fiabilidad de las escalas se calculó el alfa de Cronbach, obteniendo un coeficiente de 0,876 para "calidad percibida" y 0,854 para "repercusiones en la salud".

#### *Confianza en el etiquetado*

Para medir las percepciones de los participantes sobre la confianza en el etiquetado se utilizó la escala propuesta en Yeh et al. (2021). Para evaluar los ítems se utilizó una escala de Likert de 7 puntos (siendo 1 totalmente en desacuerdo, 4 el punto neutral y 7 totalmente de acuerdo). Para comprobar la fiabilidad de las escalas se calculó el alfa de Cronbach, obteniendo un coeficiente de 0,825 para "confianza en el etiquetado".

#### *El comportamiento sostenible*

El comportamiento sostenible se midió a través de la dimensión "comportamiento" del cuestionario de conciencia de sostenibilidad utilizado en Marcos-Merino et al. (2020). Se creó la variable "comportamiento sostenible", y para ello se calculó para cada individuo la media de los ítems que componían la escala. Para calcular el punto de corte entre el comportamiento sostenible y el no sostenible, se utilizó la mediana de la muestra. Por lo tanto, cuando un individuo obtenía un valor medio en el conjunto de ítems igual o por encima de la mediana se consideraba que presentaba un comportamiento sostenible, mientras que una puntuación inferior al valor de la mediana se consideraba un comportamiento no sostenible. Para comprobar la fiabilidad de las escalas se calculó el alfa de Cronbach, obteniendo un coeficiente de 0,709.

<sup>3</sup> Para establecer los porcentajes de población correspondientes a cada grupo de edad se utilizaron los datos del INE del año 2019 porque era la estratificación del panel de consumidores que tenía la empresa subcontratada.

Tabla 1. Ítems utilizados para medir normas personales, confianza en el etiquetado, calidad percibida, salud y la conciencia de las consecuencias.  
 Table 1. *Items measuring personal norms, trust in labelling, perceived quality, health and awareness of consequences.*

	Media
<b>Normas personales</b>	
1. Me siento mejor persona si compro miel de origen local (Lorenzo-Romero et al., 2019)	4,78
2. Me siento moralmente obligado a comprar miel de origen local para proteger el planeta (Carfora et al., 2021)	4,42
3. Me siento personalmente obligado a comprar miel de origen local para proteger el medioambiente (Carfora et al., 2021)	4,48
<b>Confianza en el etiquetado de origen (Yeh et al., 2021)</b>	
4. La miel que en el etiquetado indica que es de origen local cumple con unas normas estrictas	4,89
5. Un etiquetado que indica que la miel es local garantiza que la miel es de la región/comunidad	5,23
6. Tengo una gran confianza en el sistema de control detrás de un etiquetado de origen local.	4,96
<b>Calidad percibida (Carzedda, 2021)</b>	
7. La miel local tiene una calidad superior	5,11
8. La miel local tiene un sabor auténtico	5,22
9. La miel local es más fresca y está mejor conservada	5,08
<b>Salud (Carzedda, 2021)</b>	
10. La miel local es mínimamente procesada y por lo tanto es más saludable	5,11
11. La miel local contiene más nutrientes	4,63
12. La miel local contiene más vitaminas y minerales	4,59
<b>Conciencia consecuencias (Carfora et al., 2021)</b>	
13. Comprar miel de origen local mejora nuestra economía	5,46
14. Comprar miel de origen local mejora nuestro planeta	5,08
15. Comprar miel de origen local mejora el medioambiente	5,15

### *Experiencia en el consumo de miel*

Para determinar la experiencia de los individuos con el consumo de miel local se plantearon cuatro afirmaciones expuestas en la Tabla 2. La primera era si existían preferencias de miel según el origen floral, la segunda trataba sobre el conocimiento de diferentes tipos de miel, la tercera sobre el hábito de comprar miel envasada de calidad estándar y la última sobre el conocimiento de los precios de la miel. Los encuestados debían evaluar

estos ítems en una escala de Likert de 7 puntos según su grado de acuerdo o desacuerdo. Para clasificar a la muestra en individuos con una experiencia alta y baja, se calculó para cada individuo la media de los ítems. Como punto de corte para la clasificación se utilizó la mediana, estableciendo que los individuos con una puntuación igual o por encima mostraban una experiencia alta en el consumo de miel, mientras que los participantes con una puntuación media por debajo de este punto se clasificaron con experiencia baja.

Tabla 2. Ítems utilizados para medir el nivel de experiencia en el consumo de miel.  
*Table 2. Items measuring level of experience in honey consumption.*

Nivel de experiencia en el consumo de miel	Media
Tengo un tipo de miel preferida según el tipo de flor de la que procede	4,26
Conozco diferentes tipos de miel	4,84
Normalmente compro miel envasada de calidad estándar	3,75
Conozco los precios comerciales de la miel en mi zona	3,89

### *Análisis factorial*

El análisis factorial se usa habitualmente en la investigación de mercados para identificar la estructura subyacente de múltiples ítems donde los consumidores reflejan su percepción de un producto o servicio. En este estudio se ha realizado el análisis de componentes principales utilizando los ítems de normas personales, confianza en el etiquetado, calidad percibida, y salud y conciencia de las consecuencias, con el objetivo de obtener las dimensiones subyacentes a estas variables y que nos permita describir los datos con un número de conceptos más reducidos (Hair et al., 1999).

Para verificar que los datos utilizados eran adecuados para este análisis se calculó y examinó la matriz de correlaciones obtenida con el software SPSS v22 (Frías-Navarro y Pascual-Soler, 2012). Para comprobar esta-

dísticamente que las variables estaban lo suficientemente correlacionadas se utilizó la prueba de esfericidad de Bartlett y el índice de adecuación muestral de Kaiser-Mayer-Olkin (KMO) (Pérez y Medrano, 2010). La prueba de Bartlett evalúa la hipótesis nula ( $H_0$ ) que confirma que las variables no están correlacionadas. Si los resultados obtenidos en esta prueba son estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ), se rechazará  $H_0$ , confirmando que las variables están correlacionadas al 5 % de nivel de significación. El índice KMO es una medida de adecuación que indica la magnitud de la correlación entre las variables y toma valores de 0 a 1, considerándose inadecuados los valores inferiores a 0,50, mediocres los comprendidos entre 0,60 y 0,69 y satisfactorios los superiores a 0,8. Cuanto mayor sea el valor de KMO, mayor será la correlación (Lloret-Segura et al., 2014).

También se analizaron las comunalidades, siendo todas superiores a 0,5 y teniendo en cuenta que cuanto mayor sea el valor, mayor será la importancia de ese ítem en la varianza explicada por el factor y por lo tanto en su interpretación (Frías-Navarro y Pascual-Soler, 2012). Para la extracción de factores se utilizó el método de componentes principales, con rotación varimax y normalización de Kaiser. Los resultados se muestran en la tabla 4.

### **Análisis clúster**

Para conseguir el objetivo de este estudio de segmentar la muestra según las actitudes y percepciones hacia la miel local se realizó un análisis clúster o de conglomerados. Esta técnica multivariante agrupa a los individuos consiguiendo que dentro de un grupo éstos sean lo más similares posible, y entre grupos lo más disímiles posible. La clasificación se realizó con las dimensiones obtenidas en el análisis factorial, creando grupos de individuos con percepciones y actitudes similares en cuanto a estas variables.

### **Resultados y discusión**

Nuestra muestra presenta una proporción similar de hombres y mujeres, el 51 % son hombres y el 48 % son mujeres con edades comprendidas entre 25 y 65 años. La distribución por edades puede verse en la tabla 3. Además, el nivel de estudios de la muestra es en su mayoría medio y superior. En cuanto al nivel de renta destaca el nivel medio, aunque hay un alto porcentaje de no respuestas en esta variable.

El análisis de los resultados se ha realizado en dos pasos. Primero a través del análisis factorial se han agrupado, y de este modo reducido, las variables de estudio para obtener los factores subyacentes. En segundo lugar, se

ha segmentado la muestra mediante un análisis clúster, utilizando las dimensiones del análisis factorial como elementos de clasificación de los individuos.

### **Análisis factorial**

Los resultados del análisis de componentes principales se presentan en la tabla 4. Para comprobar la adecuación de los datos al análisis factorial se realizaron la prueba de medida de Kaiser-Meyer-Olkin ( $KMO = 0,913$ ) y la prueba de esfericidad de Barlett ( $p = 0,000$ ). Las quince variables estudiadas se redujeron en tres factores, que explican un 70 % de la varianza total. Se tuvieron en cuenta aquellos factores con autovalores superiores a 1.

El factor 1 se correlaciona con seis variables que recogen aspectos positivos nutricionales y de calidad de la miel local. Se ha denominado "Buena composición nutricional y calidad".

El factor 2 se correlaciona con seis variables sobre la conciencia respecto al consumo de miel local y sus consecuencias sobre el medioambiente. Este factor se ha denominado "Bienestar moral y ambiental".

Por último, el factor 3, está correlacionado con tres variables sobre la percepción del etiquetado de origen de la miel local. Esta dimensión se ha denominado "Confianza en el etiquetado local".

### **Análisis clúster**

Previamente al análisis clúster mediante k medias se realizó un análisis de clúster jerárquico para obtener una aproximación del número de grupos en los que segmentar la muestra. Este análisis indicó que la mejor solución se encontraba entre 2 y 4 grupos. Tras realizar el testeo con todas las posibilidades, finalmente la mejor solución se obtuvo al clasificar la muestra en tres clústeres. Las puntuaciones de los centros de cada clúster,

Tabla 3. Características sociodemográficas de la muestra.  
 Table 3. Socio-demographic characteristics of the sample.

	Muestra %	Población %
CCAA		
Aragón	41,0	27
Cataluña	19,3	24
Valencia	13,8	23
Madrid	17,8	17
País Vasco	8,3	9
Género		
Hombre	51,4	50
Mujer	47,9	50
Edad		
24-34	21,8	21
35-44	26,6	27
45-54	23,6	27
55-65	27,3	25
Nivel de estudios		
Básico	9,9	
Medio	40,2	
Superior	49,1	
Renta		
<1500 €/mes	21,8	
1500-3500 €/mes	35,7	
>3500 €/mes	20,1	
NA	22,3	

así como el tamaño de cada grupo se muestran en la Tabla 5. Estas puntuaciones nos permiten caracterizar cada grupo en función de los factores extraídos en el análisis. Además, para conocer más en profundidad las características de cada grupo, se ha realizado la prueba de chi-cuadrado para buscar dife-

rencias entre los clústeres en cuanto a variables sociodemográficas, hábitos de consumo de miel y el comportamiento sostenible de los individuos (Tabla 6). Se han encontrado diferencias significativas en cuanto al género, edad, comportamiento sostenible y en la experiencia en el consumo.

Tabla 4. Resultados del análisis factorial.  
 Table 4. Results of the factor analysis.

	Factores			Comunalidades
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	
La miel local contiene más vitaminas y minerales.	<b>0,845</b>	0,213	0,088	0,768
La miel local contiene más nutrientes.	<b>0,835</b>	0,238	0,081	0,760
La miel local tiene una calidad superior.	<b>0,762</b>	0,254	0,298	0,734
La miel local es mínimamente procesada y por lo tanto es más saludable.	<b>0,730</b>	0,168	0,284	0,642
La miel local es más fresca y está mejor conservada.	<b>0,702</b>	0,370	0,297	0,718
La miel local tiene un sabor auténtico.	<b>0,691</b>	0,307	0,283	0,651
Me siento moralmente obligado a comprar miel de origen local para proteger el planeta.	0,282	<b>0,830</b>	0,021	0,769
Me siento personalmente obligado a comprar miel de origen local para proteger el medioambiente.	0,258	<b>0,821</b>	0,035	0,741
Comprar miel de origen local mejora el medioambiente.	0,283	<b>0,754</b>	0,226	0,699
Me siento mejor persona si compro miel de origen local.	0,155	<b>0,745</b>	0,212	0,625
Comprar miel de origen local mejora nuestro planeta.	0,219	<b>0,737</b>	0,321	0,694
Comprar miel de origen local mejora nuestra economía.	0,244	<b>0,581</b>	0,391	0,550
Un etiquetado que indica que la miel es local garantiza que la miel es de la región/comunidad.	0,202	0,096	<b>0,828</b>	0,735
Tengo una gran confianza en el sistema de control detrás de un etiquetado de origen local.	0,215	0,235	<b>0,804</b>	0,749
La miel que en el etiquetado indica que es de origen local cumple con unas normas estrictas.	0,248	0,222	<b>0,747</b>	0,669
Valor Propio	4,002	3,907	2,596	
% de varianza	26,679	26,043	17,308	
% de varianza acumulado	26,679	52,722	<b>70,030</b>	

Tabla 5. Análisis de centros de clústeres.  
Table 5. Cluster centres.

Factores	Clústeres		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Fact1_Buena composición nutricional y calidad	<b>0,82320</b>	-0,22257	-0,26854
Fact2_Bienestar moral y ambiental	-0,89342	0,55642	<b>0,06629</b>
Fact3_confianza en etiquetado local	0,24279	<b>0,88980</b>	-0,76243
Número de casos en cada clúster	93,000	128,000	179,000
% de casos en cada clúster	23,25	32,00	44,75

Tabla 6. Caracterización de los clústeres.  
Table 6. Characterisation of the clusters.

Variables	clúster 1	clúster 2	clúster 3	chi-cuadrado (p-value)
<b>Género</b>				
Hombre	<b>61,3%</b>	43,8%	<b>52,5%</b>	<b>0,035</b>
Mujer	38,7%	<b>56,3%</b>	47,5%	
<b>Edad</b>				
25-34	10,8%	21,1%	<b>28,5%</b>	<b>0,027</b>
35-44	28,0%	<b>31,3%</b>	22,9%	
45-54	<b>29,0%</b>	24,2%	20,7%	
55-65	<b>32,3%</b>	23,4%	27,9%	
<b>Ingresos</b>				
<1500 €/mes	28,2%	33,6%	<b>55,3%</b>	0,828
1500-3500 €/mes	48,7%	7,0%	12,3%	
>3500 €/mes	23,1%	<b>59,4%</b>	32,4%	
<b>Frecuencia consumo de miel</b>				
Consumo diario	18,3%	18,8%	18,4%	0,993
Consumo semanal	26,9%	27,3%	25,1%	
Consumo mensual o menos	54,8%	53,9%	56,4%	
<b>Comportamiento sostenible</b>				
No sostenible	<b>52,7%</b>	37,5%	<b>53,6%</b>	<b>0,013</b>
Sostenible	47,3%	<b>62,5%</b>	46,4%	
<b>Experiencia en el consumo de miel</b>				
Experiencia baja	<b>46,2%</b>	33,6%	<b>55,3%</b>	<b>0,000</b>
Experiencia media	4,3%	7,0%	12,3%	
Experiencia alta	<b>49,5%</b>	<b>59,4%</b>	32,4%	



Según los centros de los clústeres (Tabla 5), el aspecto que más caracteriza a los individuos del segmento 1, es tener una percepción positiva hacia la composición nutricional y la calidad de la miel local, "consumidores atentos a la calidad". También confían en el etiquetado de origen y su consumo de miel local no se asocia a sentir un bienestar moral. Este segmento es el más pequeño de los tres, conteniendo el 23 % de la muestra. Este grupo está mayoritariamente compuesto por hombres y contiene la mayor proporción de individuos entre 45 y 65 años. El 47 % parece tener un comportamiento sostenible y alberga tanto a individuos con una experiencia alta como baja en el consumo de miel (ver Tabla 6)

La característica que más representa al segmento 2, es la confianza que declaran hacia el etiquetado de origen local, "consumidores con preferencia por el origen". Otro factor que se asocia a su consumo de miel local es el bienestar moral y ambiental que les reporta, aunque no perciben que la miel de origen local tenga una mejor composición nutricional y calidad. Este segmento es el segundo más grande de los tres, compuesto por el 32 % de los individuos de la muestra. Como puede verse en la Tabla 6, este grupo está formado por una mayor proporción de mujeres y contiene la mayor proporción de individuos entre 35 y 44 años. La mayoría de la muestra presenta un comportamiento sostenible y una experiencia alta en el consumo de miel, lo que concuerda con su confianza en el etiquetado.

El segmento 3, se caracteriza por el bienestar moral que les produce comprar miel local y por percibir los beneficios para el medioambiente, "consumidores por bienestar de conciencia". Además, no parece que tengan confianza en el etiquetado de origen local y tampoco perciben que la miel local tenga mejores propiedades nutritivas ni mejor calidad. Este grupo es el más grande de los tres, formado por casi el 45 % de la muestra. Es el grupo más equili-

brado en cuanto a hombres y mujeres y comprende a una mayor proporción de individuos entre 25 y 34 años (ver Tabla 6).

Destaca que son los segmentos de menor tamaño aquellos que contienen a los consumidores con una mejor percepción de la calidad de miel local y de confianza en el etiquetado. En otros países se observa una tendencia por las preferencias de miel de origen local. Por ejemplo, Oravec et al. (2020) declararon que consumidores húngaros, prefieren consumir miel de origen local, sobre todo aquellos con mayores conocimientos sobre certificación.

Otros estudios, declaran que las normas personales y la conciencia de las consecuencias de compra son factores que explican la intención de compra de productos naturales (Carfora et al., 2021), lo que en este caso se ha descrito como "bienestar moral y ambiental" y se relaciona con la compra de miel de origen local. También se ha identificado que la preocupación por la salud es uno de los principales motivos para la compra de alimentos orgánicos (Carzedda et al., 2021), lo que se corresponde con las características del segmento 1 aplicada a la miel de origen local, un producto que puede asociarse a lo orgánico y natural.

Otros trabajos han encontrado también segmentos de consumidores de miel con similares percepciones a los extraídos en este estudio. Por ejemplo, De-Magistris y López-Galán (2021), segmentaron su muestra en tres grupos según la percepción, las actitudes hacia la miel y diferentes estilos de vida, encontrando un grupo más concienciado por el medioambiente, la nutrición y la salud, otro más centrado en el precio y otro intermedio. Annunziata y Mariani (2018) también clasificaron su muestra en diferentes segmentos de consumidores con diferentes percepciones de sostenibilidad, alimentos orgánicos y locales; y Gallo et al. (2023) propusieron tres grupos de consumidores, unos más concienciados con la sostenibilidad y el medio am-

biente y que están más dispuestos a adoptar elecciones de compra sostenibles, otros indiferentes a las cuestiones medioambientales y, por último, algunos consumidores con una atención mínima a la sostenibilidad.

Por último, se han encontrado evidencias de que los consumidores con mayor preocupación por el medio ambiente y con comportamientos sostenibles previos son más propensos a comprar alimentos de origen local, así como los individuos de mayor edad, con niveles superiores de educación y ocupando puestos directivos en comparación con otros estatus profesionales, se asocian a una mayor frecuencia de compra de alimentos locales (Bimbo et al., 2020).

## Conclusiones

Los objetivos de este trabajo eran conocer mejor las percepciones y factores psicométricos del consumidor de miel local, e identificar diferentes grupos con diferentes perfiles para obtener un mejor conocimiento de este consumidor. Se han identificado tres grupos de consumidores, con diferentes percepciones en cuanto a la composición nutricional y calidad, la confianza en el etiquetado y el sentimiento de bienestar medioambiental y moral que les evoca la compra de miel local. Además, se han encontrado otros elementos diferenciadores de estos grupos, como son el comportamiento sostenible y el conocimiento y experiencia con el producto. Se espera que este mejor conocimiento del consumidor pueda ayudar a formular estrategias comerciales que promuevan la elección de miel local, lo que contribuiría a un consumo más sostenible y a apoyar el desarrollo de territorios rurales.

Esta información, podría tenerse en cuenta para mejorar las estrategias comerciales de los apicultores, adaptándose más al perfil de los consumidores, a sus valores y percepciones,

aumentando el valor de la miel local y por consiguiente obteniendo más beneficios directos. De esta manera y a modo de ejemplo, el grupo que percibe la miel local con mejor composición nutricional y calidad estaría más interesado en la miel local si se destacara y se divulgara su contenido en vitaminas, nutrientes, sabor y frescura. Por ejemplo, los apicultores o sus asociaciones podrían participar en ferias u organizar seminarios informativos sobre la calidad de sus mieles y sus beneficios. Por otro lado, el segmento que confía más en el etiquetado de origen y tiene un comportamiento más sostenible, conoce más el producto, y es más probable que busque información sobre el origen en el etiquetado, por lo que destacarlo de forma atractiva podría ser un elemento diferenciador. El último grupo, que comparte el sentimiento de bienestar moral y ambiental al pensar en la compra de miel local, podría alcanzarse desde el punto de vista comercial con mensajes que transmitan valores de altruismo potenciando este sentimiento.

Este trabajo abre la vía a nuevas investigaciones sobre el consumidor de miel local, sería necesario estudiar la intención de compra y relacionarla con estas características. También sería interesante, analizar los diferentes canales de comercialización, para comprender cuál es el lugar de compra más frecuente de cada segmento de consumidores y así poder diseñar estrategias de marketing mejor adaptadas.

Este estudio también presenta algunas limitaciones. En primer lugar, se ha centrado solo en miel local de una única Comunidad, por lo que sería necesario replicar el trabajo con mieles de otros orígenes. En segundo lugar, la definición de miel local puede ser diferente para cada individuo, así que sería necesario establecer una definición común o determinar las características que hacen que la miel sea local. Sería interesante conocer cuál es la percepción del concepto "local" para cada uno de los grupos.

## Agradecimientos

Financiación de FITE MIEL 2 “Recuperar la miel para recuperar el territorio” y Ayuda PRE2019-087635 financiada por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y FSE “El FSE invierte en tu futuro”.

## Referencias bibliográficas

- Ajzen I. (1991). The theory of planned behavior. *Organizational Behavior and Human Decision Processes* 50(2): 179-211. [https://doi.org/10.1016/0749-5978\(91\)90020-t](https://doi.org/10.1016/0749-5978(91)90020-t)
- Annunziata A., Mariani A. (2018). Consumer perception of sustainability attributes in organic and local food. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* 9(2): 87-96. <https://doi.org/10.2174/2212798410666171215112058>
- Barberán M. (2021). Comportamiento del consumidor de miel de abeja en Aragón. En: *Recuperar la miel para recuperar el territorio: el potencial de mercado de la miel de Teruel y su caracterización* (Eds. Enseñat M.F. y De-Magistris T.). Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Zaragoza, España.
- Bimbo F., Russo C., Di Fonzo A., Nardone G. (2020). Consumers' environmental responsibility and their purchase of local food: evidence from a large-scale survey. *British Food Journal* 123(5): 1853-1874. <https://doi.org/10.1108/bfj-05-2020-0398>
- Carfora V., Cavallo C., Catellani P., Del Giudice T., Cicia G. (2021). Why do consumers intend to purchase natural food? Integrating theory of planned behavior, value-belief-norm theory, and trust. *Nutrients* 13(6): 1904. <https://doi.org/10.3390/nu13061904>
- Carzedda, M., Gallenti, G., Cosmina, M., Nassivera, F. (2021). Green consciousness as a determinant of organic food purchase intention: evidences from a case study in Italy. Preprints: 2021050263. <https://doi.org/10.20944/preprints202105.0263.v1>.
- De-Magistris T., López-Galán B. (2018). Recuperar la miel para recuperar el territorio: análisis del sector apícola de Teruel. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Zaragoza, España.
- De-Magistris T., Enseñat M.F. (2021). Recuperar la miel para recuperar el territorio: el potencial de mercado de la miel de Teruel y su caracterización. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Zaragoza, España. 126 pp.
- De-Magistris T., López-Galán B. (2021). Comportamiento del consumidor de miel de abeja en Aragón. En: *Recuperar la miel para recuperar el territorio: el potencial de mercado de la miel de Teruel y su caracterización* (Eds. Enseñat M.F. y De-Magistris T.). Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Zaragoza, España.
- FAO (2005). Folleto de la FAO sobre diversificación 1. La apicultura y los medios de vida sostenibles. Disponible en: <https://www.fao.org/3/y5110s/y5110s00.htm#Contents>. (Consultado: 23 junio 2023)
- Frías-Navarro D., Pascual-Soler M. (2012). Prácticas del análisis factorial exploratorio (AFE) en la investigación sobre conducta del consumidor y marketing. *Suma Psicológica* 19(1): 47-58.
- Gallo T., Pacchera F., Cagnetti C., Silvestri C. (2023). Do sustainable consumers have sustainable behaviors? An empirical study to understand the purchase of food products. *Sustainability* 15(5): 4462. <https://doi.org/10.3390/su15054462>
- GAP (2018). Consumer Evolutions Transform the Global Food System. Global Agricultural Productivity Report 2018. College of Agriculture and Life Sciences Virginia Tech. Disponibles en: <https://globalagriculturalproductivity.org/global-agricultural-imperative/consumer-evolutions-transform-the-global-food-system/#:~:text=Consumers%20have%20significant%20influence%20over,decisions%20producers%20and%20retailers%20make.> (Consultado: 24 junio 2023)
- Hair J.F., Anderson R.E., Tatham R.L., Black W.C. (1999). *Análisis multivariante* 5th Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid, España. 832 pp.
- Lloret-Segura S., Ferreres-Traver A., Hernández-Baeza A., Tomás-Marco I. (2014). El análisis factorial exploratorio de los ítems: una guía práctica, revisada y actualizada. *Anales de Psicología* 30(3): 1151-1169.

- Lorenzo-Romero C., Alarcón-del-Amo M.C., Crespo-Jareño J.A. (2019). Cross-cultural analysis of the ecological behavior of Chilean and Spanish ecotourists: a structural model. *Ecology and Society* 24(4): 38. <https://doi.org/10.5751/ES-11343-240438>
- MAPA (2021). El sector apícola español en 2021: principales magnitudes e indicadores económicos. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicossectormiel2021\\_completo\\_tcm30-576747.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicossectormiel2021_completo_tcm30-576747.pdf) (Consultado 11 junio 2023)
- Marcos-Merino J.M., Corbacho-Cuello I., Hernández-Barco M. (2020). Analysis of sustainability knowingness, attitudes and behavior of a Spanish pre-service primary teachers sample. *Sustainability* 12(18): 7445. <https://doi.org/10.3390/su12187445>
- Oravec T., Mucha L., Magda R., Totth G., Illés C. (2020). Consumers' preferences for locally produced honey in Hungary. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 68(2): 407-418. <https://doi.org/10.11118/actaun202068020407>
- Pérez E., Medrano L. (2010). Análisis factorial exploratorio: bases conceptuales y metodológicas. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento* 2(1): 58-66. <https://doi.org/10.32348/1852.4206.v2.n1.15924>
- Real Decreto 523/2020, de 19 de mayo, por el que se modifica el Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. *Boletín Oficial del Estado*, núm. 173, de 22 de junio de 2020, pp. 43006-43008
- REGA (2023): Registro general de explotaciones ganaderas (REGA). Dirección General de Ganadería del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/app/buscadorrega/Buscador.aspx> (Consultado 11 junio 2023)
- Sánchez-Jiménez A., MacMillan D., Wolff M., Schlüter A., Fujitani M. (2021). The importance of values in predicting and encouraging environmental behavior: Reflections from a Costa Rican small-scale fishery. *Frontiers in Marine Science* 8: 543075 <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.543075>
- Santesmases Mestre M.A. (2007). *Marketing. Conceptos y estrategias*. 5th ed. Ediciones Pirámide. Madrid. 1117 pp.
- Smith S., Paladino A. (2010). Eating clean and green? Investigating consumer motivations towards the purchase of organic food. *Australasian Marketing Journal* 18: 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.ausmj.2010.01.001>
- Stern P.C., Kalof L., Dietz T., Guagnano G.A. (1995). Values, beliefs, and proenvironmental action: Attitude Formation toward emergent attitude Objects. *Journal of Applied Social Psychology* 25(18): 1611-1636. <https://doi.org/10.1111/j.1559-1816.1995.tb02636.x>
- Stern P.C., Dietz T., Abel T.D., Guagnano G., Kalof L. (1999). A value-belief-norm theory of support for social movements: the case of environmentalism. *Huxley College on the Peninsulas Publications* 6(2): 81-97.
- Waldman K.B., Giroux S, Blekking J.P., Nix E., Fobi D., Farmer J., Todd P.M. (2023). Eating sustainably: Conviction or convenience? *Appetite* 180: 106335. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2022.106335>
- Whitley C.T., Takahashi B., Zwickle A., Besley J.C., Lertpratchya A.P. (2016). Sustainability behaviors among college students: An application of the VBN theory. *Environmental Education Research* 24(2): 245-262. <https://doi.org/10.1080/13504622.2016.1250151>
- Yeh C.H., Hartmann M., Gorton M., Tocco B., Amilien V., Steinnes K.K. (2021). Looking behind the choice of organic: A cross-country analysis applying Integrated Choice and Latent Variable Models. *Appetite* 167: 105591. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2021.105591>
- Ždiniaková T., Loerchner C., De Rudder O., Dimitrova T., Kaklamanos G., Breidbach A., Respalda Hidalgo M.A., Vaz Silva I.M., Paiano V., Ulberth F., Maquet A. (2023). EU Coordinated action to deter certain fraudulent practices in the honey sector, EUR 31461 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg. 22 pp. <https://doi.org/10.2760/184511>

(Aceptado para publicación el 25 de enero de 2024)

## **PREMIOS DE PRENSA AGRARIA 2024 DE LA ASOCIACIÓN INTERPROFESIONAL PARA EL DESARROLLO AGRARIO**

La Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA) otorga un premio anual de Prensa Agraria para destacar aquel artículo de los publicados en ITEA en el año 2024 que reúna las mejores características técnicas, científicas y de valor divulgativo y de transferencia al sector, así como un impacto relevante de sus resultados. El artículo deberá reflejar el espíritu fundacional de AIDA de hacer de transmisor de conocimientos hacia el profesional, técnico o empresario agrario. Se concederá un premio, pudiendo quedar desierto.

Los premios se regirán de acuerdo a las siguientes

### **BASES**

1. Podrán concursar todos los artículos que versen sobre cualquier tema técnico-económico-agrario.
2. Los artículos que podrán acceder al premio serán todos aquellos que se publiquen en ITEA en el año 2024. Consecuentemente, los originales deberán ser enviados de acuerdo con las normas de ITEA y aprobados por su Comité de Redacción.
3. El jurado estará constituido por las siguientes personas:
  - a) Presidencia de AIDA, que presidirá el jurado.
  - b) Dirección de la revista ITEA, que actuará de Secretario.
  - c) Dirección del CITA (Gobierno de Aragón).
  - d) Dirección del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza.
  - e) Dirección de la Estación Experimental de Aula Dei.
  - f) Dirección del Instituto Pirenaico de Ecología.
4. El premio será anual y tendrá una dotación económica.
5. Las deliberaciones del jurado serán secretas, y su fallo inapelable.
6. El fallo del jurado se dará a conocer en la revista ITEA, y la entrega del premio se realizará con motivo de la celebración de las Jornadas de Estudio de AIDA.

Si desea Vd. pertenecer a la Asociación debe rellenar esta ficha de inscripción y la siguiente hoja sobre Protección de datos.

## INSCRIPCIÓN EN AIDA

Si desea Vd. pertenecer a la Asociación rellene la ficha de inscripción y envíela a la siguiente dirección:

**Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA). Avenida Montañana, 930, 50059 Zaragoza.**

Si elige como forma de pago la domiciliación bancaria adjunte a esta hoja de inscripción el impreso de domiciliación sellado por su banco.

También puede hacer una transferencia a la cuenta de AIDA (Caixabank, Ag. Zuera (Zaragoza), España, nº ES70 2100 8687 2702 0001 2107) por el importe de la cuota anual. En ese caso, adjunte un comprobante de la transferencia.

Apellidos:		Nombre:	
NIF:			
Dirección Postal:			
Teléfono:		Fax:	e-mail:
Empresa:			
Área en que desarrolla su actividad profesional:			
		En _____, a ___ de _____ de 20__	
		Firma:	

### FORMA DE PAGO (COUTA ANUAL: 50 EUROS)

<input type="checkbox"/>	Cargo a cuenta corriente (rellenar la domiciliación bancaria)
<input type="checkbox"/>	Transferencia a la cuenta de AIDA ES70 2100 8687 2702 0001 2107 (adjuntar comprobante)

---

### DOMICILIACION BANCARIA

Sr. Director del Banco/Caja				
Muy Sr. mío,				
Ruego a Vd. se sirva adeudar en la siguiente cuenta corriente (IBAN: 24 caracteres)				
que mantengo en esa oficina, el recibo anual que será presentado por la <b>Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA)</b> .				
Atentamente,				
En _____, a ___ de _____ de 20__		Sello de la Entidad:		
Firmado:				

# PROTECCIÓN DE DATOS

ASOCIACIÓN INTERPROFESIONAL PARA EL DESARROLLO AGRARIO, de ahora en adelante AIDA, le informa de que los datos facilitados durante su relación con la Asociación serán tratados para gestionar el alta de socio, así como para las gestiones administrativas de la Asociación. La base legal para el tratamiento de sus datos es la relación contractual y su consentimiento. Sus datos podrán ser cedidos a las entidades que sea necesarias para el cumplimiento de nuestras obligaciones legales, y si así lo autoriza, a las empresas colaboradoras de la Asociación. Tiene derecho a acceder, rectificar, suprimir, oponerse al tratamiento de sus datos, así como retirar el consentimiento prestado y pedir su portabilidad.

## AUTORIZACIONES

- \* – Autoriza a que AIDA le envíe información a través de medios postales y/o electrónicos (correo electrónico, SMS, etc.) sobre noticias de la asociación, así como información de servicios de sus patrocinadores y/o colaboradores.
- Autoriza a que AIDA pueda facilitar sus datos de contacto a las empresas patrocinadoras o colaboradoras con fines comerciales.  Sí  No \*

\* Debe responder a estas cuestiones obligatoriamente.

Por último, en aras a dar cumplimiento al Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos, y siguiendo las Recomendaciones e Instrucciones emitidas por la Agencia Española de Protección de Datos (A.E.P.D.),

## SE INFORMA

- Los datos de carácter personal solicitados y facilitados por usted, son incorporados un fichero de titularidad privada cuyo responsable y único destinatario es AIDA, con domicilio en Avenida Montañana, no 930, 50059 - Zaragoza.
- Solo serán solicitados aquellos datos estrictamente necesarios para prestar adecuadamente los servicios solicitados, pudiendo ser necesario recoger datos de contacto de terceros, tales como representantes legales, tutores, o personas a cargo designadas por los mismos.
- Todos los datos recogidos cuentan con el compromiso de confidencialidad, con las medidas de seguridad establecidas legalmente, y bajo ningún concepto son cedidos o tratados por terceras personas, físicas o jurídicas, sin el previo consentimiento del socio, tutor o representante legal, salvo en aquellos casos en los que fuere imprescindible para la correcta prestación del servicio.
- Una vez finalizada la relación entre la Asociación y el socio, los datos seguirán archivados y conservados mientras sean necesarios para dar cumplimiento a las obligaciones legales o, en su defecto, serán devueltos íntegramente al socio (o autorizado legal) o suprimidos si así se solicita por su parte.
- Los datos que facilito serán incluidos en el Tratamiento denominado Socios de AIDA, con la finalidad de gestión del alta de socio, la gestión del servicio contratado, pago de cuotas, contacto, etc., y todas las gestiones relacionadas con los socios y manifiesto mi consentimiento.
- Tiene derecho a acceder a sus datos personales, a solicitar su rectificación, cancelación y oposición, indicándolo por escrito a AIDA con domicilio en Avenida Montañana, no 930, 50059 – Zaragoza, o al correo electrónico de la Asociación: [administracion@aidaitea.org](mailto:administracion@aidaitea.org).
- Los datos personales serán cedidos por AIDA a las entidades que prestan servicios a la misma siempre que sea estrictamente necesario para llevar a cabo los servicios ofrecidos por la Asociación. Igualmente, sus datos serán cedidos si existe una obligación legal.

Nombre y apellidos del Socio:

DNI:

Representante legal (si lo hubiere):

DNI:

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

FIRMA DEL SOCIO:

## **NORMAS PARA LOS AUTORES**

Puede encontrar toda la información sobre como hacer los envíos,  
las directrices de como hacer los manuscritos y las licencias  
bajo las que se publican los artículos en nuestra web, en la URL  
<https://www.aida-itea.org/index.php/revista-itea/envio-de-articulos>



Volumen 120

Número 3

Septiembre 2024

# itea

información técnica económica agraria  
[www.aida-itea.org](http://www.aida-itea.org)

REVISTA DE LA ASOCIACIÓN INTERPROFESIONAL PARA EL DESARROLLO AGRARIO

