

APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE IMPEDANCIAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD HIGIENICA DE PRODUCTOS CÁRNICOS

Carlos A. De Jesús De Barros¹, M^a Jesús Pagán Moreno², José M. Barat Baviera², Ana Fuentes López², Miguel Alcañiz Filloi³, Rafael Masot Peris³.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilización la espectrometría de impedancia, como técnica no destructiva, para determinar la calidad higiénica en productos cárnicos. Se emplearon tres electrodos: Aguja Coaxial (AC), Punta de Flecha (PF) y Electrodo Doble (ED). El estudio se realizó en tres fases. En la primera, se evaluó un sistema modelo constituido por un medio líquido inoculado con diferentes concentraciones de la microbiota propia de jamón curado (estudio en sistema modelo liquido). En la segunda fase se analizó carne magra de cerdo conservada a 25 °C para acelerar su alteración (estudio en un sistema modelo solido). Y finalmente, en la tercera etapa se estudió en producto cárnico. Para ello, se evaluaron tres tipos de jamones: no alterados, con alteraciones microbiológicas (hinchados o con alteración profunda) y afectados por ácaros. Se observó que la técnica permite discriminar entre muestras de carne cruda de cerdo con diferentes niveles de desarrollo microbiano. A través de una regresión de mínimos cuadrados parciales se obtuvo una buena correlación entre la evolución de la carga microbiana y las medidas de impedancia, especialmente para el electrodo PF, con una $R^2 = 93,9\%$. Se encontraron diferencias entre los espectros de impedancia de cada tipo de jamón, discriminándose tres grupos. Adicionalmente, se caracterizó la flora microbiana presente en los jamones, observándose que los aerobios mesófilos, las micrococáceas, los mesófilos halotolerantes, los mohos y las levaduras alcanzaron valores de ufc/g significativamente superiores ($p < 0,05$) para los jamones con putrefacción profunda en comparación con los jamones normales, mientras que los jamones con ácaros tienden a tener una carga microbiana intermedia. A través de una regresión de mínimos cuadrados parciales considerando los recuentos de los diferentes microorganismos analizados y los espectros de impedancia, se obtuvo la mejor correlación con las ufc/g de micrococáceas.

RESUM

L'objectiu d'este treball va ser avaluar la utilització l'espectrometria d'impedància, com a tècnica no destructiva, per a determinar la qualitat higiènica en productes carnis. Es van emprar tres elèctrodes: Agulla Coaxial (AC), Punta de Fletxa (PF) i Elèctrode Doble (ED). L'estudi es va realitzar en

1

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IU-IAD).

² Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria (CUINA),
Departamento de Tecnología de Alimentos.

³ Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico.

tres fases. En la primera, es va avaluar un sistema model constituït per un mitjà líquid inoculat amb diferents concentracions de la microbiota pròpia de pernil curat (estudio en sistema model líquid). En la segona fase es va analitzar carn magra de porc conservada a 25 °C per a accelerar la seua alteració (estudio en un sistema model solid). I finalment, en la tercera etapa es va estudiar en producte carni. Per a això, es van avaluar tres tipus de pernills: no alterats, amb alteracions microbiològiques (hinchados o amb alteració profunda) i afectats per àcars. Es va observar que la tècnica permet discriminar entre mostres de carn crua de porc amb diferents nivells de desenrotllament microbià. A través d'una regressió de mínims quadrats parcials es va obtindre una bona correlació entre l'evolució de la càrrega microbiana i les mesures d'impedància, especialment per a l'elèctrode PF, amb una $R^2 = 93,9\%$. Es van trobar diferències entre els espectres d'impedància de cada tipus de pernil, discriminant-se tres grups." Addicionalment, es va caracteritzar la flora microbiana present en els pernills, observant-se que aerobis mesófilos, micrococáceas, mesófilos halotolerantes, floridures i rents van aconseguir valors d'ufc/g significativament superiors ($p < 0,05$) per als pernills amb putrefacció profunda en comparació amb els pernills normals, mentres que els pernills amb àcars tendixen a tindre una càrrega microbiana intermèdia. A través d'una regressió de mínims quadrats parcials considerant els recomptes dels diferents microorganismes analitzats i els espectres d'impedància, es va obtindre la millor correlació amb les ufc/g de micrococáceas.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of impedance spectroscopy, as a nondestructive technique applied to determine the hygienic quality in meat products. Three electrodes were used: Concentric Needle (AC), Arrowhead (PF) and Double Electrode (ED). The study was conducted in three phases. The first one was to evaluate a model system consisting of a liquid medium inoculated with different concentrations of the microorganisms typically present in dry-cured hams (study in liquid model system.) In the second phase we analyzed lean pork stored at 25 ° C to accelerate its alteration (study in a solid model). And finally, the third stage was performed to evaluate a meat product, involving three types of dry-cured hams: normal, spoiled (deep putrefaction) and affected by mites. It was noted that the technique allows to discriminate between samples of raw pork at different levels of microbial growth. Through a partial least squares regression (PLS) we obtained a good correlation between the evolution of microbial population and impedance measurements, especially for the PF electrode, with $R^2 = 93.9\%$. Differences were observed between the impedance spectra of each type of ham, discriminating three groups. Additionally, we characterized the microbial flora present in the hams, showing that aerobic mesophiles, *micrococcaceae*, mesophilic halotolerant, molds and yeasts reached values of cfu/g significantly higher ($p < 0,05$) for deep putrefaction hams compared to normal hams, while hams with mites tend to have an intermediate microbial population. Through a PLS considering the counts of different

microorganisms tested and the impedance spectra, we obtained the best correlation with the cfu/g of micrococaceae.

PALABRAS CLAVE: carne, productos cárnicos, impedancia, análisis no destructivos, jamón curado, microbiología.

INTRODUCCIÓN

La espectrometría de impedancias comenzó a ser desarrollada en el campo de la biotecnología durante la década de los sesenta, aplicada a la descripción de la composición química del cuerpo humano (Kushner, 1992). En los años posteriores, esta técnica ha sido experimentada como herramienta no destructiva en la caracterización de muchos alimentos de acuerdo a su composición, principalmente en el estudio de tejidos animales y vegetales (Hayasi, 1992; Kent, 1996; Chanut, 1999; Altmann, 2005; Daza, 2006). Las propiedades eléctricas de un alimento y por lo tanto la impedancia, dependen de diversos factores, tales como el efecto capacitivo de las membranas, las propiedades aislantes de la grasa, el poder conductivo del agua y las soluciones salinas, la configuración geométrica y el volumen de muestra analizada (Chanet, 1999).

La ley de Ohm, define la resistencia al paso de una corriente eléctrica como $R = V/I$, donde V es la diferencia de potencial e I es la corriente eléctrica. Sin embargo, su aplicación se encuentra limitada a circuitos con un resistor ideal, por lo cual se utiliza el concepto de impedancia, que describe mejor el comportamiento de circuitos reales. De esta manera, la impedancia se define como $Z = V/I$ (Ramirez, 2009). Sin embargo, en corriente alterna, Z es un número complejo que depende del valor de la frecuencia y que puede escribirse como $Z = R + Xj$, donde la parte real (R), se denomina Resistencia real, y la parte imaginaria (X), se conoce como Reactancia (Pliquett, 2003). Otra manera de expresar el vector de la impedancia es en función del módulo, $|Z| = (R^2 + X^2)^{1/2}$ y del ángulo o fase (Serway, 2002). La espectrometría de impedancias se basa en obtener valores de módulos y fases para un barrido de frecuencias. Una vez obtenidos los espectros, a través de programas informáticos estadísticos, se puede manipular la enorme cantidad de datos generados e interpretarlos en base a análisis discriminantes y regresiones.

En el área de la microbiología, la espectrometría de impedancia ha sido aplicada en el campo de las ciencias médicas para la determinación de microorganismos patógenos, empleando medios de cultivo específicos y midiendo los cambios en la composición de los mismos debido a la acción de dichos microorganismos. Diversos equipos analíticos comerciales se han desarrollado en base a estos principios (Ramirez, 2009).

Por otra parte, en productos cárnicos se han realizado diferentes estudios que emplean la espectrometría de impedancias, tanto para productos terminados como para animales vivos (Kent, 1996; Chanut, 1999; Altmann, 2005; Daza, 2006), generalmente como herramienta para describir sus propiedades fisicoquímicas en base a las variaciones observadas en las

medidas de impedancia. En estos productos, el desarrollo microbiano juega un papel fundamental, como en el caso de los productos crudo-curados. El desarrollo de aromas, sabores, el color y la textura se debe en gran parte a la microbiota. En cualquier caso, las diferentes familias o grupos taxonómicos de microorganismos influyen en distinto grado en la composición y características fisicoquímicas del producto, que pueden ser marcadamente diferentes cuando se desarrollan microorganismos alterantes. Estos, en estados avanzados de desarrollo, ocasionan aromas ácidos o pútridos como consecuencia de fenómenos de proteólisis o lipólisis intensos, y pueden afectar la estructura y propiedades de la pieza a nivel macroscópico. Alrededor del 1-2% del jamón curado español producido sufre de la llamada alteración profunda, ocasionando importantes pérdidas económicas a la industria (Paarup, 1999). Por otro lado, la presencia de microorganismos patógenos también supone un problema para este tipo de productos. Así, Untermann (1992) y Marín (1992) demostraron que en ciertas condiciones, el jamón curado puede ocasionar intoxicación por *Staphylococcus*. Adicionalmente, es bien conocida la capacidad que tienen ciertos microorganismos patógenos del género *Clostridium* de desarrollarse en el interior de estos productos, lo que se evita con la adición de sales nitrificantes.

La microbiología de impedancia, tal y como se aplica en la actualidad, requiere que los microorganismos a analizar estén inoculados en un medio líquido (medio de crecimiento o solución reactante). En el caso de los productos cárnicos la aplicación de dicha técnica no podría ser considerada como no destructiva. Por lo tanto, para poder utilizar esta técnica con el apelativo de “análisis no destructivo” es conveniente encontrar electrodos que permitiesen realizar las medidas de impedancia directamente sobre la matriz cárnica. El objetivo de este trabajo fue el evaluar la posible utilización de la espectroscopia de impedancias, como técnica no destructiva, para determinar la calidad higiénica de la carne y productos cárnicos. A tal efecto, se utilizó un equipo experimental y diferentes tipos de electrodos y se evaluó el efecto que tiene la microbiota presente en la carne o productos cárnicos en las medidas de impedancia, y si esta técnica permite discriminar entre diferentes niveles de alteración microbiana en estos productos. En una primera etapa, se estudió las modificaciones en el espectro de impedancia debidas a la presencia de microorganismos. Para ello, se analizó el espectro de impedancias en medio líquido para diferentes concentraciones de microbiota característica del jamón curado. En una segunda etapa se analizó el efecto del desarrollo microbiano en una matriz sólida sobre los espectros de impedancias. A tal efecto, se utilizó una matriz de carne magra de cerdo, determinando la relación entre el desarrollo microbiano y los valores de impedancia. Finalmente, en una tercera etapa se evaluó la capacidad de las medidas de impedancia para discriminar entre jamones alterados y normales. En este caso se utilizaron jamones curados, finalizado el proceso de elaboración, tomándose muestras de jamones sin alteraciones y de jamones alterados microbiológicamente (jamones hinchados) y con ácaros. Además, se analizó exhaustivamente los grupos taxonómicos de microorganismos característicos en este tipo de productos y los conocidos

como responsables de alteraciones, de manera que se pudiera asociar los espectros de impedancia con el desarrollo de los grupos microbianos analizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plan de trabajo

El plan de trabajo seguido se esquematiza en la figura 1 y consta de tres fases, las cuales se detallan a continuación.

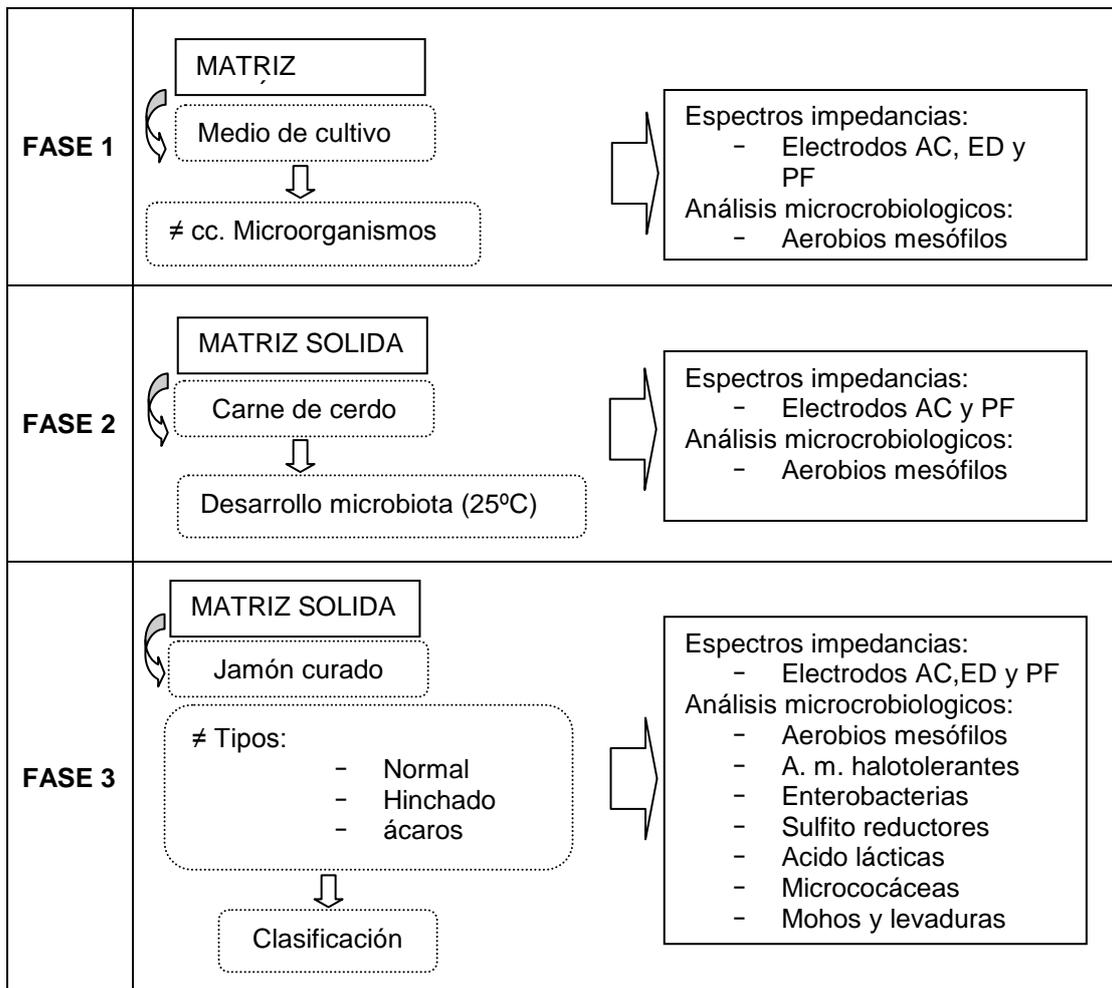


FIGURA 1. Plan de trabajo

Espectrometría de Impedancias

Se determinó el espectro de impedancias utilizando un equipo analizador de respuesta en frecuencia y voltametría (V. 1.0), desarrollado por el Instituto de Química Molecular Aplicada de la Universidad Politécnica de Valencia (IQMA) (Valencia, España). El equipo estaba integrado a un ordenador con

un software que permitía ajustar las condiciones de medida, monitorizar gráficamente la obtención del espectro y registrar los valores de módulos y fases para el rango de frecuencias empleado, establecido entre 1 Hz y 1 MHz. Se utilizaron tres electrodos diferentes en geometría y diseño para evaluar su efectividad. Uno de ellos fue la aguja coaxial (AC), elaborada en acero inoxidable, con un ángulo de 15°, longitud de 75 mm, diámetro del electrodo interno de 0,64 mm y área de 0,07 mm² (Viasys Healthcare, Madison, WI, USA). Los otros dos electrodos fueron el electrodo doble (ED) y el Punta de flecha (PF), prototipos desarrollados por el Departamento de Ingeniería Electrónica del Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico. El ED consiste de dos agujas de acero inoxidable (diámetro de 1 mm y longitud efectiva de 15 mm) separadas por una distancia de 10 mm, e incluidas en un bastidor de resina epoxi. El diseño del electrodo PF se basa en la tecnología híbrida de circuitos de *capa gruesa (Thick-Film technology)*, al estar el circuito eléctrico dispuesto en un sustrato aislante.

Los espectros de impedancia se determinaron en tres matrices: una matriz líquida y dos matrices solidas, compuestas por carne magra de cerdo y por un producto cárnico, en este caso, jamón curado. La profundidad de penetración de los electrodos en las muestras se mantuvo constante en todas las medidas.

Fase 1: Determinación del espectro de impedancia para muestras en medio líquido

Para determinar el espectro de impedancia para muestras liquidas se prepararon diluciones en agua peptonada tamponada (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España) de microorganismos aislados del jamón curado, a concentraciones de 10², 10⁴ y 10⁶ ufc/mL. Se determinó el espectro de impedancia para cada una de estas diluciones, manteniendo la suspensión en agitación suave y constante para evitar la deposición espontánea de las partículas en suspensión. Se realizaron dos diluciones de 20 mL para cada concentración y cinco repeticiones del espectro de impedancia con los tres electrodos. Para cada dilución, se realizó un recuento en placa de aerobios mesófilos (UNE-EN ISO 4833, 2003) en agar Plate Count (PCA) (Scharlau, Chemie, S. A., Barcelona, España).

Fase 2: Determinación del espectro de impedancia en carne magra de cerdo

Para determinar el espectro de impedancias en una matriz solida compuesta por carne de cerdo, se prepararon muestras de 30 g de carne magra de cerdo picada (magro de cabeza), las cuales se almacenaron en una estufa a 25°C. La toma de muestra se realizó a tiempo 0 (muestra recién picada) y a las 5, 8, 14, 19 y 23 horas. Con la finalidad de determinar la variación del espectro de impedancia con el crecimiento microbiano, se retiraron tres muestras de la estufa para cada uno de los tiempos y se determinó el nivel de aerobios mesófilos en agar Plate Count (PCA)

(Scharlau, Chemie, S. A., Barcelona, España) (UNE-EN ISO 4833, 2003) y el espectro de impedancia con los electrodos AC y PF. Adicionalmente, se midió el pH, puesto que es una variable fisicoquímica de rápida determinación relacionable con el desarrollo microbiano (pHmetro BASIC 20+, Crison Instruments, S. A., Barcelona, España). De cada muestra se realizaron cinco repeticiones del espectro, tres determinaciones de pH y siembra en placa por duplicado.

Fase 3: Determinación del espectro de impedancias en el jamón curado

Finalmente se determinó el espectro de impedancia en un producto cárnico. Se analizaron trece jamones curados, que habían finalizado su proceso de elaboración: cinco normales o sin alteración (N), cuatro con alteración microbiana ó hinchados (T) y cuatro afectados por ácaros (A). De cada jamón se extrajo asépticamente una sección transversal alrededor de la articulación de unos 15 cm de espesor. De esta, se obtuvo una muestra de la zona contigua al hueso (zona a), y otra, de una zona radialmente más alejada del hueso (zona b), según la norma UNE-EN ISO 6887-2 (2004). Se determinó el espectro de impedancias para cada una de las zonas, utilizando los tres electrodos y realizando seis repeticiones para cada muestra.

Para cada uno de los trece jamones descritos anteriormente, se tomaron asépticamente 25 g de muestra de las zonas a y b. Se determinaron las unidades formadoras de colonias (ufc/g) de aerobios mesófilos (UNE-EN ISO 4833, 2003) en agar Plate Count (PCA) (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España), aerobios mesófilos halotolerantes en PCA con 10% NaCl (Tomlinson, 1995), ácido lácticas, lactosa positivo (ISO 15214/1998) en agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Difco, BD & Co., Sparks, MD., EEUU), *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2/2004) en agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG) (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España), *Micrococcaceae* (Cordero, 2000) en agar Manitol Sal (MSA) (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España), *Clostridium* sulfito-reductores (Tomlinson, 1995) en agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España), mohos y levaduras (ISO 7954/1987) en agar Cloranfenicol, Glucosa (CGA) (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España). En adición al análisis microbiológico, se realizó una descripción macroscópica de los jamones T y A.

Análisis Estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó empleando Statgraphics Centurion XV versión 15.2.06 (Manugistics Corp., Rockville, Md.), con un nivel de confianza de 95%. Para evaluar la significación de los factores y sus interacciones se realizaron ANOVAs, cuando estos resultaron significativos se analizaron las diferencias entre los distintos niveles mediante Pruebas de Múltiple Rangos utilizando el procedimiento de de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) para discriminar entre las medias.

La diferenciación entre muestras en base a las medidas de impedancia, se determinó a través de Análisis Discriminantes, precedidos en los casos que se especifique, de un Análisis de Componentes Principales, en el que los componentes extraídos estaban limitados a aquellos con un eigenvalor mayor o igual a 1. Para observar la relación entre las medidas de impedancia y algún parámetro fisicoquímico o microbiológico, se realizaron análisis de regresión de Mínimos Cuadrados Parciales, en los cuales la validación cruzada se realizó extrayendo una observación a la vez.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Espectrometría de impedancia en medio líquido aplicada a la determinación de la carga microbiana

Los valores de impedancia obtenidos con los tres electrodos utilizados en este estudio se sometieron a un análisis de componentes principales, seguido de un análisis discriminante. De los tres electrodos, el que mostró mayor sensibilidad para distinguir entre las concentraciones de microorganismos, fue el electrodo doble (ED), cuya configuración geométrica se asemeja a la que normalmente adoptan los electrodos utilizados en las técnicas de Microbiología de Impedancia (Ramírez, 2009). En la figura 2, se muestran las funciones discriminantes de las medidas de impedancia para dicho electrodo. En esta se observa la separación de las muestras en tres grupos, según la carga microbiana presente, obteniéndose un porcentaje de clasificación correcta de los casos de un 96,67% (tabla 1). Se aprecia una cierta dispersión de los puntos, que podría deberse a que las medidas de impedancia estarían afectadas por la posición de los electrodos, la geometría del medio, la generación de vórtices y el calentamiento de las muestras debido a la agitación (Chanet, 1999). Sin embargo, se aprecia una clara distinción entre las muestras extremas, 10^2 y 10^6 ufc/mL, con un gradiente de concentraciones de izquierda a derecha, de valores de menor a mayor concentración. De esta manera, se puede afirmar que la presencia de células y/o metabolitos influye en el valor de la impedancia, aún cuando la acción de los microorganismos no ha modificado la composición del medio.

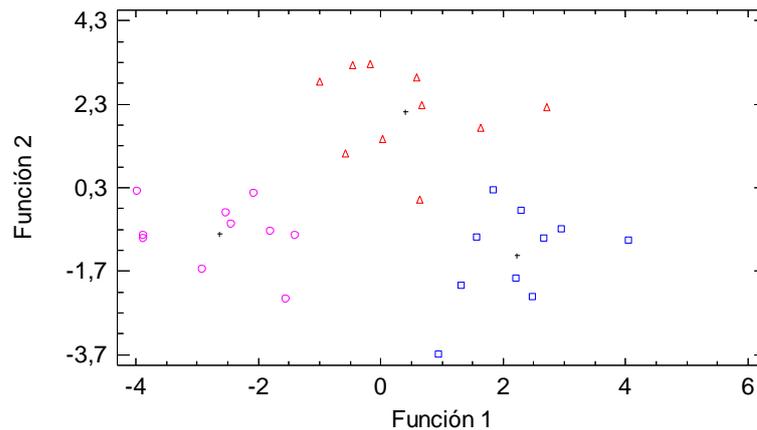


FIGURA 2. Funciones discriminantes de las medidas de impedancia en diluciones de microorganismos (ufc/mL) (○ 10^2 △ 10^4 □ 10^6 + Centroides)

TABLA 1. Clasificación de las muestras según la concentración a partir de las funciones discriminantes obtenidas de los espectros de impedancia

Real (ufc/mL)	Tamaño de Grupo	Predicho (ufc/mL)		
		10^2	10^4	10^6
10^2	10	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
10^4	10	0 (0%)	9 (90%)	1 (10%)
10^6	10	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)

Espectrometría de impedancia aplicada a la determinación del crecimiento microbiano en una matriz sólida (carne picada de cerdo)

En la Tabla 2, se observa el aumento progresivo de la población de microorganismos a medida que transcurre el tiempo, hasta llegar a un valor relativamente estable, alrededor de 10^8 ufc/g después de 14 horas. Por otra parte, se aprecia la disminución del pH en el transcurso del experimento, debido principalmente, a la formación ácido láctico y acético, como consecuencia del desarrollo microbiano (Talaro, 2005).

En cuanto a los espectros de impedancia (Figura 3), se observa un descenso en los valores del módulo, siendo en el rango de frecuencias entre 1 y 100 Hz, donde se aprecian diferencias más importantes. En el caso de los valores de fase fue el rango comprendido entre las frecuencias entre 1 y 800 Hz aproximadamente, donde se produjeron las mayores variaciones. La actividad enzimática endógena de la carne y en mayor medida, la acción de los microorganismos, degrada las membranas musculares afectando su permeabilidad y permitiendo que los iones Na^+ , K^+ y Cl^- presentes en el citoplasma y en el espacio extracelular tengan mayor movilidad, aumentando la conductividad y por lo tanto, disminuyendo el módulo de impedancia

(Byrne, 2000; Pliquett, 2003). Adicionalmente, el aumento de iones H⁺, demostrado en el descenso del pH, contribuye a este fenómeno. En ese sentido, la relación del pH con la impedancia, ha sido demostrada en otros estudios (Byrne, 2000).

TABLA 2. Crecimiento microbiano y variación del pH (media y error estándar) en función del tiempo para carne picada de cerdo almacenada a 25°C.

Muestra	Tiempo (h)	log (ufc/g)	pH
1	0	3,45 ± 0,21 ^a	6,23 ± 0,02 ^a
2	5	4,61 ± 0,66 ^b	5,98 ± 0,01 ^b
3	8	5,07 ± 0,47 ^b	6,08 ± 0,12 ^{ab}
4	14	8,19 ± 0,04 ^c	5,85 ± 0,12 ^c
5	19	8,15 ± 0,03 ^c	5,83 ± 0,03 ^c
6	23	8,47 ± 0,01 ^c	5,82 ± 0,12 ^c

Valores con distinta letra en cada columna indican diferencias significativas según el test LSD (p<0.05)

Se realizó un análisis de componentes principales de las medidas de impedancia seguido de un análisis discriminante, cuyos resultados se aprecian en la figura 4. Para ambos electrodos, PF y AC, las muestras 1, 2 y 3 se agrupan en una zona a la izquierda y son las que poseen menor carga microbiana (p<0,05), inferior a 10⁵ ufc/g (tabla 2). Por otra parte, las muestras 5 y 6 se agrupan en una zona a la derecha, siendo estas las que presentaron mayores recuentos. En una zona intermedia, bastante notable con el electrodo PF, se sitúa la muestra 4 (Figura 4b), que aunque su carga microbiana no tiene diferencias significativas con las muestras 5 y 6 (p>0,05), el análisis discriminante revela diferencias entre ellas. Esto puede deberse a que los diferentes metabolitos producidos por los microorganismos en la matriz cárnica, varían con el tiempo para la misma carga microbiana una vez alcanzada la fase de desarrollo estacionario, y son estos metabolitos los que hacen variar el espectro de impedancia (Talaro, 2005). Sin embargo, aunque el descenso del pH sea reflejo de la degradación de la matriz por parte de los microorganismos y de la producción de ácidos (Ramirez, 2009), no existen diferencias significativas (p<0,05) entre los valores de pH para las muestras 4, 5 y 6. Esto indica que otros parámetros pueden ser más relevantes en las diferencias encontradas en las medidas de impedancia. En este sentido, se requieren más estudios para determinar cuáles son los metabolitos determinantes en las variaciones del espectro y a través de qué técnica analítica podrían medirse.

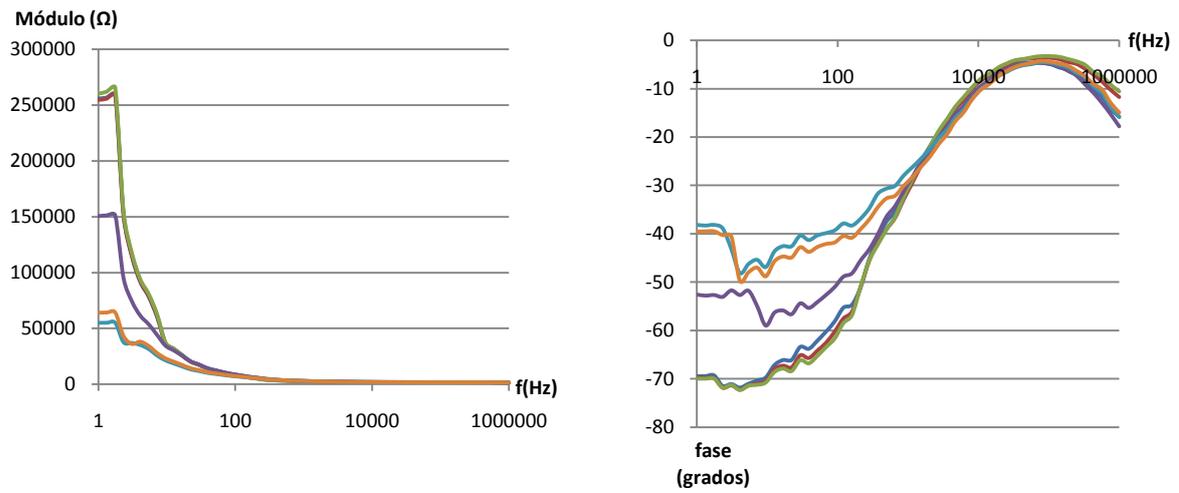


FIGURA 3. Espectro de impedancias (módulos y fases promedio) con el electrodo de PF (Muestra: — 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6).

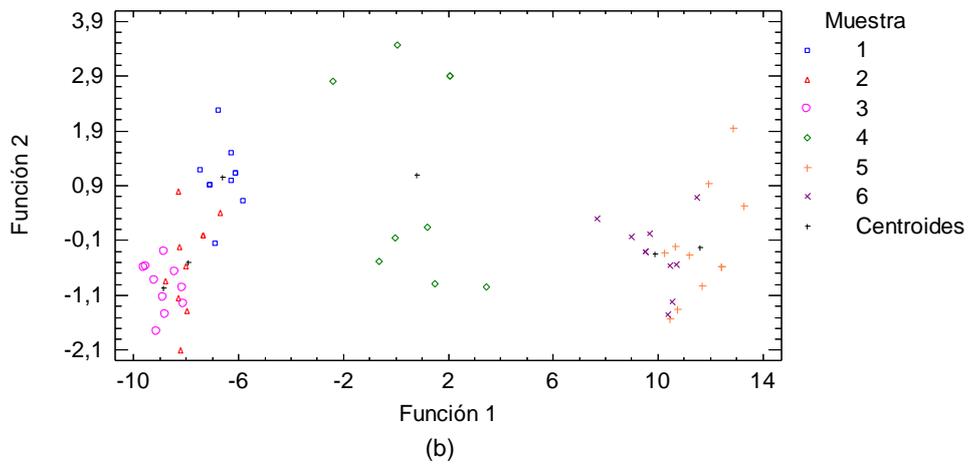
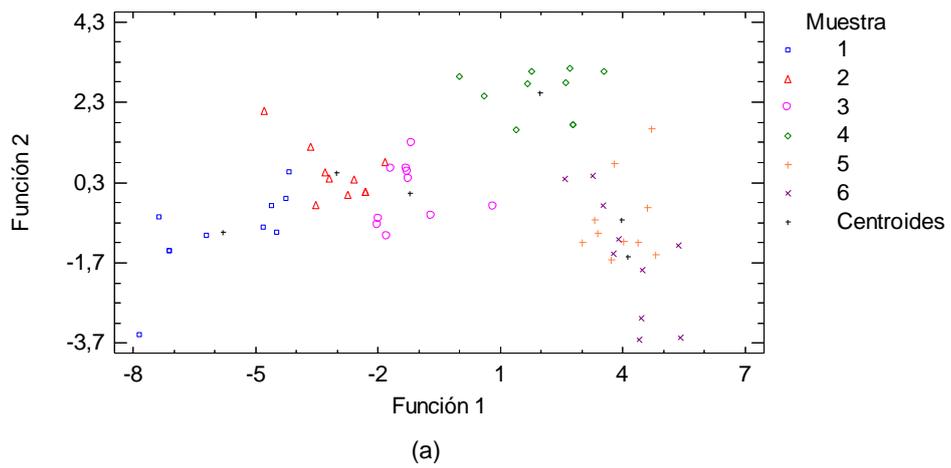


FIGURA 4. Análisis Discriminante de las medidas de impedancia para los electrodos AC (a) y PF (b) en carne de cerdo.

A través de una regresión de mínimos cuadrados parciales, se obtuvo una buena correlación entre las medidas de impedancia y el crecimiento microbiano, según los resultados de la tabla 3 y la figura 5, lo cual indicaría que la espectrometría de impedancia, medida directamente sobre la matriz sólida (carne en este caso) permitiría seguir el desarrollo microbiano. Igualmente, se obtuvo un buen ajuste para los valores de pH, aunque con una R^2 algo inferior, demostrando la relación entre el crecimiento microbiano y el descenso del pH. De los dos electrodos, el PF fue el más acertado en la descripción de la carga microbiana, tomando en cuenta el valor de R^2 mostrado en la tabla 3. Como se mencionó anteriormente, aún queda por esclarecer cuáles son los compuestos químicos relacionados con el crecimiento microbiano que son determinantes en la variación del espectro de impedancia. Es de suponer que la identidad y la concentración de estas sustancias estarían sujetas en gran medida a las especies microbianas presente en el producto.

Tabla 3. Comprobación cruzada en la regresión de mínimos cuadrados parciales de los valores de impedancia obtenidos para carne picada de cerdo.

Electrodo	R^2 (%)	
	ufc/g	pH
PF	93,9	78,8
AC	91,2	85,0

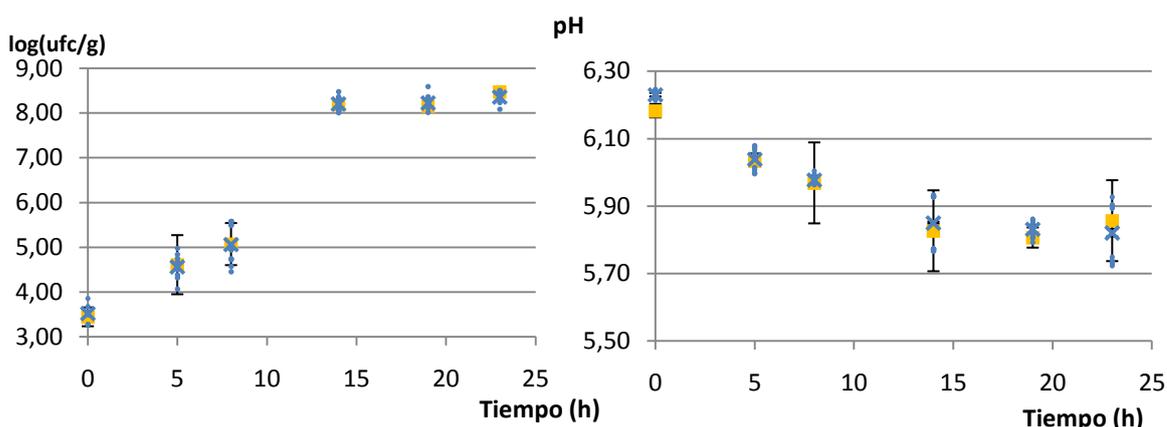


FIGURA 5. Valores predichos por el análisis de mínimos cuadrados parciales (electrodo PF) aplicado a los recuentos microbianos (log ufc/g) y el pH (■ Real • X Predicho)

Espectrometría de impedancias aplicada a la determinación de alteraciones en el jamón curado y su relación con la carga microbiana

Se analizaron los espectros de impedancias para los distintos tipos de jamones y se intentó evaluar la posibilidad de utilización de las medidas de impedancia para clasificar los jamones en función de la presencia o no de alteraciones.

A nivel macroscópico, los jamones hinchados (T) mostraban características propias de la llamada alteración profunda, como el notable desprendimiento de olores ácidos y putrefactos. Córdoba (2001), atribuye estos olores a la formación de ácidos (acético, fórmico y butírico), amoníaco, aminas, indol, compuestos azufrados y ácido sulfhídrico. El aspecto hinchado de las piezas es debido a la excesiva formación de estos últimos compuestos. En el interior de la pieza se observaron zonas de textura blanda o pastosa, lo cual se adjudica a una intensa proteólisis (Virgili, 1995; Córdoba, 2001). Uno de los jamones, destacaba por la presencia de larvas, específicamente *Piophyla casei* ("saltón"), la larva más común en este tipo de alteraciones (Córdoba, 2001). Por otra parte, Los jamones con ácaros (A) presentaban en la superficie el polvo característico de este tipo de alteración. En uno de estos jamones, se encontraron bolsas con ácaros en el interior de la pieza ("coquera").

Los resultados obtenidos respecto a la microbiota presente en los distintos jamones analizados se muestran en la Tabla 4. A partir de los datos experimentales, se realizaron ANOVAs para cada uno de los grupos microbianos analizados, en los que se consideró como factores la zona de muestreo (a ó b) y el tipo de jamón (N, T ó A), no siendo significativos ($p > 0,05$) ni el factor zona, ni la interacción zona-tipo. Por el contrario, se halló un efecto significativo ($p < 0,05$) del factor tipo de jamón para algunos de los grupos microbianos analizados (aerobios mesofilos, halotolerantes, micrococáceas y mohos-levaduras). En el caso de las bacterias ácido lácticas, no se apreciaron diferencias significativas. Por otra parte, no se encontraron cantidades significativas en los recuentos de enterobacterias ni de microorganismos sulfito reductores para los tres tipos de jamones estudiados.

Al analizar las diferencias entre los distintos niveles del factor tipo, o sea entre los tres tipos de jamones analizados (N, T y A) para aerobios mesofilos, halotolerantes, micrococáceas y mohos-levaduras se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los recuentos promedios obtenidos para los jamones T y N. Cabe destacar que se detectó una considerable dispersión en los resultados lo que se explicaría por la variabilidad propia de los jamones utilizados, confirmada en análisis fisicoquímicos realizados en un estudio paralelo (Pérez; resultados pendientes de publicación). En general, en base a los resultados de la tabla 6, los jamones hinchados (T) tendieron a presentar la mayor carga microbiana seguida de los jamones con ácaros (A).

TABLA 4. Recuentos microbianos expresados (log ufc/g) (promedio y error estándar) para cada tipo de jamón.

Tipo	Zona	Aerobios Mesófilos	Enterobacterias	Sulfito Reduct.	Micrococáceas	Aerob. Halotolerantes	Acido lácticas	Mohos y levaduras
N	a	4,29±0,94 ^c	-	-	1,75±1,64 ^b	3,19±1,12 ^d	4,21±2,53 ^a	1,63±1,5 ^e
	b	3,76±0,9 ^c	-	-	2,14±1,26 ^b	2,94±1,7 ^d	5,28±0,99 ^a	1,66±1,57 ^e
	Media	4,02±0,91^x	-	-	1,95±1,40^x	3,06±1,36^x	4,75±1,90^x	1,64±1,45^x
T	a	6,95±2,04 ^c	-	-	6±1,51 ^b	7,16±1,9 ^d	5,66±1,45 ^a	3,98±1,15 ^e
	b	6,77±1,76 ^c	-	-	5,7±1,45 ^b	6,83±1,74 ^d	5,62±1,55 ^a	3,17±2,31 ^e
	Media	6,86±1,77^y	-	-	5,85±1,38^y	6,99±1,7^y	5,64±1,74^x	3,58±1,74^y
A	a	4,79±0,56 ^c	-	-	4,47±0,68 ^b	4,2±0,36 ^d	4,75±1,36 ^a	1,3±1,51 ^e
	b	5,39±1,06 ^c	-	-	4,98±0,41 ^b	4,84±0,59 ^d	5,88±0,97 ^a	0,83±1,66 ^e
	Media	5,09±0,85^x	-	-	4,72±0,59^y	4,52±0,57^z	5,31±1,25^x	1,06±1,49^x

Valores con distinta letra en cada columna indican diferencias. Las medias con diferente letra indican diferencias significativas ($p < 0.05$) significativas según el test LSD ($p < 0.05$)

En jamones normales, al final del proceso de elaboración, Marín (1993), obtuvo resultados similares a los observados en el presente estudio. Así, los recuentos de aerobios mesófilos obtenidos por este autor fueron de 4,20 log ufc/g y los de aerobios halotolerantes de 4,36 log ufc/g. En cuanto a las enterobacterias, encontró una cantidad no significativa (4,3 NMP/g), al igual que para los sulfito reductores, cuyos recuentos fueron inferiores a las 10 ufc/g en las diferentes etapas del proceso de elaboración del producto.

En este estudio, los jamones con alteración profunda (T) presentaron una alta población de aerobios mesófilos (Tabla 4), resultado que evidencia la mala calidad higiénica de las piezas, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los jamones normales y con ácaros. Por otra parte los jamones con acaros presentaron niveles similares a los de los jamones normales.

Como se ha comentado anteriormente no se encontraron cantidades significativas de enterobacterias en ninguno de los jamones analizados. Sin embargo, García (2000) señala a las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* como responsables del deterioro microbiológico de los jamones, específicamente, *Serratia sp.* y *Proteus sp.*, basándose en que estos microorganismos se han relacionado con el deterioro de diversos productos cárnicos. En el presente estudio, el hecho de no haber detectado enterobacterias en los jamones alterados, indica que estas habrían muerto o perdido viabilidad después de haber producido la alteración, debido a que la actividad de agua del producto final impide su desarrollo. Estos resultados son similares a los obtenidos por Marín (1996) y Cordoba (2001). Por su parte, Losantos (2000), confirmó este argumento al observar que microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* aislados en jamones alterados, no crecían cuando los valores de actividad de agua se situaban en

torno a 0,93. En los jamones alterados analizados, en este trabajo, la a_w no superó este valor, excepto en un caso, cuya a_w fue 0,94 (Pérez, pendiente de publicación).

La ausencia de *Clostridium* puede deberse a que tanto las células vegetativas, como sus esporas, se inhiben en presencia de las sales de curado (Kemp, 1980).

La aparición de zonas blandas o pastosas observadas en los jamones T, se relaciona con el desarrollo de Micrococáceas y levaduras de alta capacidad proteolítica (Rodríguez, 1994; Córdoba, 2001). Esto coincide con los recuentos obtenidos para este tipo de jamones, en los que la población de mohos-levaduras, y microcáceas fue significativamente mayor que la de los jamones N ($p < 0,05$). En cuanto a las micrococáceas, muchos autores señalan que son las bacterias predominantes en el jamón curado, especialmente el género *Staphilococcus* y la especie *S. xylosus* (Rodríguez, 1994; García, 2000; Córdoba, 2001). Su carácter halotolerante y su resistencia a bajas a_w y altas presiones osmóticas, hace posible que puedan estar presentes en las diferentes etapas de elaboración. La actividad proteolítica y lipolítica de estos microorganismos también se ha relacionado con las características organolépticas finales del jamón curado no alterado (Rodríguez, 1994). Marín (1996), destaca como agentes responsables de la alteración profunda, además de las enterobacterias, a *Micrococcus sp.* y *Lactobacillus sp.*

En el caso de las bacterias halotolerantes, resaltan los altos recuentos que presentaron los jamones T (Tabla 4). Como es de esperarse, un aumento en la población de micrococáceas va acompañado de un alto recuento de halotolerantes, debido a su resistencia a la sal. Por otra parte, algunos autores señalan que la aparición de putrefacciones en el interior de la pieza se debe a la presencia de altos niveles de bacterias halotolerantes, como *Kurthia zopfii*, la cual aparece constantemente en jamones alterados debido a la contaminación de la sal (Benezet, 2010). Por otra parte, Rastelli (2005), detectó la existencia de *Marinilactibacillus psychrotolerans* en jamones curados con alteración profunda, y señalaron que su presencia se debe principalmente a la contaminación de la sal. Otros microorganismos como bacterias ácido lácticas, mohos, levaduras y micrococáceas también pueden tener su origen en la sal de curado (Cordero, 2000).

En el caso de los jamones con ácaros los grupos microbianos para los cuales se observaron recuentos significativamente superiores a los detectados en los jamones no alterados fueron micrococáceas y halotolerantes ($p < 0,05$). Para el primer grupo de microorganismos los recuentos fueron el mismo orden que los detectados para los jamones T y para el segundo grupo intermedios entre los observados para los jamones T y N. Según Córdoba (2001), la presencia de ácaros en el interior del jamón, se relaciona con aumentos en los recuentos microbianos debido a que estos, al penetrar en la pieza, favorecen el acceso de los microorganismos, además de ser en sí mismos posibles portadores de los mismos.

Para los jamones T y A se desconoce la etapa del proceso en la que comenzó la alteración, y por lo tanto, el tiempo transcurrido hasta que se realizaron los análisis. Esto puede afectar la viabilidad de los

microorganismos y los recuentos obtenidos debido a la variación de las condiciones ambientales en las distintas etapas del proceso y los cambios en las características fisicoquímicas que atraviesa el producto en dichas etapas.

Considerando los resultados mostrados en la tabla 6, se realizó un análisis de componentes principales seguido de un análisis discriminante, considerando todos los grupos microbianos analizados y promediando los valores de las zonas a y b (al no haberse observado diferencias significativas entre ellas para el intervalo de confianza de 95%) obteniéndose un único valor para cada tipo de microorganismo. El resultado se muestra en la figura 6 en la que se observa una clara distinción entre los tres tipos de jamón, dada la separación de los puntos que se obtienen al graficar las funciones discriminantes. Seguidamente, en la tabla 5 se indica la distribución de las muestras según las funciones discriminantes para cada tipo de jamón. En este análisis se obtuvo una clasificación correcta del 100% de las muestras analizadas, demostrándose que la carga microbiana permite diferenciar entre los tres tipos de muestra.

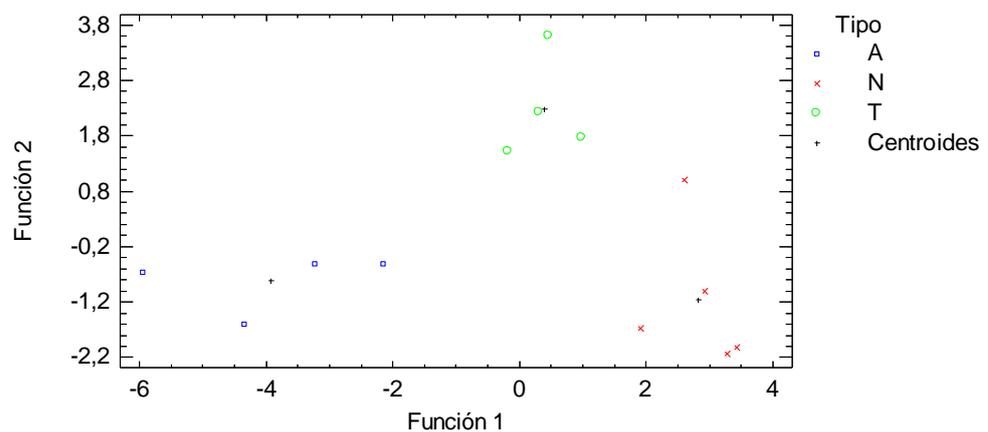


FIGURA 6. Funciones discriminantes de los jamones en base a los recuentos microbianos (promediando las zonas a y b)

TABLA 5. Clasificación de las muestras según el análisis discriminante para el tipo de jamón considerando los valores promediados de las zonas a y b.

Real (Tipo)	Tamaño de Grupo	Predicho (Tipo)		
		A	N	T
A	4	4 (100,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
N	5	0 (0,00%)	5 (100,00%)	0 (0,00%)
T	4	0 (0,00%)	0 (0,00%)	4 (100,00%)

Por otra parte, en la Figura 7 se observan los discriminantes obtenidos para las medidas de impedancia de los tres tipos de jamón curado analizados. Para los tres electrodos se obtuvo un 100% de clasificación correcta.

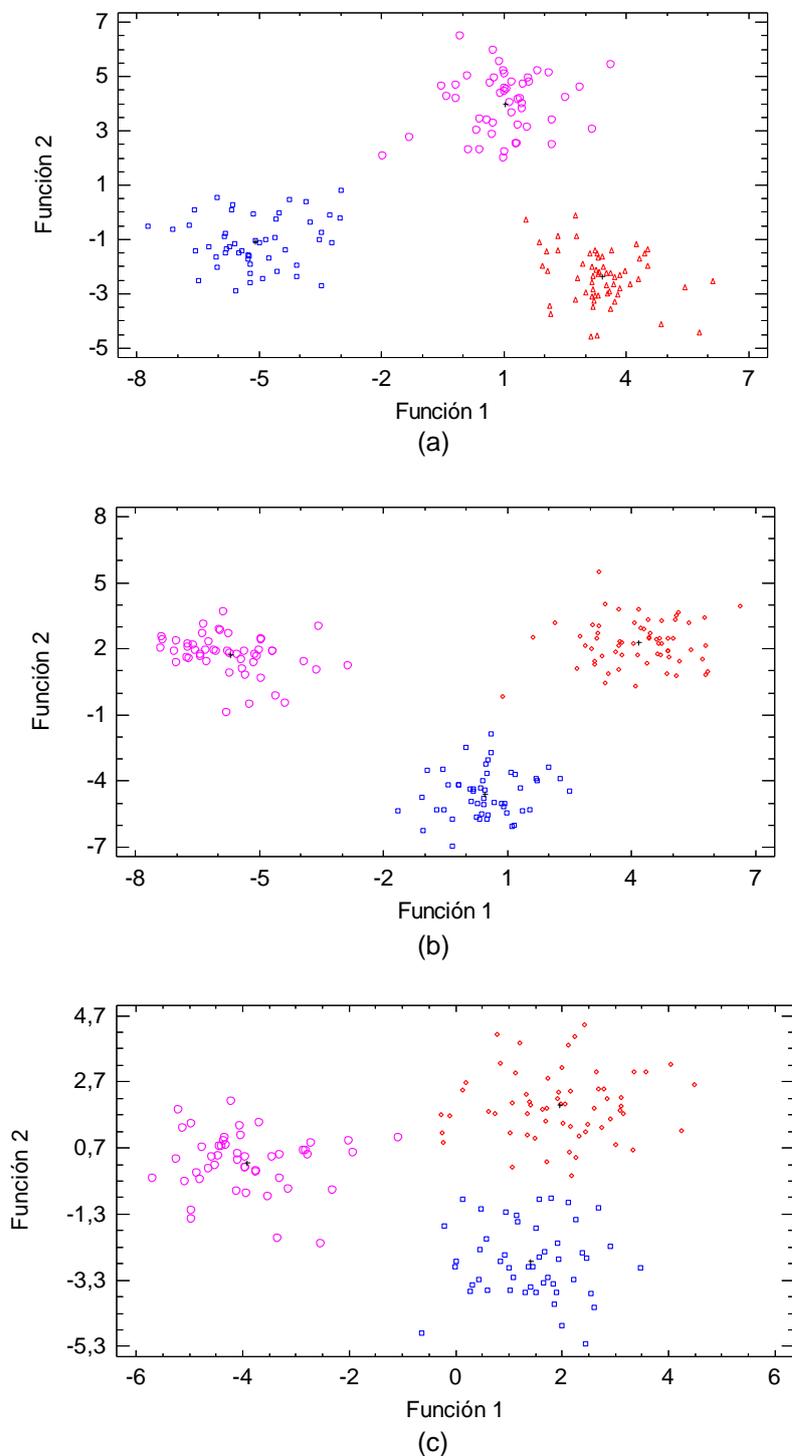


FIGURA 7. Análisis discriminante de los valores de impedancia de los jamones curados con los electrodos AC (a), PF (b) y ED (c). (Leyenda: \square A \diamond N \circ T + Centroides)

Las diferencias observadas en las gráficas correspondientes a cada electrodo, se deben a que estos tienen una geometría distinta. En este aspecto los electrodos AC y PF comprenden una separación pequeña entre sus terminales, mucho menor para el AC. El ED posee dos terminales bastante separados, por lo cual el resultado de la medida se relaciona con un volumen de muestra mucho mayor y en consecuencia, la respuesta que proporciona este electrodo es más vulnerable a la presencia de posibles zonas con cantidades irregulares de grasa o tejido conectivo, que pueden producir desviaciones importantes en la medida. Mientras la separación de los terminales sea menor, el volumen muestreado es más pequeño y la posibilidad de encontrar zonas muy heterogéneas disminuye. Esto se refleja en que la dispersión de las medidas con respecto a los centroides sea mayor para el ED (Figura 7c).

La tabla 6 muestra el valor de R^2 (%) obtenido en la validación cruzada del análisis de Mínimos cuadrados parciales, en el que se incluyó los resultados promediados del análisis microbiológico de todos los jamones y los de variables fisicoquímicas obtenidas para las mismas muestras en un estudio paralelo (Pérez, pendiente de publicación).

Tabla 6. Regresión de mínimos cuadrados parciales para las medidas de impedancia con los tres electrodos, aplicada al jamón curado

Variable	R^2 (%)		
	PF	AC	ED
a_w *	51,0401	37,761	33,1773
%Sal*	39,8140	35,3051	20,0523
%Grasa*	20,5021	6,88446	18,3057
%Humedad*	62,4729	64,9801	43,499
Ac. Lácticas	15,0130	0	5,683
Micrococáceas	54,6656	0	16,0619
A. Mesófilos	33,4499	5,66665	2,90598
Halotolerantes	38,3866	9,04788	8,74983
Mohos y levaduras	16,1948	10,0753	1,86226

*Pérez, pendiente de publicación

Se observa que la relación entre las medidas de impedancia y las variables fisicoquímicas es más estrecha que la obtenida para los recuentos microbianos. Para los tres electrodos, los valores más altos se corresponden a los de %Humedad, lo cual es de esperarse debido a que el carácter polar de la molécula de agua domina sobre los otros componentes (Kent, 1990) Por otra parte, para los recuentos microbianos se obtiene una mejor correlación para las micrococáceas. Como se mencionó anteriormente, estos microorganismos se encuentran ampliamente difundidos en los productos crudo curados y pueden jugar un papel importante en las características finales de los mismos. Sin embargo, para ninguna de las variables mostradas en la Tabla 6, se observa una correlación lo suficientemente alta

para decir que es determinante en la respuesta obtenida en las medidas de impedancia. Se necesitan más estudios en el jamón curado o en productos similares profundizando en otras variables asociadas con la elaboración y deterioro de este tipo de productos, como pueden ser los índices de proteólisis y lipólisis, o más en profundidad, la cuantificación de ácidos y aminoácidos generados en la evolución de estos productos y que posiblemente, guardan una relación con los valores de impedancia.

CONCLUSIONES

- El equipo experimental utilizado permite diferenciar la carga microbiana a diferentes concentraciones en medio líquido. De los tres electrodos ensayados, el ED mostró mejor capacidad de discriminar entre muestras.
- En una matriz sólida de carne picada de cerdo, el desarrollo microbiano y los cambios de pH asociados, pueden ser descritos a través de la espectrometría de impedancias. A través del electrodo PF, se obtuvo la mejor correlación entre el desarrollo microbiano y los cambios en la impedancia.
- La espectrometría de impedancia permite diferenciar entre jamones normales, aptos para su comercialización y jamones con alteraciones. Los tres electrodos pueden ser utilizados para discriminar entre los tres tipos de jamón, pero es a través del electrodo PF con el que se correlacionan mejor los espectros de impedancia y los recuentos microbianos, específicamente con las ufc/g de micrococáceas.
- El análisis microbiológico mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la carga microbiana de los jamones normales y aquellos con alteración profunda, específicamente en las ufc/g de aerobios mesófilos, micrococáceas, mesófilos halotolerantes, mohos y levaduras. Por otra parte, los jamones con ácaros tienden a poseer una carga intermedia.
- Se debe estudiar en profundidad los géneros y especies de microorganismos usualmente presentes en los productos cárnicos, y correlacionar los metabolitos que producen con los cambios en los espectros de impedancia.
- Se requieren más estudios en las diferentes etapas del proceso de elaboración del jamón curado, especialmente en el post-salado, para determinar si la técnica es capaz de diferenciar la calidad higiénica de la pieza en estados incipientes de alteración, y relacionarlo con parámetros fisicoquímicos y recuentos de los microorganismos típicamente presentes en este producto.

BIBLIOGRAFÍA

- Altmann, M.; Pliquett, U.; Suess, R.; von Borell, E. 2005. Prediction of carcass composition by impedance spectroscopy in lambs of similar weight. *Meat Science* 70, 319–327.
- Benezet, A.; de la Osa, J. M.; Botas, M.; Olmo, N. P.; Pérez, F. 1998. Flora Microbiana de zonas alteradas en Jamón Curado. *Alimentaria*, 292, 33-36.
- Berg, E. P., Marchello, M. J. 1994. Bioelectric impedance analysis for the prediction of fat-free mass in lambs and lamb carcasses. *Journal of Animal Science*, 72, 322-329.
- Byrne, C. E.; Troy, D.J.; Buckley, D.J. 2000. Postmortem changes in muscle electrical properties of bovine *M. longissimus dorsi* and their relationship to meat quality attributes and pH fall. *Meat Science*, 54, 23-34
- Chanet M., Rivière, C., Eynard P. 1999. Electric impedance spectrometry for the control of manufacturing process of comminuted meat products. *Journal of Food Engineering*, 42, 153-159
- Cordero, M. R.; Zumalacárregui, J. M. 2000. Characterization of *Micrococcaceae* isolated from salt used for Spanish dry-cured ham. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 303-306.
- Cordoba, J. J.; Aranda, E.; Benito, M. 2001. Alteraciones originadas por microorganismos, ácaros e insectos en jamones ibéricos. En: Ventanas, J. (ed). *Tecnología del Jamón Ibérico*. Ediciones Multi-Prensa. 469-486.
- Daza, A.; Mateos, A.; Ovejero, I.; López Bote, C.J. 2006. Prediction of body composition of Iberian pigs by means bioelectrical impedance. *Meat Science*, 72. 43-46
- García C., Martín, A.; Timón, M. L.; Córdoba, J. J. 2000. Microbial populations and volatile compounds in the “bone taint” spoilage of dry cured ham. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 61-66.
- Hayashi, T., Todoriki, S., Otake, K., Sugiyama, J. 1992. Impedance measuring technique for identifying irradiated potatoes. *Biosci., Biotechnol. Biochem.*, 56, 1929-1932.
- ISO 7954/1987 - General guidance for enumeration of yeasts and moulds -Colony count technique at 25°C.
- ISO 15214/1998 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30°C.
- ISO 21528-2/2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 2: Colony-count method.
- Kemp, J. D.; Abidoye, D. C. O.; Langlois B. E.; Franklin, J. B.; Fox, J. D. 1980. Effect of curing ingredients, skinning and boning on yield quality and microflora of country hams. *Journal of Food Science* 45, 174-177.
- Kent, M.; Anderson, D. 1996. Dielectric Studies of Added Water in Poultry Meat and Scallops. *Journal of food Engineering*, 28, 239-259.
- Kushner, R. F. 1992. Bioelectrical impedance analysis: a review of principles and applications. *Journal of American College of Nutrition*, 11, 199-209.
- Losantos, A.; Sanabria, C.; Cornejo, I.; Carrascosa, A. V. Characterization of *Enterobacteriaceae* strains isolated from spoiled dry-cured hams. 2000. *Food Microbiology*, 17, 505-512.

- Marín, M. E.; de la Rosa, M. C.; Cornejo, I. 1992. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from Spanish dry-cured hams. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1067-1069.
- Marín, M. E.; Carrascosa, A. V.; Cornejo, I. 1996. Characterization of Enterobacteriaceae strains isolated during industrial processing of dry-cured hams. *Food Microbiology*, 13, 375-381.
- Marín, M. E.; Carrascosa, A. V.; Cornejo, I. 1993. Micropoblación saprófita y patógena en la elaboración de jamón serrano. *Alimentaria*, 240 (3), 31-36.
- Paarup, T.; Nieto, J.C.; Peláez C.; Reguera, J. I. 1999. Microbial and physico-chemical characterisation of deep spoilage in Spanish dry-cured hams and characterisation of isolated Enterobacteriaceae with regard to salt and temperature tolerance. *European Food Research and Technology* 209, 366-371.
- Pérez Vilches, R. Pendiente de publicación. Aplicación de técnicas no destructivas para la caracterización del jamón curado. Tesis de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Pliquett, U.; Altmann, M.; Pliquett, F.; Schöberleind, L. 2003. Py - a parameter for meat quality. *Meat Science* 65, 1429-1437.
- Rastelli, E.; Giraffa, G.; Carminati, D.; Parolari, G.; Barbuti, S. 2005. Identification and characterization of halotolerant bacteria in spoiled dry-cured hams. *Meat Science*, 70, 241-246.
- Rodríguez, M.; Núñez, F.; Córdoba, J. J.; Sanabria, C.; Bermúdez, E.; Asenio, M. A. 1994. Characterization of *Staphylococcus spp.* And *Micrococcus spp.* Isolated from Iberian ham throughout the ripening process. *Journal of Food Microbiology* 24, 329-335.
- Serway, R.; Beichner, R. 2002. Física para ciencias e ingeniería. Tomo II. McGraw-Hill.
- Talaro K. P. Foundations in microbiology. 2002. 4ta edición. McGraw-Hill.
- Tomlinson, I. A. 1995. Food and drug administration bacteriological analytical manual 8^o Edición. AOAC International.
- UNE-EN ISO 4833 - Microbiología de alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30°C.
- UNE-EN ISO 6887-2 - Microbiología de los alimentos para consume humano y animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales para el análisis microbiológico. Parte 2: Reglas específicas para la preparación de carnes y productos cárnicos.
- Untermann, F.; Muller, C. 1992. Influence of a_w value and storage temperature on the multiplication and enterotoxin formation of staphylococci in dry-cured raw hams. *International journal of food microbiology*. 16, 109-115.
- Virgili, R.; Parolari, G.; Schivazappa, C.; Soressi-Bordini, C.; Borri, M. 1995. Sensory and Quality of dry-cured ham as affected by endogeneous cathepsin B activity and muscle composition. *Journal of food science* 60, 1183-1186.