

# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**



**DESARROLLO DE ADITIVOS COMESTIBLES CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y  
ANTIMICROBIANA Y SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICO  
AGROPECUARIAS EN EL ÁREA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**PRESENTA**

**M.C. MARÍA JOSEFINA GRACIANO CRISTÓBAL**

**DIRECTOR**

**DRA. MARÍA TERESA SUMAYA MARTÍNEZ**

**XALISCO, NAYARIT., JUNIO DEL 2019**



Tepic, Nayarit, 18 Junio del 2019

**Dr. Juan Diego García Paredes**  
**Coordinador del Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias**  
**Universidad Autónoma de Nayarit**  
**PRESENTE**

Los que suscribimos, integrantes del Comité Tutorial de la M. en C. María Josefina Graciano Cristóbal declaramos que hemos revisado la tesis titulada "DESARROLLO DE ADITIVOS COMESTIBLES CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA Y SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS" y determinamos que cumple con los requisitos y condiciones necesarias para ser presentada por la alumna para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológico Agropecuarias, Área de Ciencias Agrícolas.

Sin otro particular, reciba un saludo cordial

**ATENTAMENTE**

**Dra. María Teresa Sumaya Martínez**  
**Director**

**Dr. Rosendo Balois Morales**  
**Co-director**

**Dr. Edgar Iván Jiménez Ruiz**  
**Asesor**

**Dr. Javier Germán Rodríguez Carpena**  
**Asesor**

**Dr. Pedro Ulises Bautista Rosales**  
**Asesor**

**Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillan**  
**Asesor**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**

CBAP/100/19.

Xalisco, Nayarit; 21 de junio de 2019.

**M.C. GLORIA MACHAIN IBARRA**  
**DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**NIVEL SUPERIOR Y POSGRADO**  
**P R E S E N T E.**

Con base al oficio de fecha 18 de junio del presente, enviado por los CC. **Dra. María Teresa Sumaya Martínez, Dr. Rosendo Balois Morales, Dr. Edgar Iván Jiménez Ruíz, Dr. Javier Germán Rodríguez Carpena, Dr. Pedro Ulises Bautista Rosales y Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán**, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha finalizado con los demás requisitos que establece nuestra institución, se autoriza a la **M.C. María Josefina Graciano Cristóbal**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Agrícolas.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
*"Por lo Nuestro a lo Universal"*

Dr. J. Diego García Paredes  
Coordinador del Posgrado



C.c.p.- Expediente

&meftm



## DEDICATORIAS

A **DIOS** por el regalo de la vida.

A mis **Padres** por su infinito apoyo y amor.

A mis **Hermanos** por su cariño y apoyo incondicional.

### A la memoria de:

Mi Tío Oscar Cristóbal Rentería†.

Mi Abuelita María Ramírez Muñoz†.



## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de la presente investigación.

Al Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit por el apoyo recibido a lo largo de estos años de preparación académica.

A mi comité tutorial: Dra. María Teresa Sumaya Martínez, Dr. Rosendo Balois Morales, Dr. Javier Germán Rodríguez Carpena, Dr. Edgar Iván Jiménez Ruiz, Dr. Pedro Ulises Bautista Rosales y Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán por compartir sus conocimientos, por guiarme y por el apoyo recibido durante la realización de esta investigación.

Al personal del Centro Nayarita de Innovación y Transferencia Tecnológica, especialmente al Dr. Javier Germán Rodríguez Carpena por su valioso y gran apoyo para la realización de la segunda y tercera fase de esta investigación, así como por todos sus conocimientos compartidos. Así mismo, mi gratitud a la M. C. María Elena Luna Castañeda y M. C. Sarahy Navidad Murrieta por dedicar parte de su tiempo para el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Pedro Ulises Bautista Rosales y al M. C. Yolotzin Apatzingán Palomino Hermosillo por todos sus conocimientos compartidos en el área de microbiología, así como por el apoyo recibido para la realización de los experimentos realizados en dicha área.

Al personal y compañeros estudiantes del Laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Nayarit por su apoyo y amistad durante el tiempo compartido con ustedes.

A mis amigos: Gibrán López, Mary Luna, Andrés Concepción, Aracely Muñoz, Yael Pérez, Olí Ramírez, Evelyn Hernández y Nelly Macías gracias por sus palabras de ánimo, por escucharme y apoyarme.



## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	IX
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	X
<b>RESUMEN</b> .....	XII
<b>ABSTRACT</b> .....	XIV
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	4
2.1. Especies culinarias.....	4
2.1.1. Propiedades antioxidantes de las especias.....	6
2.1.2. Propiedades antimicrobianas de las especias.....	7
2.2. Aditivos comestibles.....	8
2.3. Reacción de <i>Maillard</i> .....	11
2.3.1. Glicación de proteínas en alimentos.....	14
2.3.2. Acrilamida.....	16
2.4. Carne de cerdo.....	19
2.4.1. Factores que afectan la calidad de la carne de cerdo.....	20
2.4.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	21
2.4.1.2. Oxidación lipídica.....	23
2.4.1.3. Oxidación proteica.....	26
2.5. Evaluación sensorial.....	28
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	30
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	31
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	32
5.1. Objetivo general.....	32
5.2. Objetivos específicos.....	32
<b>VI. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	34
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37





7.1. Fase 1 del experimento: Elaboración de aditivos comestibles y evaluaciones analíticas.....	37
7.2. Fase 2 del experimento: Aplicación de los aditivos en papas a freír.....	40
7.3. Fase 3 del experimento: Aplicación de los aditivos en carne de cerdo.....	45
7.3.1. Elaboración de sistemas modelo tipo hamburguesas.....	45
7.3.2. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de los aditivos incorporados en carne cruda de cerdo.....	46
7.3.2.1. Preparación del inóculo.....	46
7.3.2.2. Evaluación antimicrobiana de los aditivos <i>in vitro</i> .....	46
7.3.2.3. Evaluación antimicrobiana de los aditivos <i>in vivo</i> aplicados en hamburguesas de carne cruda de cerdo.....	46
7.3.2.4. Evaluación de acidez titulable en hamburguesas de carne cruda de cerdo recubiertas con aditivo e inoculadas con <i>Escherichia coli</i> .....	47
7.3.2.5. Evaluación de color en hamburguesas de carne cruda de cerdo inoculadas en <i>Escherichia coli</i> .....	48
7.3.3. Evaluación de la estabilidad oxidativa de hamburguesas de carne de cerdo.....	50
7.3.3.1. Preparación del sistema modelo para determinar estabilidad oxidativa.....	50
7.3.3.2. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada.....	50
7.3.3.3. Determinación del total de carbonilos de proteína por la técnica DNPH en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada.....	51
7.3.3.4. Evaluación de color en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada.....	52
7.3.4. Análisis sensorial.....	53
7.3.5. Análisis estadístico.....	54
<b>VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
8.1. Fase 1 del experimento. Elaboración de aditivos comestibles.....	55
8.1.1. Contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de las especias culinarias y binas de especias.....	55
8.1.2. Contenido de compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante, azúcares reductores totales, pH y $a_w$ de los cinco aditivos elaborados.....	65



8.2. Fase 2 del experimento: Aplicación de los aditivos en papas a freír.....	71
8.2.1. Contenido de acrilamida.....	71
8.3. Fase 3 del experimento: Aplicación de los aditivos en carne de cerdo.....	76
8.3.1. Actividad antimicrobiana de los aditivos <i>in vitro</i> .....	76
8.3.2. Actividad antimicrobiana de los aditivos <i>in vivo</i> aplicados en hamburguesas de carne de cerdo cruda.....	78
8.3.3. Porcentaje de acidez titulable en hamburguesas de carne cruda de cerdo recubiertas con aditivo e inoculadas con <i>Escherichia coli</i> .....	82
8.3.4. Color en hamburguesas de carne cruda de cerdo recubiertas con aditivo e inoculadas con <i>Escherichia coli</i> .....	84
8.3.5. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada.....	88
8.3.6. Determinación del total de carbonilos de proteína por la técnica DNPH en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada.....	92
8.3.7. Evaluación de color en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada.....	97
8.3.8. Análisis sensorial.....	105
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>108</b>
<b>X. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>109</b>
<b>XI. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>148</b>





## ÍNDICE DE CUADROS

No.		Página
1.	Estructura y propiedades de la acrilamida.....	16
2.	Ingredientes de los aditivos 1, 2 y 3.....	39
3.	Ingredientes de los aditivos 4 y 5.....	39
4.	Formulación para la elaboración de sistemas modelo tipo hamburguesa de carne de cerdo.....	45
5.	Escala hedónica de siete puntos.....	54
6.	Actividad antioxidante por DPPH• ( $\mu\text{mol ET/L}$ ) de las especias maceradas en disolventes.....	57
7.	Actividad antioxidante por DPPH• ( $\mu\text{mol ET/L}$ ) de las mezclas de dos especias (bina) maceradas en ron.....	60
8.	Potencial de hidrógeno (pH) y actividad de agua ( $a_w$ ) de cinco aditivos.....	69
9.	Número de unidades formadoras de colonias (UFC) en hamburguesas de carne de cerdo cruda inoculadas con <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y almacenadas a 4 °C durante 12 días.....	79
10.	Diferencia total de color ( $\Delta E$ ) entre la muestra sin inóculo y las muestras tratadas en hamburguesas de carne de cerdo cruda inoculadas con <i>E. coli</i> y almacenadas a 4 °C durante 12 días.....	88
11.	Diferencia total de color ( $\Delta E$ ) entre la muestra sin aditivo y las muestras tratadas en hamburguesas de carne de cerdo cruda y almacenada a 4 °C durante 12 días.....	104
12.	Diferencia total de color ( $\Delta E$ ) entre la muestra sin aditivo y las muestras tratadas en hamburguesas de carne de cerdo cocinada y almacenada a 4 °C durante 12 días.....	104



## ÍNDICE DE FIGURAS

No.		Página
1.	Etapas de la reacción de <i>Maillard</i> .....	13
2.	Diseño experimental dividido en tres fases.....	36
3.	Elaboración de los aditivos.....	40
4.	Diagrama de la aplicación del aditivo en papas a freír.....	42
5.	Diagrama de la preparación de la muestra y extracción de acrilamida.....	43
6.	Extracción en múltiple etapas para el análisis de acrilamida en alimentos.....	44
7.	Diagrama de cromaticidad del espacio de color y luminosidad.....	49
8.	Contenido de compuestos fenólicos totales de tres binas.....	62
9.	Actividad antioxidante por el método ABTS●+ de tres binas.....	62
10.	Actividad antioxidante por el método FRAP de tres binas.....	63
11.	Actividad antioxidante por el método ORAC de tres binas.....	63
12.	Actividad quelante de tres binas.....	64
13.	Contenido de compuestos fenólicos totales de cinco aditivos.....	66
14.	Actividad antioxidante por el método DPPH● de cinco aditivos.....	66
15.	Actividad antioxidante por el método ABTS●+ de cinco aditivos.....	67
16.	Actividad antioxidante por el método FRAP de cinco aditivos.....	67
17.	Actividad antioxidante por el método ORAC de cinco aditivos.....	68
18.	Actividad quelante de cinco aditivos.....	68
19.	Contenido de azúcares reductores totales de cinco aditivos.....	69
20.	Contenido de acrilamida en papas fritas.....	71
21.	Concentración de <i>E. coli</i> en CST durante 24 h a 37 °C.....	77
22.	Efecto de los aditivos sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> en hamburguesas de carne de cerdo cruda almacenadas a 4 °C durante 12 días.....	78
23.	Porcentaje de acidez (ácido láctico) de hamburguesas de carne de cerdo cruda inoculadas con <i>Escherichia coli</i> O157:H7 almacenadas a 4 °C durante 12 días.....	84
24.	Efecto de los aditivos sobre la luminosidad o brillantez de las hamburguesas de carne de cerdo cruda inoculadas con <i>E. coli</i> y almacenadas a 4°C durante 12 días.....	85



25.	Efecto de los aditivos sobre el color de las hamburguesas de carne de cerdo cruda inoculadas con <i>E. coli</i> y almacenadas a 4°C durante 12 días.....	87
26.	Efecto de los aditivos sobre la concentración de MDA de las hamburguesas de carne de cerdo cruda y almacenada a 4 °C durante 12 días.....	89
27.	Efecto de los aditivos sobre la concentración de MDA de las hamburguesas de carne de cerdo cocinada y almacenada a 4 °C durante 12 días.....	90
28.	Efecto de los aditivos sobre la concentración de carbonilos de las hamburguesas de carne de cerdo cruda y almacenada a 4 °C durante 12 días.....	93
29.	Efecto de los aditivos sobre la concentración de carbonilos de las hamburguesas de carne de cerdo cocinada y almacenada a 4 °C durante 12 días.....	94
30.	Efecto de los aditivos sobre la luminosidad o brillantez de las hamburguesas de carne de cerdo cruda y almacenada a 4 °C durante 12 días.....	98
31.	Efecto de los aditivos sobre el color de las hamburguesas de carne de cerdo cruda y almacenada a 4 °C durante 12 días.....	99
32.	Efecto de los aditivos sobre la luminosidad o brillantez de las hamburguesas de carne de cerdo cocinada y almacenada a 4 °C durante 12 días.....	100
33.	Efecto de los aditivos sobre el color de las hamburguesas de carne de cerdo cocinada y almacenada a 4 °C durante 12 días.....	101
34.	Efecto de los aditivos en la evaluación sensorial de olor de las hamburguesas cocinadas.....	106
35.	Efecto de los aditivos en la evaluación sensorial de color de las hamburguesas cocinadas.....	106
36.	Efecto de los aditivos en la evaluación sensorial de textura de las hamburguesas cocinadas.....	107
37.	Efecto de los aditivos en la evaluación sensorial de sabor de las hamburguesas cocinadas.....	107



## RESUMEN

Las especias culinarias son fuente importante de compuestos fenólicos que presentan propiedades antimicrobianas y antioxidantes, se han utilizado desde hace siglos para la conservación de alimentos. En años recientes, los extractos de especias culinarias han sido objeto de estudio para mitigar distintas afectaciones negativas que pueden sufrir los alimentos a causa de cambios de temperatura, oxidación y exposición a microorganismos, lo que puede modificar su composición original. El uso de tratamientos térmicos en los alimentos ricos en carbohidratos provoca la formación de diversas glicotoxinas como la acrilamida presente en las papas fritas. Por otra parte, la carne de cerdo se ve afectada por la contaminación bacteriana después de la etapa *post-mortem*, así como por factores ambientales (luz, oxígeno), tratamientos térmicos y de enfriamiento que provocan la oxidación de lípidos y proteínas. La elaboración de aditivos comestibles a base de especias culinarias puede ser una alternativa para tratar dichos problemas. En el presente trabajo se elaboraron cinco aditivos a los que se les determinó el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y actividad antioxidante, los cuales fueron aplicados a papas crudas tipo “a la francesa” para evaluar la inhibición de formación de acrilamida durante el proceso de freído. De los cinco aditivos elaborados se seleccionaron los aditivos #2, #3 y #5 por presentar la mayor concentración de CFT y la mejor actividad antioxidante. Lo anterior para aplicarlos en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada almacenadas en refrigeración por 12 días con el objetivo de impedir la oxidación lipídica y proteica, así como el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7. Aunado a esto, se realizó un análisis sensorial de las hamburguesas cocinadas. Los resultados mostraron que ninguno de los cinco aditivos elaborados logró inhibir la formación de acrilamida en las papas fritas, mientras que de los tres aditivos seleccionados solo el aditivo #5 logró inhibir en las hamburguesas crudas el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7. Respecto a la cantidad de metabolitos secundarios generados por la oxidación lipídica a lo largo del tiempo en refrigeración, los tres aditivos lograron inhibirla tanto en hamburguesas crudas y cocinadas. Sin embargo, con respecto a la cuantificación de carbonilos relacionados a la oxidación proteica, ninguno de los tres aditivos logró inhibirla ni en hamburguesas crudas como



cocinadas. Con respecto a la calidad sensorial de las hamburguesas cocinadas, esta no se vio afectada por el tipo de aditivo utilizado como fuente de variación en el análisis.

**Palabras claves:** especias culinarias, acrilamida, *Escherichia coli* O157:H7, oxidación lipídica, oxidación proteica.



## ABSTRACT

Culinary spices are an important source of phenolic compounds that have antimicrobial and antioxidant properties, they have been used for centuries for food preservation. In recent years, culinary spice extracts have been studied to mitigate different negative effects that food may suffer due to changes in temperature, oxidation and exposure to microorganisms, which can modify its original composition. The use of thermal treatments in foods rich in carbohydrates causes the formation of various glycotoxins such as acrylamide present in potato chips. On the other hand, pork meat is affected by bacterial contamination after the *post-mortem* stage, as well as by environmental factors (light, oxygen), thermal and cooling treatments that cause the oxidation of lipids and proteins. The elaboration of edible additives based on culinary spices can be an alternative to treat said problems. In the present work five additives were elaborated to which the content of total phenolic compounds (CFT) and antioxidant activity were determined, which were applied to raw potatoes "French style" to evaluate the inhibition of acrylamide formation during the frying process. Of the five additives processed, additives #2, #3 and #5 were selected because they had the highest concentration of CFT and the best antioxidant activity. The previous thing to apply them in hamburgers of raw and cooked pork meat stored in refrigeration for 12 days with the objective of preventing the lipid and protein oxidation, as well as the growth of *Escherichia coli* O157: H7. In addition to this, a sensory analysis of the cooked burgers was carried out. The results showed that none of the five elaborated additives managed to inhibit the formation of acrylamide in potato chips, while of the three selected additives only additive #5 was able to inhibit the growth of *Escherichia coli* O157: H7 in raw burgers. Regarding the amount of secondary metabolites generated by lipid oxidation over time in refrigeration, the three additives managed to inhibit it in both raw and cooked burgers. However, with respect to the quantification of carbonyls related to protein oxidation, none of the three additives managed to inhibit it neither in raw burgers as cooked. With respect to the sensory quality of cooked burgers, this was not affected by the type of additive used as a source of variation in the analysis.





**Key words:** culinary spices, acrylamide, *Escherichia coli* O157: H7, lipid oxidation, protein oxidation.



## I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día los consumidores exigen que haya alimentos más variados, fáciles de preparar, que sean más seguros, nutritivos y baratos. Sólo se pueden satisfacer estas expectativas y exigencias de los consumidores utilizando las nuevas tecnologías de transformación de alimentos, entre ellas la adición de aditivos (Hirasa y Takemasa, 2002).

Aunque se asocia a los tiempos modernos, los aditivos llevan siglos utilizándose. Se emplean desde que el hombre aprendió a conservar los alimentos para tiempos postreros. Una de las herramientas más utilizadas para la conservación fue el uso de especias culinarias (Hirasa y Takemasa, 2002).

El término especia puede definirse como un compuesto que tiene un fuerte aroma, actividad picante o colorante, que estimula el apetito o favorece la digestión. Las especias se obtienen de semillas, bayas, yemas, hojas, cortezas y raíces de plantas, que crecen principalmente en las zonas tropicales, subtropicales o templadas (Hirasa y Takemasa, 2002).

Experimentos científicos desde finales del siglo XIX han revelado las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de algunas especias o de algunos de sus compuestos fitoquímicos (Park, 2011; Kivilompolo y Hyotylainen, 2007; Shan *et al.*, 2007) ya que prolongan el período de conservación de los alimentos.

La mayoría de los alimentos están sometidos a muchas condiciones medioambientales que pueden modificar su composición original, como los cambios de temperatura, la oxidación y la exposición a microorganismos (Jay, 2002).

A nivel mundial hay una gran variedad de tratamientos culinarios domésticos e industriales que se emplean en el procesado o cocción de alimentos con la finalidad de hacerlos comestibles y agradables al consumidor. Entre ellos destaca el tratamiento térmico (freído, horneado, asado, etc.) durante el cual se originan algunas reacciones químicas que dan lugar a



una serie de compuestos que confieren a los alimentos una adecuada textura, aromas y sabores agradables (Ruiz-Roca, 2009). Entre estas reacciones una de las más frecuentes es la reacción de *Maillard*, también conocida con el nombre de pardeamiento no enzimático o glicación de proteínas, que se origina, en alimentos ricos en proteínas y azúcares reductores, proporcionando características organolépticas deseadas, buena apariencia, sabor y olor agradable. Sin embargo, también genera características negativas como la formación de productos tóxicos, llamados glicotoxinas (Ruiz-Roca, 2009).

Las glicotoxinas comprenden una gran diversidad de moléculas complejas, entre las que destaca la acrilamida, por ser la de mayor formación en alimentos ricos en carbohidratos (por ejemplo, las papas) cocinados a altas temperaturas (Sumaya-Martínez *et al.*, 2006). Diversos estudios han demostrado que las glicotoxinas están implicadas en la aparición de diversas patologías como el cáncer y complicaciones de la diabetes, entre otras (Goldberg *et al.*, 2004; Sugimura *et al.*, 2004; Méndez, 2003).

La reducción de la formación de glicotoxinas puede darse mediante la modificación de los métodos de cocción de los alimentos, utilizando temperaturas bajas y tiempos de cocción más prolongados, reducción de reactantes o mediante la adición de compuestos naturales que presentan actividad antioxidante como los polifenoles procedentes de una amplia variedad de fuentes del reino vegetal (frutas, vegetales, plantas o sus extractos y especias) (Jiménez-Castillo *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2011).

Por otra parte, tanto la oxidación lipídica como la proteica, son una de las causas de mayor deterioro de la carne, que generalmente se caracteriza por olor y sabor desagradable, pérdida del color, textura y valor nutritivo, que consecuentemente acorta la vida de anaquel y tiene un impacto negativo sobre la aceptabilidad de los alimentos por parte del consumidor. Además, los compuestos tóxicos generados por procesos de oxidación lipídica se han relacionado con la aparición de ciertas patologías como el cáncer o enfermedades cardiovasculares (Contini *et al.*, 2014; Palmieri y Sblendorio, 2007).



Los antioxidantes sintéticos tales como butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroquinona terciaria (BHQT) son ampliamente utilizados en la industria alimentaria para evitar reacciones de oxidación. Sin embargo, existen serias preocupaciones sobre el potencial cancerígeno de estas sustancias (Karre *et al.*, 2013; Musa y Arslan, 2011). Lo anterior lleva a un interés tanto por parte de los consumidores como de los fabricantes de alimentos por sustituir los aditivos sintéticos por sustancias naturales con actividad antioxidante, tal como las especias culinarias.

Otras de las causas que fomentan el deterioro de la carne es la presencia de microorganismos patógenos, debido a que cuando los nutrientes de la carne como glucosa, aminoácidos libres y los compuestos volátiles son metabolizados durante el crecimiento bacteriano, causan el desarrollo de malos sabores, olores y colores desagradables (Cappelletti *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2013; Nychas *et al.*, 2008). Así mismo, los microorganismos a una cierta concentración en el alimento son capaces de provocar distintas enfermedades gastrointestinales (Jay, 2002). Toda acción inhibitoria frente al crecimiento microbiano generalmente se expresa como acción antimicrobiana, incluyendo las acciones bacteriostática o fungistática (prevención del crecimiento microbiano y de su propagación) (Jay, 2002). Muchas especias culinarias (canela, clavo, tomillo, comino, cilantro, entre otras) han sido reportadas que poseen tanto propiedades antimicrobianas y/o antifúngicas (Park, 2011; Kivilompolo y Hyotylainen, 2007; Shan *et al.*, 2005; Zheng y Wang, 2001).

Hoy en día, tanto los consumidores como los productores son cada vez más conscientes de la importancia del valor nutritivo y la inocuidad (libre de sustancias tóxicas como la acrilamida, metabolitos secundarios de oxidación o microorganismos sobre todo patógenos) de los alimentos. De aquí la importancia de elaborar aditivos comestibles a base de especias culinarias que además de ejercer actividad antioxidante para evitar la formación de acrilamida en papas fritas, así como las reacciones de oxidación en la carne, puedan además en esta última, ejercer una actividad antimicrobiana.



## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Especies culinarias

Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado un gran número de plantas aromáticas debido a sus características organolépticas, que confieren a los alimentos y bebidas ciertos aromas, colores y sabores, que los hacen más apetitosos, gratos y sabrosos al olfato, vista y paladar. Además, funcionan como reguladoras del balance interno de los alimentos conservándolos por un mayor periodo de tiempo. Así mismo, las especias han sido utilizadas milenariamente en la medicina popular para prevenir o tratar ciertas enfermedades (Gil, 2010; Contreras y García, 2005).

Generalmente las especias son órganos secos de las plantas o hierbas que crecen principalmente en zonas tropicales, subtropicales o templadas, y debido a la fuerte irradiación del sol, desarrollan gran cantidad de aromas y sabores (Hirasa y Takemasa, 2002). Las especias vegetales con propiedades aromáticas pertenecen a familias botánicas consideradas tradicionalmente fuente de productos aromáticos como las Pináceas, Verbenáceas, Mirtáceas, Lamiáceas, Rutáceas, Lauráceas, Piperáceas, Apiáceas y Asteráceas (Cruz *et al.*, 2006).

En un sentido más amplio, el término especia puede definirse como un compuesto que tiene un fuerte aroma, actividad picante o colorante, que estimula el apetito o favorece la digestión. Mientras que la Norma Oficial Mexicana (NMX-FF-072-1990) define como especia a “cualquiera de los diversos productos vegetales naturales aromáticos, sin materias extrañas, utilizados enteros o en polvo para condimentar, dar sabor, aroma y/o color a los alimentos y bebidas”.

Por otra parte, la Food and Drug Administration (FDA) define a las especias como “sustancia vegetal aromática, en su totalidad fragmentada o molida, de la cual no se ha eliminado cualquier aceite volátil u otro principio aromatizante y cuya función significativa en los alimentos es condimentar”. Así mismo, este organismo marca a las especias como



“Generalmente Reconocidas como Seguras” (GRAS) a concentraciones comúnmente empleadas en los alimentos (Kaefer y Milner, 2008).

Las especias se obtienen de semillas, bayas, yemas, hojas, flores, cortezas y raíces de plantas, estas pueden usarse tanto frescas como en forma deshidratada. De acuerdo a su uso, se clasifican como hierbas frescas (hierbas aromáticas), secas o procesadas (extractos, oleorresinas y resinas) (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

Las plantas condimentarias como canela, pimienta, ajo, anís, azafrán, cilantro, comino, hojas de laurel, mejorana, menta, orégano, romero, tomillo, entre otras, son utilizadas en guisos, adobos, aliños y licorería, con la finalidad de conservar, sazonar, colorear y hacer más digeribles los alimentos. Poseen un amplio y creciente campo de aplicación en la industria alimentaria cárnica, licorera, repostería, entre otras (Muñoz, 2002).

La capacidad de las especias para conservar los alimentos o para tratar ciertos padecimientos en el hombre se debe a que la mayoría de las plantas contienen gran cantidad de compuestos bioactivos que provienen de su metabolismo secundario y que tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Shan *et al.*, 2007; Ertürk, 2006). Dichos compuestos son conocidos con el nombre de fitoquímicos y hasta el momento se han identificado más de 5000 fitoquímicos, que han sido clasificados en base a su composición química (Liu, 2004) como carotenoides, fenoles, alcaloides, compuestos nitrogenados y organosulfurados. Las formas en que trabajan los fitoquímicos son tan distintas entre sí como las especias culinarias mismas (Yeager, 2001).

Los fitoquímicos más estudiados han sido los carotenoides y fenoles. Entre las actividades biológicas que presentan los polifenoles se puede mencionar como una de las más importantes la capacidad antioxidante, que puede medirse también como la capacidad de atrapar un radical libre (Stevenson y Hurst, 2007). Dicha actividad se debe principalmente a las propiedades redox de los compuestos fenólicos (Tung *et al.*, 2007). Debido a sus excelentes propiedades





bioactivas, los fitoquímicos no solo tienen aplicaciones en la industria de alimentos sino también en la industria farmacológica y química (Muñiz-Márquez *et al.*, 2010).

### **2.1.1. Propiedades antioxidantes de las especias**

Los alimentos se deterioran gradualmente por diversas razones durante el almacenamiento y/o procesamiento, una de ellas está relacionado con procesos oxidativos. Estos a menudo son catalizados por iones ferrosos o de cobre. La degradación afecta sobre todo a lípidos, carbohidratos y proteínas (Hinniburg *et al.*, 2006). El uso de antioxidantes puede prolongar la vida útil de muchas clases de alimentos y permite la posibilidad mercantil de desarrollar muchos nuevos productos alimentarios (Brewer, 2011; Hinniburg *et al.*, 2006).

La mayoría de los alimentos contienen cierta cantidad de grasa, la cual es un importante constituyente, ya que es responsable en gran parte del excelente sabor y textura que caracteriza a los alimentos. Las grasas, no obstante, reaccionan con el oxígeno del aire generando radicales libres como peróxidos, que son posteriormente oxidados y descompuestos a alcoholes y aldehídos de bajo peso molecular, produciendo rancidez (Rodríguez-Carpena, 2011a). Se sospecha que estos radicales libres actúan en el organismo humano dañando el ADN y produciendo cáncer y envejecimiento (Hirasa y Takemasa, 2002).

El problema de la oxidación de alimentos empaquetados a veces se soluciona sustituyendo el oxígeno del envase por un gas inerte como el nitrógeno, o bien empleando antioxidantes con el alimento (Hirasa y Takemasa, 2002). Tres antioxidantes sintéticos bien conocidos son el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroquinona terciaria (BHQT), usados en diversidad de alimentos (Mejía-Benítez *et al.*, 2014; Brewer, 2011). Sin embargo, existe preocupación acerca de su posible toxicidad, tanto para el hígado como para los pulmones (Karre *et al.*, 2013; Musa y Arslan, 2011).

Los estudios sobre las propiedades antioxidantes de diversas especias culinarias efectuadas en la década de 1930 pusieron de manifiesto que algunas especias retardaban la generación de



peróxidos en el aceite de cacahuete e impedían el enranciamiento de la carne. La primera patente sobre las especias antioxidantes, aprobada en 1938, especificaba que los aceites de especias como el aceite de clavo pueden evitar la oxidación de los aceites de cocinar (Hirasa y Takemasa, 2002). Esto sirvió como punto de partida para la búsqueda de compuestos bioactivos con actividad antioxidante presentes en las especias culinarias y su aplicación para inhibir la oxidación de los ácidos grasos en los alimentos.

Muchas de las especias culinarias, generalmente utilizadas en la preparación de los alimentos, son una fuente excelente de compuestos fenólicos que muestran una buena actividad antioxidante (Armenteros *et al.*, 2016; Vallverdú-Queralt *et al.*, 2014; Mungole y Chaturvedi, 2011). La actividad antioxidante de las especias culinarias se debe principalmente a las propiedades redox de los compuestos fenólicos presentes en ellas, desempeñando un papel importante en la neutralización de los radicales libres (Tung *et al.*, 2007).

### **2.1.2. Propiedades antimicrobianas de las especias**

Con una mayor disponibilidad de información sobre los impactos en la salud, los consumidores ahora, no solo prestan más atención al riesgo de patógenos transmitidos por los alimentos, sino también a la presencia de conservantes químicos artificiales incluidos para controlar los patógenos transmitidos por los alimentos. Como resultado, los consumidores piden un mayor uso de ingredientes naturales para garantizar la seguridad de los productos consumibles. En respuesta a esta demanda, la industria alimentaria está buscando utilizar conservantes de alimentos más naturales que tengan una fuerte actividad antimicrobiana para garantizar productos alimenticios sanos y seguros, tal como las especias culinarias (Rahman *et al.*, 2011; Ibrahim *et al.*, 2008). Esta propiedad se debe a la presencia de fitoquímicos activos, tales como compuestos fenólicos, flavonoides, terpenoides y carotenoides (Gharibi *et al.*, 2013).

Toda acción inhibitoria frente al crecimiento microbiano generalmente se expresa como acción antimicrobiana, incluyendo las acciones bacteriostática o fungistática (prevención del



crecimiento microbiano y de su propagación). La mayoría de las especias culinarias poseen propiedades antimicrobianas y/o antifúngicas (Zheng y Wang, 2001).

Las propiedades antimicrobianas de las especias se han conocido durante siglos (Park, 2011; Kivilompolo y Hyotylainen, 2007). Por ejemplo, las especias en la antigua India, China y Egipto se empleaban ya para conservar alimentos, así como también con fines medicinales (Kaefer y Milner, 2008). En las clásicas Grecia y Roma, el cilantro se usó para prolongar el periodo de conservación de la carne y la menta se usaba para evitar la rápida alteración de la leche (Hirasa y Takemasa, 2002).

En las últimas décadas, las plantas y las especias han desempeñado un papel esencial en el desarrollo del descubrimiento de fármacos como fuente rica de compuestos biológicamente activos que exhiben propiedades antimicrobianas significativas (Njume *et al.*, 2011; Castillo-Juárez *et al.*, 2009).

La eficacia antimicrobiana de las especias depende del tipo de la especia, su composición y concentración, el tipo y concentración de microorganismo, la composición del sustrato, así como las condiciones de procesamiento y almacenamiento del alimento (Leite de Souza *et al.*, 2006).

## **2.2. Aditivos comestibles**

Hoy en día, cada vez hay más conocimientos e intereses para mejorar las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de los alimentos utilizando métodos modernos de preservación o ya existentes con alguna mejora. Entre los productos alimenticios, la carne y los productos cárnicos, así como las papas fritas tipo “a la francesa” son bien conocidos por su susceptibilidad a la contaminación química y/o microbiana, así como la oxidación, por lo que encontrar un conservante rentable con propiedades antioxidantes y antimicrobianas es vital para estos productos (Andevari *et al.*, 2011).



El uso de antioxidantes en los alimentos, debido a su capacidad para controlar la oxidación de las grasas y aumentar la vida útil de los alimentos, es muy apreciado por los productores de alimentos. El butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT) se encuentran entre los antioxidantes sintéticos más utilizados en la industria alimentaria. A pesar de la efectividad y la buena estabilidad, el uso de estos compuestos es limitado debido a su posible toxicidad (Shahidi, 2015; Farvin y Jacobsen, 2013).

La conciencia del consumidor con respecto a la seguridad y calidad de los alimentos ha obligado a la industria de procesamiento de alimentos a buscar fuentes alternativas de compuestos saludables, especialmente de origen natural (Kumaran *et al.*, 2017). Las especias culinarias se han convertido en una opción por poseer fuerte actividad antioxidante y antimicrobiana, la cual está relacionada con el tipo y concentración de compuestos fenólicos. Estas características convierten a las especias culinarias como un posible aditivo para la conservación de alimentos (Brewer, 2011).

Un aditivo se define como una sustancia o mezclas de sustancias, ya sea de origen natural o sintético, que se aplica de manera intencional en la superficie de un alimento en adición o remplazo de la corteza natural y que se enfoca principalmente a extender la vida útil del alimento (Carrasco *et al.*, 2002). Los aditivos deben emplearse como una ayuda en la fabricación de los alimentos, pero nunca para enmascarar materias primas o productos de mala calidad (Badui-Dergal, 2006).

Los aditivos se aplican por muchas razones: para incrementar el valor nutritivo, como las vitaminas, aminoácidos y elementos químicos; para la preservación de los alimentos, como los conservadores, antioxidantes, agentes que reducen la actividad del agua, antiendurecedores y otros; así como, para mejorar las propiedades sensoriales, como los saborizantes, colorantes, edulcorantes, espesantes, espumantes, gelificantes y emulsionantes. Sin embargo, muchos de ellos cumplen más de una función al mismo tiempo, como por ejemplo, los polioles, que reducen la actividad del agua, los acidulantes que abarcan una gama muy amplia de acciones,



así como los antioxidantes que además de neutralizar los radicales libres presentan cierta actividad antimicrobiana (Badui-Dergal, 2006).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través del *Codex Alimentarius* han clasificado a los aditivos en tres categorías, A, B y C, de acuerdo con su seguridad. Los A son los más inocuos, mientras que los C tienen limitaciones para su empleo. Entre la lista de los varios de miles de aditivos permitidos, existen algunos muy conocidos como la sacarosa, los ácidos acético y cítrico, el cloruro de sodio, las especias culinarias y muchos otros, que se emplean desde hace siglos para conservar los alimentos y mejorar sus propiedades sensoriales. Además, estos compuestos también se encuentran en forma natural, por lo que a través de los años se ha comprobado la seguridad de su consumo. En este caso, la mayoría de los países no restringe su uso y la única limitante se relaciona con aspectos de aceptación por el consumidor (Codex Alimentarius, 2016).

De acuerdo con la legislación mexicana, el “Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios”, expedido en 1999, define como aditivo “la sustancia que se adiciona directamente a los productos durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor, para mejorar su estabilidad o para su conservación”. Queda prohibido su uso para: a) ocultar defectos de calidad, b) encubrir alteraciones y adulteraciones en la materia prima o en el producto terminado, c) disimular materias primas no aptas para el consumo humano, d) ocultar técnicas y procesos defectuosos de elaboración, manipulación, almacenamiento y transporte, e) reemplazar ingredientes en los productos que induzcan a error o engaño sobre la verdadera composición de los mismos y f) alterar los resultados analíticos de los productos en que se agreguen (DOF, 1999).

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, establece los siguientes grupos de aditivos según su función: 1) acentuadores de sabor, 2) acidulantes, alcalinizantes, y reguladores de pH, 3)



acondicionadores de masa, 4) antiaglomerantes, 5) antiespumantes, 6) antihumectantes, 7) antisalpicantes, 8) clarificantes, 9) colorantes y pigmentos, 10) antioxidantes, los cuales define como sustancia o mezcla de sustancias destinadas a retardar o impedir la oxidación y enranciamiento de los productos (Badui-Dergal, 2006).

### **2.3. Reacción de *Maillard***

En 1912 el químico francés Louis Camille *Maillard* publicó un artículo sobre lo que él denominaba pigmentos melanoides que se forman como resultado de la reacción entre la glucosa y el aminoácido glicina (Maillard, 1912a, 1912b). La importancia de sus investigaciones fue postular que estas reacciones se producían tanto en el procesado de los alimentos como a nivel biológico. Posteriormente se describieron las primeras etapas de la reacción, visualizándose la formación de una serie de productos intermedios denominados “compuestos de Amadori” en honor al químico italiano Mario Amadori que determinó el proceso que lleva su nombre (Amadori, 1925).

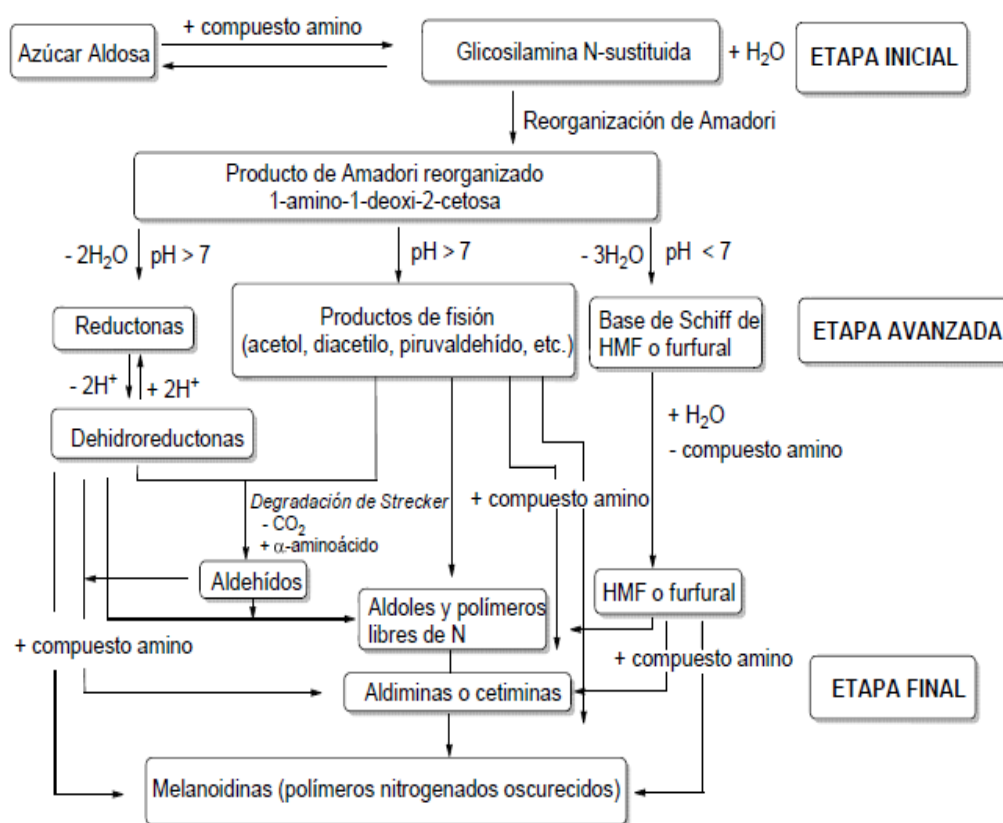
La reacción de *Maillard* puede dividirse en tres etapas (figura 1) (Ruiz-Roca, 2009; Andriot *et al.*, 2004; Cremer y Eichner, 2000; Morales y Van Boekel, 1998; Baisier y Labuza, 1992):

ETAPA INICIAL. Comienza con una reacción de condensación entre el grupo carbonilo, normalmente de un azúcar reductor, aunque también puede ser un compuesto carbonílico (como por ejemplo glioxal o metilglioxal) generado en la etapa intermedia de la reacción o procedente de la oxidación lipídica (como por ejemplo el 2,4 decadienal) y un grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína originándose una base de Schiff. Por ciclación, la base de Schiff se transforma rápidamente en la glicosilamina N-sustituida correspondiente. Cuando la base de Schiff es una aldosilamina N-sustituida, se forma la 1- amino-1- deoxi-2- cetosa mediante la denominada reorganización de Amadori, siendo esta etapa irreversible. Sin embargo, cuando la molécula es una cetosilamina-N-sustituida se forma una 2-amino-2- deoxi-2- cetosa y se le conoce como reorganización de Heyns.





ETAPA AVANZADA. Los productos de Amadori y Heyns se descomponen dependiendo del pH, la actividad de agua, la presencia de metales divalentes o la temperatura, dando lugar a la formación de diferentes compuestos intermedios responsables del aroma que caracterizan a los alimentos cocinados. A pH ácido y en condiciones de baja actividad de agua, la reacción predominante es una enolización-1,2 que da lugar a la formación de furfural cuando el azúcar reductor implicado es una pentosa o hidroximetilfurfural en el caso de una hexosa. Por el contrario, a pH neutro tiene lugar una enolización-2,3 formándose reductonas, así como el compuesto acrilamida y una variedad de productos de fisión tales como acetol, piruvaldehído y diacetilo, todos ellos de gran reactividad, lo que hace que participen en nuevas reacciones con otros productos intermedios de la reacción.



**Figura 1.** Etapas de la reacción de *Maillard* (Zhang y Zhang, 2007; Martins *et al.*, 2001; Hodge, 1953).



ETAPA FINAL. Engloba un gran número de reacciones que incluyen ciclaciones, deshidrataciones, reorganizaciones y condensaciones, originando oligómeros y polímeros insolubles, de alto peso molecular, llamados melanoidinas, difíciles de aislar y cuya estructura y caracterización todavía son objetos de estudio. Se produce la formación de los pigmentos oscuros.

La reacción de *Maillard* es especialmente importante para la industria alimentaria, ya que se da de manera muy frecuente en el procesado de los alimentos, como el freído, horneado, tostado, asado, etc., confiriéndoles nuevos olores, sabores, colores y texturas, agradables para el consumidor. La reacción también puede llevarse a cabo durante el almacenamiento a temperatura ambiente o incluso, aunque de forma mucho más lenta a bajas temperaturas (Somoza, 2005; Rizzi, 1994).

La reacción de *Maillard* es muy compleja y está influida por varios factores: principalmente por el tipo y concentración de azúcares y aminoácidos implicados, así como por la temperatura, pH, actividad de agua y tiempo. Por lo tanto, la variación de cualquiera de estos parámetros puede alterar y cambiar la velocidad, la ruta y los productos finales de la reacción (Friedman, 1996; Ames, 1990).

### **2.3.1. Glicación de proteínas en alimentos**

La glicación de proteínas en alimentos, es también conocida con el nombre de reacción de *Maillard*, la cual tiene lugar durante el calentamiento de los alimentos. Sin embargo, el empleo de altas temperaturas (mayor a 120 °C) durante la cocción de alimentos, se ha asociado a la formación de diversos productos de naturaleza tóxica, llamados glicotoxinas, los cuales se producen durante la etapa intermedia de la glicación y comprenden una gran diversidad de moléculas complejas, como la carboximetil-lisina (CML), acrilamida (ACR), hidroximetilfurfural (HMF), aminas heterocíclicas (HA's), entre otras (Davis *et al.*, 2015; Sumaya-Martínez *et al.*, 2006).



En años recientes, la dieta occidental se caracteriza por ser alta en grasa, ingesta excesiva de productos refinados o alimentos procesados (principalmente alimentos fritos, generación de glicotoxinas), desequilibrio en el consumo de alimentos ácido y base y por una ingesta inadecuada de micronutrientes y alimentos vegetales. Esto conlleva a un aumento en el estrés oxidativo celular del organismo humano, que provoca disfunción endotelial y contribuye al daño relacionado con la diabetes, enfermedades cardiovasculares y renales (Davis *et al.*, 2015).

La reducción paulatina de la exposición a humanos de nuevas sustancias potencialmente tóxicas como las glicotoxinas, es un tema prioritario para los organismos públicos de salud, el sector empresarial y las asociaciones de consumidores. Sin embargo, en México no hay una regulación comunitaria sobre niveles máximos de presencia de glicotoxinas en alimentos, solo se han establecido recomendaciones de valores indicativos por parte del CODEX-alimentario y confederaciones de productores en diversos grupos de alimentos (Jiménez-Castillo *et al.*, 2012). Dichas recomendaciones se espera que en un futuro próximo puedan convertirse en una regulación que fije el control de los niveles de ACR, HMF, CML, HA's, entre otras.

Dentro de las alternativas para la reducción de glicotoxinas se tiene la adición de ácidos orgánicos (ácido cítrico) (Jung *et al.*, 2003), enzimas (Taeymans y Wood, 2004; Zyzak *et al.*, 2003), compuestos fenólicos (ácido cafeico, catequinas, entre otros) (Kotsiou *et al.*, 2011; Bassama *et al.*, 2010), vitaminas (Zeng *et al.*, 2009) y sales de metales (NaCl y CaCl<sub>2</sub>) (Gökmen y Senyuva, 2007). Así mismo, se emplean los métodos de reducción de reactantes (aminoácidos y azúcares reductores), temperatura y tiempo de cocción (Kalita *et al.*, 2013; Jiménez-Castillo *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2011).

Aunque a una velocidad menor que durante la cocción de los alimentos, la glicación de proteínas también se efectúa de forma endógena en el organismo, lo que produce una gama heterogénea de compuestos llamados AGE's (Productos Avanzados de la Glicación), los cuales se forman por la glicación no enzimática de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en la circulación sanguínea (Liu *et al.*, 2018; Vlassara y Palace, 2002). Dicha glicación puede



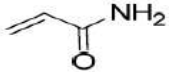
someterse a autooxidación y generar radicales y otros productos reactivos intermedios (ej.  $H_2O_2$  y otros peróxidos) que contribuyen a la formación de AGE's (Wu *et al.*, 2011). Los efectos patológicos de los AGEs están relacionados con su capacidad de formar enlaces de entrecruzamiento con proteínas, modificando su función biológica (Méndez, 2003; Gugliucci, 2000; Koschinski *et al.*, 1997). La acumulación de AGE's puede ser reducido por la ingesta de antioxidantes naturales a través de la dieta (Wu *et al.*, 2011).

Se ha puesto en evidencia que algunos AGE's son de la misma naturaleza química que algunas glicotoxinas formadas durante la cocción de los alimentos (tales como la carboximetil-lisina y la pentosidina). Del consumo total de éstos compuestos un 10% es absorbido por el organismo lo que aumenta significativamente los niveles de AGE's en la sangre y en los tejidos (Davis *et al.*, 2015; Peppia *et al.*, 2003; Koschinski *et al.*, 1997).

### 2.3.2. Acrilamida

La acrilamida es una molécula que contiene un doble enlace electrófilo y un grupo amida (Friedman, 2003). Se trata de una sustancia blanca e inodora, que a temperaturas superiores a  $84.5\text{ }^\circ\text{C}$  sufre polimerización espontánea (Friedman, 2003). Al ser una amida  $\alpha, \beta$  insaturada le permite reaccionar con compuestos nucleofílicos a través de adiciones de Michael. Debido a la limitada conjugación que envuelve al doble enlace, carece de un fuerte grupo cromóforo para la detección UV-VIS y tampoco presenta fluorescencia (Arribas-Lorenzo, 2013). En el cuadro 1 se presenta la estructura y propiedades de la acrilamida.

**Cuadro 1.** Estructura y propiedades de la acrilamida.

<p><b>Estructura</b></p>  <p><math>C_3H_5NO</math></p>	<p>Peso molecular</p> <p>Punto de fusión</p> <p>Punto de ebullición</p> <p>Solubilidad</p>	<p>71,08 g/mol</p> <p>84,5 °C</p> <p>136 °C a 25 mm Hg</p> <p>agua, metanol, etanol</p>
---	--	---

Fuente: Arribas-Lorenzo, 2013.



La reacción de *Maillard* entre un azúcar reductor y el aminoácido asparagina es la vía responsable de la formación de acrilamida (Mottram *et al.*, 2012), de manera específica su generación se lleva a cabo durante la etapa avanzada de la reacción. Este compuesto se produce en aquellos alimentos que son tratados térmicamente a temperaturas superiores a los 120 °C (Bartkiene *et al.*, 2015).

Tareke *et al.* (2002) demostraron que el monómero de acrilamida se produce de manera natural en alimentos con un alto contenido de carbohidratos y bajos niveles de proteínas, tales como los cereales y tubérculos, cuando estos son cocinados a altas temperaturas.

La concentración de ACR en los alimentos puede variar enormemente, lo cual dependerá de factores como la temperatura, el tiempo de cocción, la concentración de azúcares reductores y aminoácidos libres, tal como la asparagina. El aumento de alguna o algunas de estas variables conduce a un incremento en la formación de acrilamida (Cheong *et al.*, 2005). Así mismo, dos factores importantes a tomar en cuenta son el pH y la  $a_w$  del medio en que se desarrolla la reacción, ya que un pH ácido, menor o igual a 3, la velocidad de la reacción es mínima y su desarrollo escaso (Ruiz-Roca, 2009; Lea y Hannan, 1949), mientras que en condiciones de alcalinidad el desarrollo de la reacción se ve favorecida (Badui-Dergal y Valdés-Martínez, 2006; Ames, 1990).

Según Alais y Linden (1990) el rango de pH comprendido entre 6 y 8 es el más favorable para el desarrollo de la reacción, mientras que otros autores amplían el rango hasta 10 (Badui-Dergal y Valdés-Martínez, 2006; Ashoor y Zent, 1984; Wolfram *et al.*, 1974). Arribas-Lorenzo (2013), menciona que un pH neutro es el óptimo para la formación de acrilamida y si, el valor de pH disminuye se produce menos acrilamida. Esto se explica por el hecho de que la reducción de pH provoca la conversión de los grupos  $\alpha$ -amino libres de la asparagina en grupos aminos protonados, impidiendo participar posteriormente en reacciones de adición nucleofílica con compuestos carbonílicos (Zhang y Zhang, 2007) y bloqueando la reacción de formación de acrilamida (De Vleeschouwer *et al.*, 2006).



Por otra parte, Badui-Dergal y Valdés-Martínez (2006), Buera *et al.* (1987) y Labuza y Schmidl (1986) mencionan que los alimentos de humedad intermedia son los más propensos a sufrir la reacción de *Maillard*, los valores de  $a_w$  de 0.6 a 0.9 son los que más las favorecen, una  $a_w$  menor no permite la movilidad de los reactantes, lo que inhibe el mecanismo, mientras que una  $a_w$  mayor produce el mismo efecto ya que el agua al ser producto de la propia reacción, ejerce una acción inhibitoria diluyendo los reactantes.

Entre los alimentos de mayor riesgo por su elevado contenido de acrilamida están las papas fritas, por lo que la mayor parte de las investigaciones se centran en la reducción de la ACR en dicho alimento, ya que es ampliamente consumido en todo el mundo (Morales *et al.*, 2014). Se ha encontrado más de 12 mg de ACR por kg de papas fritas (Friedman, 2003), más de 200 mg/kg en hojuelas de cereal, palomitas de maíz y café en polvo y más de 70 mg/kg de chocolate en polvo, entre muchos otros (Sumaya-Martínez *et al.*, 2006). Con base en la cantidad consumida de acrilamida por kilogramo de peso, la población más expuesta al consumo de altas dosis por la dieta son los niños (OMS, 2002). Durante el año 2013 la Comisión Europea recomendó como valor indicativo máximo de acrilamida en papas fritas tipo “a la francesa” 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de producto, mientras que en las papas tipo chips 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Diario Oficial de la Unión Europea, 2013).

La acrilamida ha llamado la atención mundialmente por presentarse en altas concentraciones en algunos alimentos, por ser reconocida como un compuesto tóxico y probablemente cancerígeno (Liu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2009; IARC, 1994). Tal ha sido su importancia que durante el año 2013 la FDA (Food and Drug Administration) lanzó mediante una publicación, una guía para la industria alimentaria, proporcionando información para ayudar a los productores, fabricantes y operadores de servicios de alimentos sobre la manera de reducir la concentración de acrilamida en algunos alimentos (FDA, 2013). Por otro lado la Food Drink Europe realizó una recopilación de estrategias, llamada Toolbox, que han surgido a través de los años para la reducción de dicha glicotoxina (Vinci *et al.*, 2012).



De entre los diversos aditivos utilizados para la reducción de glicotoxinas se encuentran los compuestos fenólicos extraídos de plantas, los cuales son un tipo de aditivo, cada vez más utilizado entre los investigadores para la reducción de acrilamida (Bassama *et al.*, 2010; Ou *et al.*, 2010).

#### **2.4. Carne de cerdo**

De acuerdo a estadísticas reportadas por Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA), la carne de cerdo es la de mayor consumo en el mundo, su producción creció a una tasa promedio anual de 1.6 % entre 2007 y 2016 (FIRA, 2017; FIRA, 2012). México, con una participación del 1.3% de la de la producción mundial, se ubica en el noveno lugar, con una producción de 1.45 millones de toneladas (FIRA, 2017).

Del volumen total de las carnes más consumidas (bovino, porcino, ave), el consumo de carne de cerdo representó el 43%. Se espera que el consumo mundial se incremente 2.5 % a tasa anual en 2018, para ubicarse en 110.7 millones de toneladas. Se prevé que la demanda en China, el principal consumidor, crezca 3.3 %. El país asiático es también el más importante importador de carne de cerdo (FIRA, 2017).

Durante muchos años la carne de cerdo fue considerada como un alimento poco nutritivo, “pesado” y en general asociado con enfermedades y parasitosis. Sin embargo, en los últimos 25 años la carne de cerdo ha reducido 31% el contenido de grasa, 14% en calorías y 10% en colesterol, producto del avance tecnológico en la porcicultura mundial (CPM, 2009). Además, el control zosanitario de la carne de cerdo ha incrementado la percepción de salubridad e inocuidad de la carne. Así, la carne de porcino se ha posicionado como una fuente nutricional valiosa, de gran calidad y sabor.

La importancia nutricional, económica y social de esta carne es innegable. En nuestro país, es la segunda carne de mayor consumo (con un consumo *per cápita* de 15.4 kilogramos por persona por año), sólo después de la carne de pollo (FIRA, 2016; USDA, 2012; Benítez y



Sánchez, 2000). El consumo nacional de la carne de cerdo presenta una tendencia creciente y se prevé se mantenga durante el 2018, para ubicarse en un máximo histórico de 2.11 millones de toneladas (FIRA, 2017).

El cerdo se encuentra entre los animales más eficientemente productores de carne; sus características particulares, como gran precocidad y prolificidad, corto ciclo reproductivo y gran capacidad transformadora de nutrientes, lo hacen especialmente atractivo como fuente de alimentación (Benítez y Sánchez, 2000).

El mercado doméstico de carne de cerdo en México ha crecido durante la última década, ya que no solo en nuestro país el consumo ha aumentado, sino que también las exportaciones de la carne mexicana se incrementaron 10.5% en el 2017, motivado principalmente por la demanda de Japón, Corea del Sur y Estados Unidos, principales destinos de la carne de cerdo mexicana. Considerando que estos países son el principal destino de la carne de cerdo y que en nuestro país el consumo de esta carne ha aumentado, es importante tomar en cuenta los altos requerimientos zoonosarios y de calidad que demanda tanto el mercado nacional como internacional (FIRA, 2017; FIRA, 2012).

#### **2.4.1. Factores que afectan la calidad de la carne de cerdo**

Se denomina carne a la estructura compuesta por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conectivo, grasa, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos, de las especies animales autorizadas para el consumo humano (Pérez- Chabela y Ponce-Alquicira, 2013).

La carne es un producto altamente perecedero debido a su composición bioquímica (agua, grasas, proteínas, etc.), los factores que influyen en su vida útil y su frescura son la temperatura, el oxígeno atmosférico (O<sub>2</sub>), enzimas endógenas, la humedad, la luz y la carga bacteriana (Gul *et al.*, 2016; Seon, 2010).





La vida útil y la calidad de la carne de cerdo son dependientes en gran medida de la carga bacteriana inicial y el control de la temperatura en la cadena de producción. El deterioro sensorial se produce cuando los nutrientes de la carne como glucosa, aminoácidos libres y los compuestos volátiles son metabolizados durante el crecimiento microbiano y este proceso contribuye al desarrollo de malos sabores, colores y olores desagradables (Cappelletti *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2013; Nychas *et al.*, 2008).

Por otra parte, tanto la oxidación lipídica como proteica son una de las causas de mayor deterioro de la carne de cerdo, generalmente caracterizada por olor y sabor desagradable, pérdida del color, textura y valor nutritivo, que consecuentemente, acorta la vida de anaquel y tiene un impacto negativo sobre la aceptabilidad de los alimentos por parte del consumidor. Los compuestos tóxicos generados en la oxidación lipídica se han relacionado con la aparición de ciertas patologías como el cáncer o enfermedades cardiovasculares (Contini *et al.*, 2014; Palmieri y Sblendorio, 2007).

Los compuestos antimicrobianos naturales han sido utilizados por su efecto sobre varios patógenos y microorganismos de descomposición de alimentos. Plantas aromáticas y especias comunes se han implementado en la cocina, no sólo para mejorar el sabor, sino también por su efecto antibacteriano (Lauková, 2011) y en algunos casos también han exhibido propiedades protectoras contra los mecanismos de oxidación (Van Haute *et al.*, 2016).

#### **2.4.1.1. *Escherichia coli***

Las enfermedades transmitidas por los alimentos han sido siempre una preocupación importante tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados (Mead *et al.*, 1999). *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *estreptococos*, entre otros, son algunas de las principales especies bacterianas que causan enfermedades transmitidas por alimentos (Consumer information from USAD, 1997).



*Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo no esporulado, puede poseer flagelos peritricos o ser inmóvil, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y es capaz de crecer en medios aerobios y anaerobios, preferentemente a 37 °C, aunque la temperatura mínima para su crecimiento es de 2.5 °C y la máxima de 45 °C; puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración y de congelación. El rango de pH en el cual se ha observado crecimiento es de 4.4 a 9.0. Es capaz de utilizar azúcares simples como fuente de carbono; existe un número considerable de productos finales de la fermentación anaeróbica con glucosa como fuente de carbono y energía, entre los que se encuentra el succinato, lactato, acetato, etanol, formato y bióxido de carbono; el tipo y cantidad de productos finales varían de acuerdo con las condiciones específicas de crecimiento. En su habitat natural, *E. coli* vive en los intestinos de la mayor parte de los mamíferos sanos, siendo el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo (Croxen *et al.*, 2013; Cabrera y Pérez, 2002).

*E. coli* es la bacteria más comúnmente presente en el intestino humano, que ayuda a prevenir la entrada de microorganismos patógenos, pues actúa como un comensal formando parte de la microbiota intestinal y logrando con ello una relación de mutuo beneficio (Croxen *et al.*, 2013; Mead *et al.*, 1999). *E. coli* no es un microorganismo patógeno en condiciones normales, sin embargo cuando está presente en exceso o de forma virulenta, se convierte en agente causante de diversas enfermedades intestinales o extraintestinales.

Las cepas virulentas de *E. coli* pueden causar infección del tracto urinario, gastroenteritis, meningitis neonatal, entre otros distintos síndromes clínicos (Mead *et al.*, 1999). *E. coli* patógena se agrupa en cinco categorías: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC) (Nataro y Kaper, 1998; Padhye y Doyle, 1992), que se distinguen entre sí por sus propiedades de virulencia, las interacciones que establecen con la mucosa intestinal, los síndromes clínicos que originan, así como por las diferencias epidemiológicas y de serogrupos O:H que presentan (Cabrera y Pérez, 2002).



Una de las cepas de mayor cuidado y preocupación es la cepa EHEC O157:H7 la cual es capaz de producir una potente toxina que conduce frecuentemente a una diarrea hemorrágica y ocasionalmente al síndrome hemolítico urémico, que daña las células sanguíneas, conduce a insuficiencia renal e incluso a la muerte (Buchanan y Doyle, 1997). La transmisión se da a través de la vía fecal oral, asociada a comer alimentos crudos, carne contaminada y a nadar o beber en aguas contaminadas. Según el centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), se estima que en los Estados Unidos se producen cada año 73,000 casos de infección y 61 muertes asociadas con *E.coli* O157:H7 (Mead *et al.*, 1999).

*Escherichia coli* O157:H7 fue reconocida inicialmente como causa de enfermedad en 1982 durante un brote de diarrea aguda con sangre en Estados Unidos. Se determinó que el brote se debía a hamburguesas contaminadas. Desde entonces, la mayoría de las infecciones han provenido de comer carne de vacuno picada insuficientemente cocinada (Cabrera y Pérez, 2002).

#### **2.4.1.2. Oxidación lipídica**

Los potenciadores más importantes de la oxidación son las especies reactivas al oxígeno (ROS), que son productos metabólicos secundarios normales generados continuamente en la mitocondria de la mayoría de las células (Morrisey *et al.*, 1998). Incluyen radicales libres como el radical hidroxilo (OH•), el radical anión superóxido (O<sub>2</sub> •-), los radicales peroxilo (ROO•) y alcoxilo (RO•) y los peróxidos como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y los hidroperóxidos (ROOH) (Morrisey *et al.*, 1998). Cada una de estas ROS es altamente reactiva e inestable debido al hecho de que contienen un electrón no apareado en su cubierta externa de electrones. Esta conformación le proporciona la habilidad de rápidamente interactuar con macromoléculas celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Cecarini *et al.*, 2007).

Los procesos oxidativos mediados por radicales libres, afectan predominantemente a los ácidos grasos insaturados de los lípidos, los grupos hemo de los pigmentos, los aminoácidos de las proteínas y los dobles enlaces conjugados de las vitaminas (Insani *et al.*, 2008).

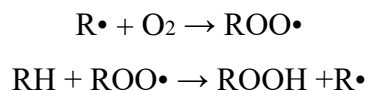


La oxidación lipídica ocurre mediante un mecanismo autocatalítico de radicales libres llamado autooxidación, que consiste de tres fases: iniciación, propagación y terminación (Fernández *et al.*, 1997). Se inicia con la sustracción de un átomo de hidrógeno del grupo metileno localizado entre dos dobles enlaces de un ácido graso (RH) para formar un radical lipídico con carbono central (R•) debido a la actuación de un agente iniciador de la oxidación lipídica (Rodríguez-Carpena, 2011a; Stahl, 2000), tal como se indica a continuación:



Entre los principales agentes iniciadores, se encuentran la exposición a la luz, el calor, el oxígeno molecular, ácidos grasos oxidados, metales de transición, entre otros (Rodríguez-Carpena, 2011a). La fase de iniciación se ve favorecida si aumenta el número de dobles enlaces del ácido graso, por ello los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles a la oxidación y pueden ser catalizados por el radical OH• o por radicales ferrilos o perferrilos (Morrisey *et al.*, 1998). Estos últimos se originan por la reacción de proteínas hemo con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Montero, 2000).

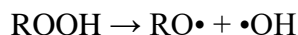
Durante la fase de propagación, el radical lipídico reacciona con el oxígeno, para dar un radical peroxilo (ROO•). Éste es lo suficientemente reactivo como para propagar una reacción en cadena, quitando otro átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado contiguo (Fernández *et al.*, 1997). Esta reacción en cadena es favorecida por la luz y el oxígeno (Insani *et al.*, 2008). De esta última reacción se forman los hidroperóxidos lipídicos (ROOH) y un nuevo radical lipídico con carbono central (R•) (Fernández *et al.*, 1997) como se muestra a continuación:



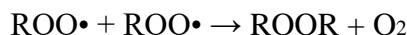
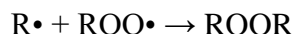
Los hidroperóxidos son considerados los productos principales obtenidos a partir de la oxidación lipídica, son lábiles y sufren deterioro por los radicales libres. Su ruptura genera



productos secundarios. Además de ser productos de oxidación, son también sustrato para reacciones posteriores con  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+2}$  para dar radicales  $\text{RO}\cdot$  y  $\cdot\text{OH}$  (Fernández *et al.*, 1997) como lo indica la siguiente reacción:



Durante la fase de terminación, los radicales libres en ausencia de oxígeno, reaccionan entre sí para dar diferentes productos más estables (Fernández *et al.*, 1997) como se indica a continuación:



Dentro de los productos secundarios que se generan durante la oxidación lipídica se incluyen: alcanos, cetonas, hidrocarburos, alcoholes, ácidos y aldehídos como el malonaldehído (MDA) que es un iniciador carcinogénico y mutagénico que puede afectar a las proteínas y al ADN. Se ha demostrado que todos estos productos tienen algún grado de toxicidad (Cifuni *et al.*, 2004) y pueden afectar negativamente el olor, sabor, valor nutricional y calidad de los alimentos (Botsoglou *et al.*, 1997).

Por otra parte, los cambios bioquímicos que ocurren durante la conversión del músculo en carne, como el descenso del pH y la ruptura de la estructura de las proteínas miofibrilares por la acción de peptidasas endógenas, favorecen las condiciones de oxidación (Morrisey *et al.*, 1998, Ouali *et al.*, 2006). La tasa y el grado de oxidación en alimentos cárnicos están influenciados por eventos *pre-mortem* (estrés del animal) y *post-mortem* (caída rápida del pH, temperatura de la canal, acortamiento por frío y técnicas para aumentar la ternura como la estimulación eléctrica). Además, cualquier cambio en la integridad de la membrana como deshuesado mecánico, picado o cocinado, altera la compartimentalización celular, lo que facilita la interacción de agentes pro-oxidantes (hierro hemo, luz, oxígeno, alta temperatura)



con ácidos grasos insaturados resultando en la generación de radicales libres y la propagación de la reacción oxidativa (Buckley *et al.*, 1995; Cascone, 2005).

La oxidación lipídica en alimentos cárnicos se inicia en la porción altamente insaturada de los fosfolípidos de las membranas subcelulares, en mitocondrias y microsomas (Buckley *et al.*, 1995), es una de las mayores causas del deterioro en la calidad de los productos cárnicos tanto cocidos como crudos, durante el almacenamiento refrigerado o congelado (De Azevedo-Gomes *et al.*, 2003).

Durante el manejo, el procesamiento y el almacenamiento de la carne fresca, la liberación de hierro endógeno es parcialmente responsable de la catálisis de la oxidación lipídica (Descalzo *et al.*, 2005), ya que en el músculo hay pequeñas cantidades de hierro no proteico (no hemo) unido a moléculas como adenosina difosfato (ADP), pirofosfato o aminoácidos libres, así mismo hay mioglobina como fuente de hierro (Buckley *et al.*, 1995). Ese hierro se une a los aminoácidos, nucleótidos y fosfatos formando quelatos que son responsables de la catálisis de la oxidación de lípidos en los tejidos (Morrisey *et al.*, 1998). La propagación de esa peroxidación lipídica en las membranas promueve la oxidación de la mioglobina (formación de metamioglobina) resultando en el deterioro del color (marrón oscuro), mientras que por otro lado promueve la formación de compuestos de bajo peso molecular que imparten olores rancios y sabores desagradables en la carne (Descalzo *et al.*, 2005; Mercier *et al.*, 2004; Dewhurst *et al.*, 2003).

#### **2.4.1.3. Oxidación proteica**

La oxidación proteica es iniciada principalmente por reacciones con el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) y/o el anión superóxido ( $\text{O}_2 \cdot^-$ ), sin embargo el curso del proceso de oxidación está determinado por la disponibilidad de  $\text{O}_2$  (Berlett y Stadtman, 1997). El radical hidroxilo y el anión superóxido pueden desencadenar la oxidación de residuos de aminoácidos (AA) de cadenas laterales, la formación de uniones cruzadas proteína-proteína y la oxidación del esqueleto de la proteína resultando en la fragmentación de proteínas (Berlett y Stadtman,



1997). Todos los residuos de AA de las proteínas son susceptibles a la oxidación por el radical ( $\text{OH}\bullet$ ). Los residuos de metionina y cisteína son particularmente los más susceptibles (Berlett y Stadtman, 1997).

La presencia de grupos carbonilos en las proteínas ha sido utilizada como marcador de la oxidación proteica mediada por ROS (Berlett y Stadtman, 1997). Los derivados carbonilos pueden ser generados por la oxidación de residuos de lisina, arginina, prolina y treonina. Además pueden ser introducidos en las proteínas mediante reacciones con aldehídos (malonaldehído) producidos durante la peroxidación de lípidos o mediante derivados carbonilos reactivos (cetoaminas, cetoaldehídos) generados como consecuencia de la reacción de reducir azúcares o sus productos de oxidación con residuos de lisina de las proteínas (Berlett y Stadtman, 1997). Esto lleva a la formación de uniones cruzadas intra e intermoleculares que pueden favorecer la formación de agregados proteicos (Cecarini *et al.*, 2007).

El ataque oxidativo del esqueleto polipeptídico es iniciado por la sustracción de un átomo de hidrogeno de un residuo AA para formar un radical con carbono central (Cecarini *et al.*, 2007). La oxidación catalizada por metales es una de las más comunes, capaz de generar grupos carbonilos. Requiere la presencia de  $\text{Fe}^{+3}$  o  $\text{Cu}^{+2}$  (Cecarini *et al.*, 2007). Otros cationes divalentes ( $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ) pueden competir con el hierro o cobre por los sitios de unión a metales en proteínas y así prevenir la generación de radical  $\text{OH}\bullet$ , que es el mecanismo más importante del daño proteico. Además, el  $\text{Mn}^{+2}$  puede inhibir la reducción de  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  y así prevenir su habilidad para promover la formación del radical  $\text{OH}\bullet$ , así como la generación de otras formas de ROS (Berlett y Stadtman, 1997).

La fragmentación de proteínas está determinada por la generación de radicales alcoxilos, fijando así la etapa de ruptura del enlace peptídico, que ocurre como resultado del ataque de ROS a cadenas laterales con ácido glutámico, aspártico y prolina (Berlett y Stadtman, 1997).



La oxidación de proteínas sufre procesos similares a los de la oxidación lipídica, como las etapas de iniciación, propagación y terminación (Ventanas *et al.*, 2006), pueden causar cambios en la estructura de los AA, aumentos en la hidrofobicidad de las proteínas y pérdida en las actividades enzimáticas. Las proteínas oxidadas son comúnmente reconocidas y degradadas por proteasas intracelulares como el complejo proteasoma. Lamentablemente, hay evidencia de que los radicales libres pueden reaccionar con estos complejos proteolíticos induciendo un descenso en su funcionalidad. Si las proteínas oxidadas no son eficientemente removidas, pueden acumularse y alterar la función celular y promover la toxicidad (Cecarini *et al.*, 2007).

La oxidación proteica en alimentos cárnicos puede estar asociada a cualquiera de los factores pro-oxidativos involucrados en la formación de ROS. Dicha oxidación provoca un descenso en la funcionalidad de las proteínas musculares causando un aumento en la pérdida de agua, geles proteicos más débiles o emulsiones menos estables, debido a que hay una disminución en la solubilidad de las proteínas. Estas modificaciones pueden afectar negativamente la calidad sensorial de la carne fresca y de los productos cárnicos en términos de su valor nutricional, textura y color (Ventanas *et al.*, 2006).

## **2.5. Evaluación Sensorial**

En el mercado nacional e internacional, la búsqueda de la excelencia y la calidad, se ha convertido en meta fundamental para los productores de alimentos y bebidas (Parrilla-Corzas, 2002).

Existen numerosas definiciones de calidad pero se puede decir de manera general que se considera como la satisfacción de expectativas, pretensiones o especificaciones del cliente sobre el producto o servicio (Mondino y Ferratto, 2006).





Los métodos para evaluar la calidad son: escalas objetivas basadas en instrumentos de medición y métodos subjetivos basados en el juicio humano, como el análisis sensorial (Kader, 1992).

La evaluación sensorial se puede definir como la disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído (Parrilla-Corzas, 2002).

La aceptación de los alimentos por los consumidores, está muy relacionada con la percepción sensorial de los mismos. Es común que existan alimentos altamente nutritivos, pero que no son aceptados por los consumidores. De aquí parte la importancia del proceso de evaluación sensorial en los alimentos, siendo esta una técnica de medición tan importante, como los métodos químicos, físicos y microbiológicos (Olivas-Gastélum *et al.*, 2009).

Las técnicas de evaluación sensorial tienen fundamento científico al igual que otros tipos de análisis, al ser respaldadas por la estadística y la psicología, entre otras disciplinas. El estudio sensorial es de suma importancia en la industria de los alimentos tiene aplicaciones aún insospechadas, si tan solo se estudia seria y cuidadosamente. La evaluación sensorial de alimentos se lleva a cabo por medio de diferentes pruebas, dependiendo del tipo de información que se busque obtener.

Existen tres tipos principales de pruebas: las pruebas afectivas, las de discriminación y las descriptivas. Las pruebas afectivas son aquellas que buscan establecer el grado de aceptación de un producto a partir de la reacción del juez evaluador. Por otro lado, las pruebas de discriminación son aquellas en las que se desea establecer si dos muestras son lo suficientemente diferentes para ser catalogadas como tal. Finalmente, las pruebas descriptivas intentan definir las propiedades de un alimento y medirlas de la manera más objetiva posible (Anzaldúa-Morales, 1994).



Dentro de las pruebas de discriminación, se encuentran la prueba hedónica en la cual el juez catador expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o le disgusta, si lo acepta o lo rechaza, si lo prefiere a otro o no (Anzaldúa-Morales, 1994).

Los estudios de naturaleza hedónica son esenciales para saber en qué medida un producto puede resultar agradable al consumidor. Pueden aplicarse pruebas hedónicas para conocer las primeras impresiones de un alimento nuevo o profundizar más y obtener información sobre su grado de aceptación (Mondino y Ferratto, 2006).



### III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la mayoría de los alimentos están sometidos a muchas condiciones medioambientales que pueden modificar su composición original, como los cambios de temperatura, la oxidación y la exposición a microorganismos. En relación a los tratamientos térmicos, el freído es una de las técnicas de mayor uso para la cocción de los alimentos, durante el cual se originan algunas reacciones químicas que dan lugar a una serie de compuestos que confieren a los alimentos aromas y sabores agradables. Sin embargo, también genera características negativas como la formación de productos tóxicos, llamados glicotoxinas, entre las que destaca la acrilamida en papas fritas.

Por otra parte, tanto la oxidación lipídica como proteica, así como la presencia de microorganismos patógenos son una de las causas de mayor deterioro de la carne, que generalmente se caracteriza por olor y sabor desagradable, pérdida del color, textura y valor nutritivo que, consecuentemente, acorta la vida de anaquel y tiene un impacto negativo sobre la aceptabilidad de los alimentos por parte del consumidor.

Una práctica habitual en la industria alimentaria es el uso de antioxidantes sintéticos tales como butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroquinona terciaria (BHQT) los cuales son ampliamente utilizados para evitar reacciones de oxidación y reducir la formación de acrilamida. Sin embargo, existen serias preocupaciones sobre el potencial cancerígeno de estas sustancias. Lo anterior lleva a un interés tanto por parte de los consumidores como de los fabricantes de alimentos por sustituir los aditivos sintéticos por sustancias naturales con actividad antioxidante y antimicrobiana, tal como las especias culinarias.

Por si solas las especias culinarias son una fuente potencial de compuestos polifenólicos, considerando esto diversas investigaciones han realizado combinaciones de mezclas de especias demostrando un efecto sinérgico, de aquí el interés de buscar nuevas combinaciones de especias para su aplicación en la industria de alimentos.



#### **IV. HIPÓTESIS**

La aplicación de aditivos comestibles a base de combinaciones de especias culinarias, reducirá la concentración de acrilamida en papas fritas, protegerá a los lípidos y proteínas del daño oxidativo y presentará actividad antimicrobiana en la carne de cerdo.



## V. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Evaluar la adición de aditivos comestibles desarrollados a base de combinaciones de especias culinarias en la formación de acrilamida en papas fritas, así como en la estabilidad oxidativa y actividad antimicrobiana en la carne de cerdo.

### 5.2. Objetivos específicos

- Determinar la actividad antioxidante por medio del método 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH•) de veinticuatro especias culinarias maceradas con los distintos disolventes de extracción.
- Desarrollar veintitrés binas de especias con base en la especia que presente la mejor actividad antioxidante.
- Determinar la actividad antioxidante por medio del método 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH•) de las veintitrés binas de especias, seleccionando aquellas tres que hayan presentado la mayor actividad antioxidante.
- Determinar cuál de las tres binas de especias presenta el mayor contenido de compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante y quelante. Con base a ella, desarrollar cinco aditivos comestibles.
- Evaluar la capacidad de los aditivos de inhibir la formación de acrilamida en papas fritas.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana de tres aditivos seleccionados al ser incorporados en las hamburguesas de carne de cerdo cruda.



- Evaluar la eficacia de tres aditivos seleccionados como inhibidores de la oxidación de lípidos y proteínas al ser incorporados en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada.
- Evaluar la calidad sensorial de hamburguesas de carne de cerdo preparadas con la inclusión de tres aditivos seleccionados.



## VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la figura 2 se define gráficamente como se estableció el diseño experimental del presente trabajo de investigación que consistió en tres fases. En la primera fase del experimento se realizó la evaluación para determinar la actividad antioxidante de las veinticuatro especias culinarias maceradas con los distintos disolventes de extracción bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 24 x 6 (especias x disolventes). En esta se determinó cual fue la especia que presentó la mayor actividad antioxidante, así como cuál fue el disolvente con el que se obtuvo una mejor extracción de los compuestos polifenólicos totales (CFT). A partir de dicha especia se realizaron 23 binas de especias a las cuales se les determinó su actividad antioxidante, eligiendo las tres que presentaron la mayor actividad a las que también se determinó el contenido de CFT, actividad quelante y antioxidante. Tomando como base la bina que presentó las mejores características en los parámetros analizados, se desarrollaron cinco aditivos comestibles, a los cuales se les determinó el contenido de azúcares reductores totales, CFT, actividad quelante y antioxidante, así como actividad agua y pH.

En la segunda fase del experimento los cinco aditivos elaborados fueron aplicados a papas crudas tipo “a la francesa”, contrastando su efecto con unas papas sin aditivos consideradas como control, otras papas adquiridas en comercios públicos y otras papas con adición de ácido ascórbico. Lo anterior para evaluar el impacto de los aditivos como inhibidores en la formación de acrilamida en las papas fritas.

En la tercera fase del experimento se seleccionaron tres de los cinco aditivos desarrollados con base al mayor contenido de CFT, actividad antioxidante y quelante, para ser aplicados en carne de cerdo cruda y cocinada, además de evaluar el impacto de estos sobre la estabilidad oxidativa en la carne a través del tiempo durante almacenamiento en refrigeración (del día inicial hasta el día doce). De igual manera, se determinó el impacto de los aditivos sobre la actividad antimicrobiana en carne cruda inoculada con *Escherichia coli* O157:H7. Por otro lado, se evaluó el grado de aceptabilidad de la carne de cerdo cocinada adicionada con los



aditivos como un nuevo ingrediente no convencional mediante un análisis sensorial de olor, sabor, color y textura a través de un panel de catadores no entrenado.



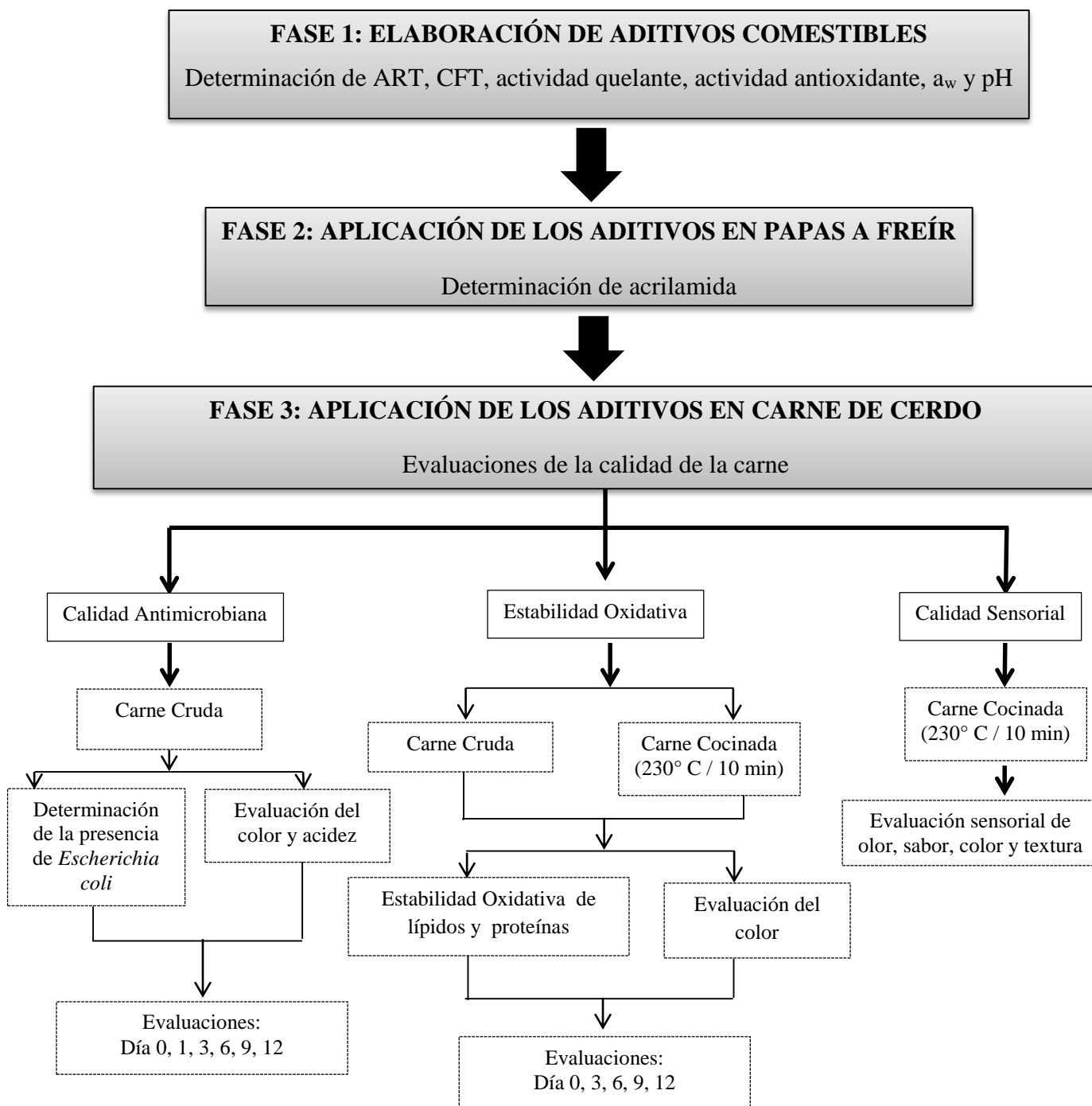


Figura 2. Diseño experimental.



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Fase 1 del experimento: Elaboración de aditivos comestibles y evaluaciones analíticas

Se analizaron un total de 24 especias culinarias, las cuales fueron obtenidas de un supermercado local de la ciudad de Tepic, Nayarit, México. Las especias utilizadas fueron: cilantro, ruda, orégano, hierbas de olor, albahaca, clavo, tomillo, romero, hojas de laurel, epazote, comino, ajo, canela, pimienta negra, jengibre, cebolla, pimienta, cúrcuma, chiles piquín, pasilla, de árbol, guajillo, ancho y habanero. Las especias se deshidrataron (solo aquellas que lo requirieron, tales como: cilantro, ruda, albahaca, epazote, pimienta y chile habanero) por 6 h en un secador solar (42 °C, 45% humedad relativa), posteriormente se trituraron en un mortero por separado.

De cada una de las especias trituradas se tomó 1 g colocándolo en tubos *Falcon* de 15 mL, en cada tubo se vertieron 10 mL de cada disolvente utilizado, dejándose macerar por 24 h. Los disolventes empleados fueron: mezcal (28% de alcohol), tequila (35%), vodka (38%), ron (40%), etanol/agua (40%-60%) y agua destilada (100%). En total se formaron seis grupos, uno por disolvente, donde cada grupo contenía a las 24 especias estudiadas.

A cada especia macerada y por cada disolvente se le determinó la actividad antioxidante por el método 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH●) de acuerdo al procedimiento reportado por Morales y Jiménez-Pérez (2001) (anexo 1).

De los seis grupos formados, se escogió el grupo que presentó los valores más altos de actividad antioxidante, de él se eligió la especia con el valor más alto para formar binas con cada una de las 23 especias restantes del grupo; a las 23 binas formadas se les determinó la actividad antioxidante por el método 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH●).



Se eligieron las tres binas con la mayor actividad antioxidante, a las cuales se les determinó el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de acuerdo al método de Stintzing *et al.* (2005), la actividad quelante de acuerdo al método de Guicin *et al.* (2003) y la actividad antioxidante por medio de tres metodologías más. Dichas metodologías fueron: ABTS●+ de acuerdo al procedimiento desarrollado por Re *et al.* (1999) y descrito por Kuskoski *et al.* (2004), capacidad reductora de Fe (III) a Fe (II) (FRAP) de acuerdo al procedimiento reportado por Hinneburg *et al.* (2006) y ORAC de acuerdo al procedimiento descrito por Huang *et al.* (2002), Cao y Prior (1999) (anexo 1).

A partir de la bina que presentó el mayor contenido de CFT, actividad quelante y la mayor actividad antioxidante, se desarrollaron cinco aditivos, los cuales fueron elaborados con varias especias culinarias (ricas en compuestos fenólicos), jugo de limón, cálices de jamaica verde y sal que le impartieron un mejor sabor y olor a la bina. Los ingredientes y concentraciones de cada uno de los 5 aditivos se muestran en los cuadros 2 y 3. La elaboración de los aditivos (figura 3) consistió en licuar a la vez cada uno de los ingredientes hasta obtener una consistencia pastosa, la pasta se colocó en tubos tipo *Falcon* de 50 mL para su centrifugación. Una vez centrifugados se tomó el sobrenadante para depositarlo nuevamente en tubos tipo *Falcon* de 50 mL.

Posteriormente, a cada uno de los cinco aditivos elaborados se les determinó el contenido de azúcares reductores totales de acuerdo al método de Bello-Gil *et al.* (2006) (anexo 1), CFT, actividad antioxidante (DPPH●, ABTS●+, FRAP y ORAC), actividad quelante, pH y actividad de agua ( $a_w$ ). Para la determinación de pH se utilizó un potenciómetro marca HORIBA®, mientras que para la actividad de agua un equipo marca AQUA LAB®.



**Cuadro 2.** Ingredientes de los aditivos 1, 2 y 3.

<b>Aditivo #1</b>	<b>Aditivo #2</b>	<b>Aditivo #3</b>
200 g de cebolla	200 g de cebolla	200 g de cebolla
20 g de cilantro	20 g de cilantro	20 g de cilantro
2 g de pimienta negra	15 g de orégano	15 g de hojas de laurel
18 g de chile verde	75 mL de jugo de limón	75 mL de jugo de limón
14 g de ajo	50 mL de la bina base	50 mL de la bina base
6 g de sal		
75 mL de jugo de limón		
50 mL de la bina base		

**Cuadro 3.** Ingredientes de los aditivos 4 y 5.

<b>Aditivo #4</b>	<b>Aditivo #5</b>
400 g de cebolla	200 g de cebolla
40 g de cilantro	20 g de cilantro
1 g de sal	2 g de pimienta negra
150 mL de jugo de limón	18 g de chile verde
50 mL de la bina base	14 g de ajo
	6 g de sal
	8 g de cálices de jamaica verde (variedad UAN-4)
	75 mL de jugo de limón
	50 mL de la bina base



**Figura 3.** Elaboración de los aditivos.

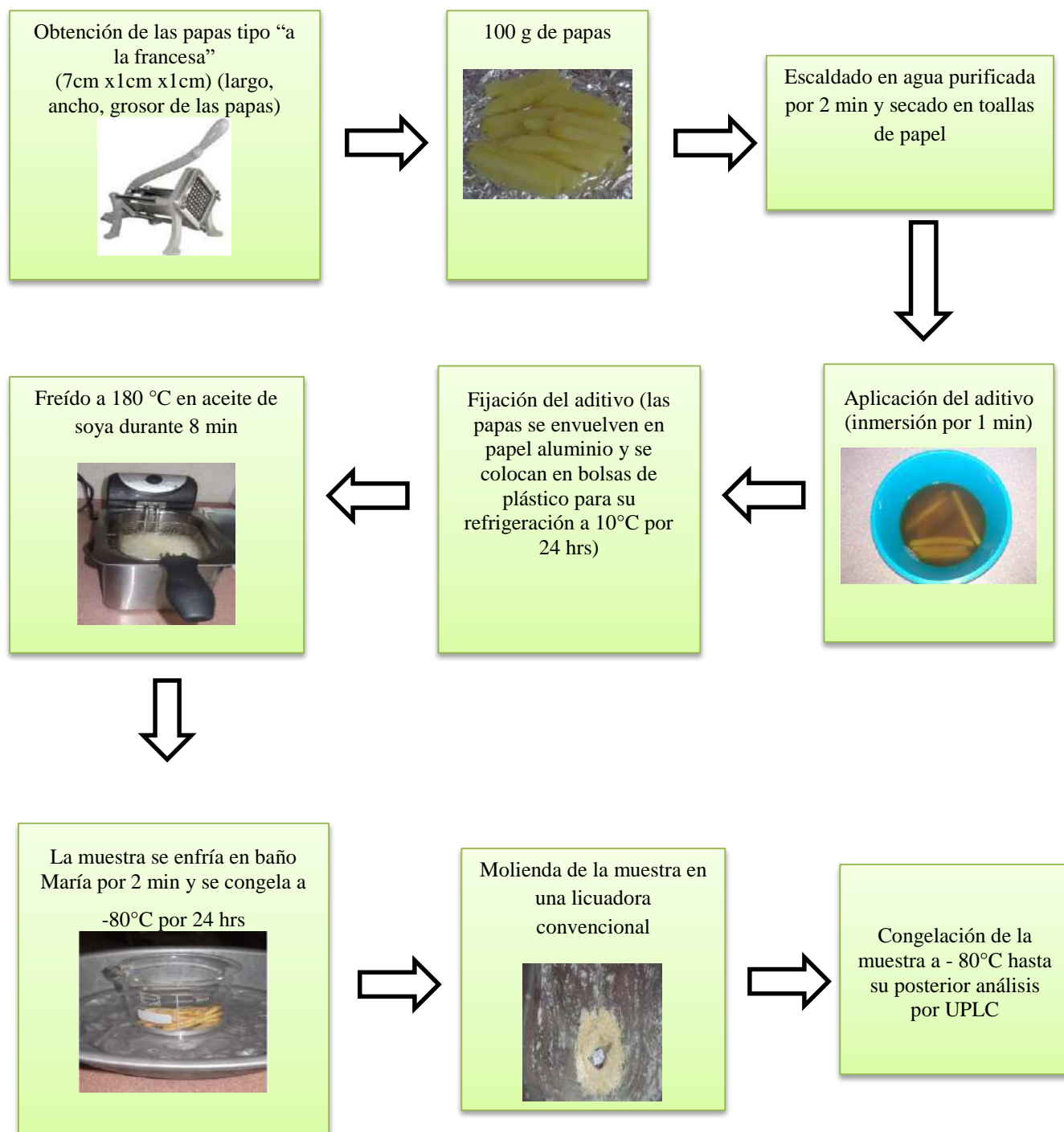
## 7.2. Fase 2 del experimento: Aplicación de los aditivos en papas a freír

Las papas crudas fueron adquiridas en un supermercado local de la ciudad de Tepic, Nayarit, México. Posteriormente, fueron lavadas y peladas para la obtención de las papas tipo “a la francesa” y la aplicación en ellas de los aditivos (figura 4). La aplicación de los aditivos se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Morales *et al.* (2014), la fijación con base a lo señalado por Gibis y Weiss (2012), Puangsombat *et al.* (2011) y Puangsombat y Smith (2010), el escaldado, temperatura de freído y congelación conforme a lo mencionado por Kalita *et al.* (2013) y el tipo de aceite en base a lo reportado por PROFECO (2010) y ANIAME (2009).

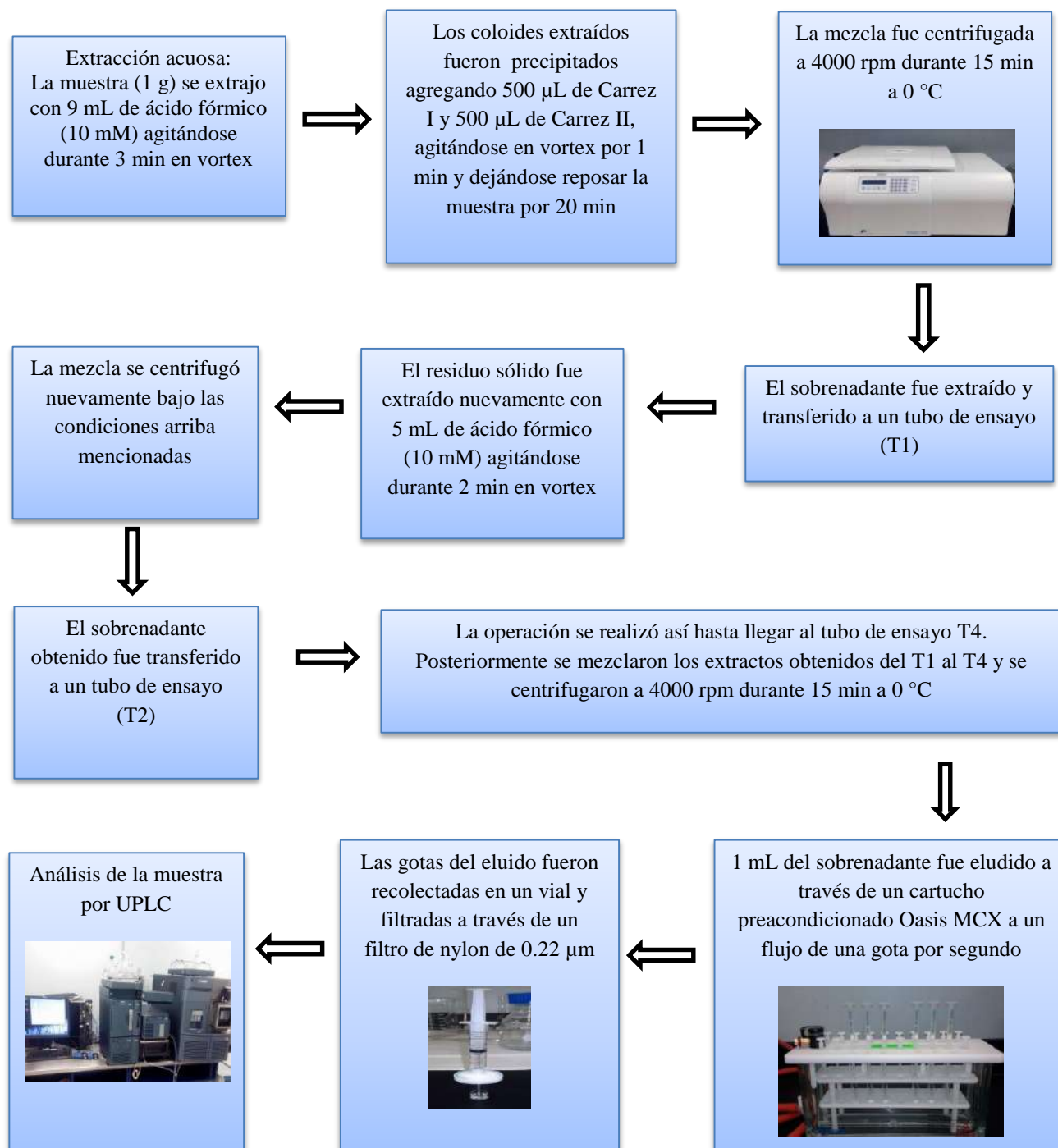
La preparación de la muestra y extracción de acrilamida, así como el análisis cromatográfico se realizó en base a la metodología de Van Der Fels-Klerx *et al.* (2014) (figuras 5 y 6). Cabe



señalar que como control positivo se aplicó un extracto acuoso de ácido ascórbico (5 g/ 100 mL de agua destilada) a papas crudas tipo “a la francesa”, las cuales fueron fritas bajo las mismas condiciones utilizadas para las papas con aditivo. Ya que, existen reportes de la eficacia del ácido ascórbico para inhibir la formación de acrilamida (Chen *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2011; Biedermann *et al.*, 2002). Adicionalmente, se determinó la concentración de acrilamida en papas comerciales obtenidas de un restaurante de comida rápida ubicado en la ciudad de Tepic, Nayarit.



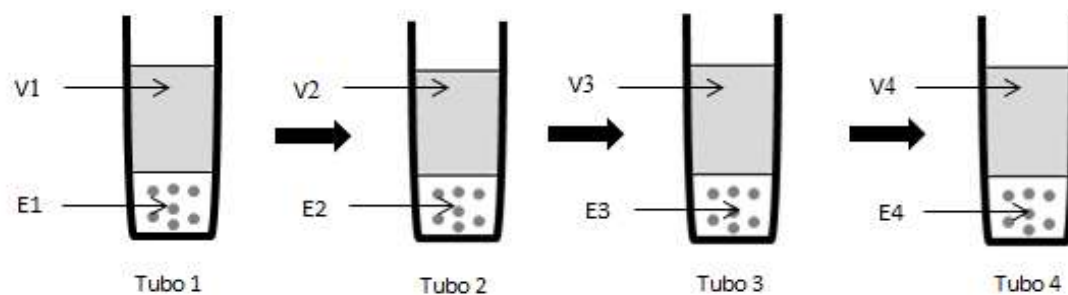
**Figura 4.** Diagrama de la aplicación del aditivo en papas a freír.



Carrez I (15 g de Hexacianoferrato de potasio en 100 mL de agua destilada)  
Carrez II (30 g de sulfato de zinc en 100 mL de agua destilada)

Figura 5. Diagrama de la preparación de la muestra y extracción de acrilamida.





**Figura 6.-** Extracción en múltiple etapas para el análisis de acrilamida en alimentos (Gökmen *et al.*, 2009).

(V=volumen) (E=extracto)

El contenido de acrilamida se obtuvo con un análisis en un equipo ACQUITY H clase UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) (marca Waters) acoplado a un detector QDa (masas simple) con ionización por electrospray (ESI) operando en modo positivo. Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm x 2.1 mm, i.d., x 1.7  $\mu\text{m}$ ) (marca Waters) utilizando ácido fórmico (10mM) con 0.5% de metanol como fase móvil a un flujo de 0.2 mL/min. La columna fue equilibrada a 25  $^{\circ}\text{C} \pm 5$   $^{\circ}\text{C}$  y el automuestreador se mantuvo a 10  $^{\circ}\text{C} \pm 5$   $^{\circ}\text{C}$  durante todo el análisis. El volumen de inyección fue de 4  $\mu\text{L}$ . El tiempo de retención hasta observarse el pico correspondiente a la acrilamida fue de 1.063 min. La fuente del detector tuvo las siguientes características: voltaje del capilar 1 KV, voltaje del cono 5 V, temperatura de solvatación 500  $^{\circ}\text{C}$ , el gas de solvatación fue nitrógeno.

La acrilamida fue identificada por Selected Ion Recording (SIR por sus siglas en inglés) de un canal, el cual fue de 72. La concentración se calculó mediante una curva de calibración con rangos de entre 0 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



### 7.3. Fase 3 del experimento: Aplicación de los aditivos en carne de cerdo

Para el estudio de la evaluación de la capacidad antimicrobiana y estabilidad oxidativa de los aditivos se aplicaron en la carne de cerdo solo tres de los cinco aditivos elaborados. Su elección fue en base a aquellos que presentaron la mayor concentración de CFT, la mejor actividad antioxidante y quelante, así como por presentar similitud con el resto de los aditivos en lo referente a las especias que los integran.

Los aditivos seleccionados fueron: aditivo # 2, 3 y 5.

#### 7.3.1. Elaboración de sistemas modelo tipo hamburguesas

Se desarrollaron sistemas modelo tipo hamburguesa con carne de cerdo (músculo *Longissimus dorsi*) siguiendo las especificaciones descritas en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Formulación para la elaboración de sistemas modelo tipo hamburguesa de carne de cerdo.

Ingrediente	Porcentaje %	
	Control	Tratados con aditivo
Lomo de cerdo	80	80
Grasa dorsal	10	10
Sal	1	1
Agua	9	4.5
Aditivo acuoso	0	4.5

La elaboración de las hamburguesas consistió en moler la carne y la grasa en un molino de carne (marca Torrey), una vez molida la carne, se mezcló la sal, el agua y el aditivo (si es que aplica) hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla se envasó en bolsas de plástico transparente, las cuales fueron sometidas al alto vacío para eliminar las burbujas de aire



internas que se pudieran formar. A partir de la mezcla obtenida, se pesaron porciones de 60 g de masa y con la ayuda de un aro metálico de 8 cm de diámetro, se elaboraron los sistemas modelo tipo hamburguesas.

### **7.3.2. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de los aditivos incorporados en carne cruda de cerdo**

#### **7.3.2.1. Preparación del inóculo**

La cepa aislada de *Escherichia coli* O157:H7 (código ATCC 25922, fue aislada y caracterizada previamente por Castro-Rosas, 2009) se sembró en caldo de soya tripticaseina (CST) (marca DIBICO) a una concentración de 100 mL del inóculo/1L de caldo a 37°C por 24 h para asegurar su crecimiento (activación) (García-Guardado, 2011).

#### **7.3.2.2. Evaluación antimicrobiana de los aditivos *in vitro***

La actividad antimicrobiana de los aditivos fue determinada por medio de un lector de microplacas (Multiskan GO), donde se midió la absorbancia a 600 nm de los pocillos, los cuales contenían 200 µL de caldo soya tripticaseina con el inóculo a una concentración de  $10^5$  UFC/mL y 50 µL del aditivo, por 24 h a una temperatura de 37°C. Las lecturas se realizaron cada hora y las microplacas se agitaron por 30 s antes de cada medición (Rufián-Henares y Morales, 2008).

#### **7.3.2.3. Evaluación antimicrobiana de los aditivos *in vivo* aplicados en hamburguesas de carne cruda de cerdo**

Para evaluar la capacidad antimicrobiana de los aditivos se preparó 2 L de suspensión de células de *E. coli* a una concentración de  $10^5$  UFC/mL en una solución isotónica al 0.8% como medio de infección para las hamburguesas.



Las hamburguesas fueron impregnadas por ambos lados con el medio de infección mediante la ayuda de una brocha de plástico. Posterior a la inoculación las hamburguesas fueron colocadas en recipientes de plásticos transparentes y refrigerados a  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  por un periodo de 12 días, realizando muestreos los días 0, 1, 3, 6, 9 y 12. La toma y manejo de las muestras se realizó en base a la NOM-109-SSA1-1994, mientras que la preparación y dilución de las muestras conforme a la NOM-110-SSA-1994. Para evaluar la presencia de *E. coli* se empleó agar Salmonella Shigella, utilizando una temperatura de incubación de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. El conteo de microorganismos se realizó conforme a la norma NOM-113-SSA1-1994.

#### **7.3.2.4. Evaluación de acidez titulable en hamburguesas de carne cruda de cerdo recubiertas con aditivo e inoculadas con *Escherichia coli***

La determinación de la acidez titulable se realizó conforme a lo descrito por Pérez Chabela y Ponce Alquicira (2013). El análisis consistió en pesar 10 g de muestra para posteriormente colocarla en una bolsa de polietileno transparente, se adicionaron 200 mL de agua destilada y se homogenizó manualmente durante 1 min. Enseguida se filtró a través de una gasa para eliminar el exceso de tejido conectivo, el filtrado se recibió en un matraz aforado de 250 mL y se aforó con agua destilada.

Se transfirió una alícuota de 25 mL del filtrado a un matraz *Erlenmeyer* de 125 mL, se añadieron 75 mL de agua destilada y 2 gotas de fenolftaleína, se agitó suavemente y tituló con hidróxido de sodio (0.1 N). El blanco fue preparado con agua destilada.

La acidez fue reportada como porcentaje de ácido láctico, aplicando la siguiente formula:

$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{(V - V_b) (N \text{ NaOH}) (\text{meq ácido láctico}) (f_D)}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

Donde:

V= volumen de NaOH gastado en la muestra

Vb= volumen de NaOH gastado en el blanco



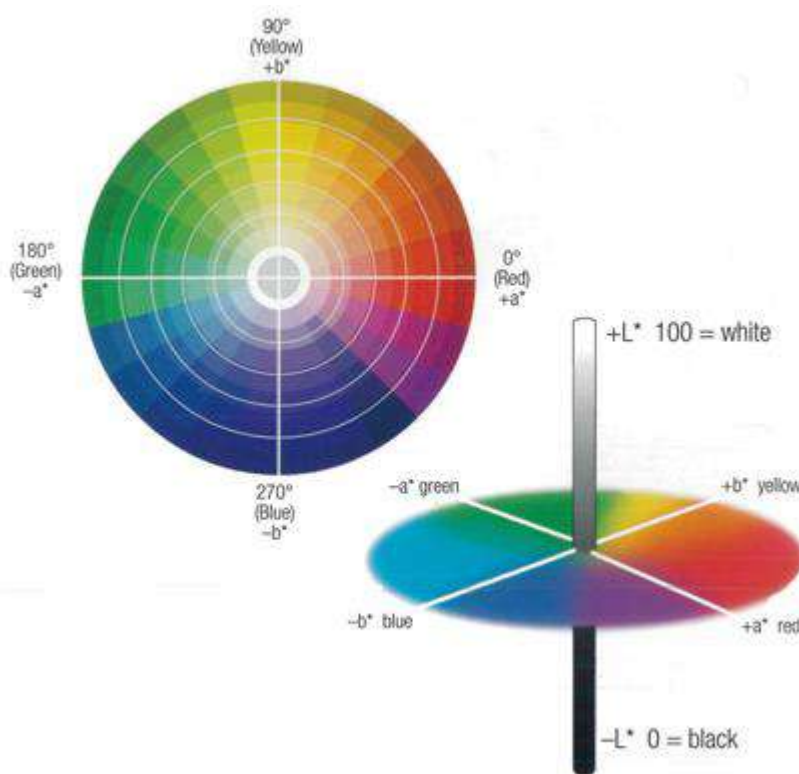
N= normalidad de NaOH

Meq= miliequivalentes del ácido láctico

F<sub>D</sub>=factor de dilución

### **7.3.2.5. Evaluación de color en hamburguesas de carne cruda de cerdo inoculadas en *Escherichia coli***

Para determinar el deterioro del color de la carne por microorganismos a lo largo del tiempo, se realizaron evaluaciones de color por medición instrumental (CIE, 1978) con la ayuda de un colorímetro (Konica Minolta®) en la superficie de las hamburguesas de carne de cerdo cruda inoculadas en el medio de infección (*E. coli*) y tratadas con los aditivos, a los días 0, 1, 3, 6, 9 y 12 de almacenamiento en refrigeración a  $4 \pm 2$  °C. Las mediciones se realizaron por triplicado en tres zonas distintas elegidas aleatoriamente y a temperatura ambiente ( $\approx 25$ °C). Se utilizó el sistema de medida de color CIE-L\*a\*b\* que define el color con la utilización de los tres componentes; L\* determina la intensidad de la luminosidad (L\*=0 oscuro, L\*=100 luminoso); los parámetros a\* y b\* fueron utilizados para calcular el ángulo *Hue* (°h) como lo indican García-Tejeda *et al.* (2011):  $^{\circ}h = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ , cuando  $a^* > 0$  y  $b^* \geq 0$  o  $^{\circ}h = 180 + \tan^{-1}(b^*/a^*)$  cuando  $a^* < 0$ . En la figura 7 se puede observar el diagrama de cromaticidad del espacio de color y luminosidad, el espacio de color se encuentra expresado tanto en los parámetros de a\* y b\*, así como en grados *Hue*.



**Figura 7.** Diagrama de cromaticidad del espacio de color y luminosidad. Consultado en la página web: [www.bonlalum.com](http://www.bonlalum.com)

La diferencia total de color ( $\Delta E$ ) se calculó para evaluar los cambios de color total sufrido en las hamburguesas como resultado de los tratamientos aplicados, el deterioro por microorganismos y los días de almacenamiento en refrigeración. Por lo tanto,  $\Delta E_{C-T}$  se calculó entre las muestras del grupo control C y cada grupo tratado (T) utilizando la escala de color CIE-L\*a\*b\* para cada día de medición de la siguiente manera:

$$\Delta E_{C-T} = [(L^*_T - L^*_C)^2 + (a^*_T - a^*_C)^2 + (b^*_T - b^*_C)^2]^{1/2}$$



### **7.3.3. Evaluación de la estabilidad oxidativa de hamburguesas de carne de cerdo**

#### **7.3.3.1. Preparación del sistema modelo para determinar estabilidad oxidativa**

A partir de cada tratamiento, se elaboraron cinco hamburguesas (una para cada día de muestreo) para evaluar la estabilidad oxidativa del color, lípidos y proteínas en la carne cruda y cocinada. Las hamburguesas crudas fueron depositadas en charolas de poliestireno y cubiertas con papel film transparente permeable al oxígeno ( $14\mu\text{m}$  de grosor y  $10,445\text{ mL/m}^2/24\text{h}$ ) y almacenadas en refrigeración a  $4 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$  con luz blanca fluorescente ( $1620\text{ lux}$ ) las 24 h. Para evaluar el efecto del procesamiento térmico de la carne, un grupo de hamburguesas se cocinaron a la plancha a una temperatura de  $230\text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 min por cada lado en una parrilla Oster Bioceramic. Posterior a la cocción, se dejaron enfriar a temperatura ambiente ( $\approx 25\text{ }^\circ\text{C}$ ) y una vez frías, fueron almacenadas bajo las mismas condiciones descritas para las hamburguesas crudas. Todas las hamburguesas estuvieron en almacenamiento refrigerado por un periodo de 12 días, realizando muestreos los días 0, 3, 6, 9 y 12.

#### **7.3.3.2. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada**

Se tuvieron hamburguesas crudas y cocinadas a la plancha a las cuales se les determinó la estabilidad oxidativa de lípidos a lo largo del tiempo, mediante la técnica de TBARS descrita por Ganhão *et al.* (2011), la cual consistió en:

Pesar 5 g de muestra en un tubo *Falcon* de 50 mL, posteriormente se agregaron 15 mL de ácido perclórico (3.8%) y 500  $\mu\text{L}$  de BHT (butilhidroxitolueno) al 4.2 % en etanol. Las muestras fueron homogenizadas. Durante el desarrollo de este paso los tubos *Falcon* permanecieron inmersos en hielo para minimizar la generación de nuevas reacciones oxidativas. Se limpió el homogeneizador con ácido perclórico entre muestra y muestra.



Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 4 min, a 4 °C. El sobrenadante recuperado se filtró con papel Whatman #64, recolectando el filtrado en un matraz aforado de 25 mL, escurriendo y lavando bien con ácido perclórico los filtros hasta aforar. El extracto se pasó a tubos *Falcon* y se centrifugaron a 3000 rpm durante 4 min.

Se prepararon tubos de ensayo con rosca (2 por muestra) y se agregaron 2 mL de muestra y 2 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico). Al testigo se agregaron 2 mL de ácido perclórico y 2 mL de TBA. Los tubos fueron agitados y posteriormente se colocaron en agua a 100 °C durante 45 min. Se dejaron enfriar para enseguida leer en un espectrofotómetro a 532 nm en cubetas de cristal.

La curva estándar se preparó utilizando 1, 1, 3,3-tetraetoxipropano (TEP) a concentraciones de entre 0.028 a 1.113 mg TEP/L. Los resultados se expresaron en mg de MDA (ácido malonaldehído)/kg de muestra. Debido a que el MDA es uno de los principales productos formados durante la oxidación de lípidos (Vicario *et al.*, 1997).

### **7.3.3.3. Determinación del total de carbonilos de proteína por la técnica DNPH en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada**

La oxidación de proteínas se evaluó mediante la cuantificación del total de carbonilos presentes en las hamburguesas crudas y cocinadas durante el periodo de tiempo de 12 días, por derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) de acuerdo al método descrito por Ganhão *et al.* (2010a), el cual consistió en:

Homogenizar 1 g de muestra en un tubo *Falcon* de 50 mL, usando 10 mL de cloruro de sodio (NaCl) 0.6 N disuelto en buffer de fosfatos ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) 20 mM a pH 6.5. Durante el desarrollo de este paso los tubos permanecieron inmersos en hielo para minimizar la generación de nuevas reacciones oxidativas. Se limpió el homogeneizador con buffer de fosfatos entre muestra y muestra.





Se colocaron alícuotas de 150  $\mu\text{L}$  en tubos *Eppendorf* de 2 mL, se rotuló un tubo con “C” y otro con “P”, para determinar de forma paralela el contenido de carbonilos (C) y la concentración de proteínas (P) de una determinada muestra. Las proteínas fueron precipitadas con 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) al 10% por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min a 4°C. Se retiró la fracción líquida respetando la pastilla resultante de los tubos C y P.

A los tubos C se les agregó 1 mL de una solución de DNHP al 2% en ácido clorhídrico (HCl) 2 N, mientras que a los tubos P se les agregó 1 mL de HCl 2 N. Las muestras fueron agitadas en vortex y se dejaron incubar durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la incubación las muestras se precipitaron con 1 mL de TCA al 10% y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C. Una vez centrifugadas las muestras, se retiró nuevamente la fracción líquida respetando la pastilla resultante de los tubos C y P, para enseguida realizar dos lavados tanto a los tubos C y P con 1 mL de etanol/acetato de etilo (1:1 v/v), centrifugando a 10,000 rpm por 5 min a 4°C en cada lavado, para eliminar el exceso de DNPH.

Las pastillas resultantes se disolvieron en 1.5 mL de clorhidrato de guanidina 6 M disuelto en buffer de fosfatos 20 mM, pH 6.5. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 min a 4°C. Las muestras rotuladas con la letra C se leyeron a 370 nm en un espectrofotómetro en cubeta de cristal, mientras que las muestras rotuladas con la letra P se leyeron a 280 nm en cubeta de cuarzo. La concentración de proteína se calculó a partir de la absorbancia obtenida de la muestra y la de un patrón de BSA (albúmina sérica bovina) (concentración de 0.5149 mg/L de BSA). Como testigo se utilizó clorhidrato de guanidina. La cantidad de carbonilos se expresó como nanomoles (nM) de carbonilos por mg de proteína usando un coeficiente de extinción molar de hidrazinas ( $21.0 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) a 370 nm.

#### **7.3.3.4. Evaluación de color en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada**

Para determinar el deterioro del color de la carne por almacenamiento a lo largo del tiempo, se realizaron evaluaciones de color por medición instrumental (CIE, 1978) en la superficie de las hamburguesas tratadas con los aditivos, los días 0, 3, 6, 9 y 12 de almacenamiento en



refrigeración a  $4 \pm 2$  °C. Se utilizó un colorímetro marca Minolta modelo CR-410, el cual consiste en un cabezal medidor (CR-410), con un área de medición de 10 mm de diámetro y un procesador de datos. Cada medición consistió de tres flashazos de iluminación consecutivos para obtener un valor promedio. Las mediciones se realizaron en tres zonas distintas elegidas aleatoriamente y a temperatura ambiente ( $\approx 25^\circ\text{C}$ ). Se utilizó el sistema de medida de color CIE- $L^*a^*b^*$  que define el color con la utilización de los tres componentes;  $L^*$  determina la intensidad de la luminosidad ( $L^*=0$  oscuro,  $L^*=100$  luminoso); los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  fueron utilizados para calcular el ángulo *Hue* ( $^\circ\text{h}$ ) como lo indican García-Tejeda *et al.* (2011):  $^\circ\text{h}=\tan^{-1}(b^*/a^*)$ , cuando  $a^*>0$  y  $b^*\geq 0$  o  $^\circ\text{h}=180 + \tan^{-1}(b^*/a^*)$  cuando  $a^*<0$ .

La diferencia total de color ( $\Delta E$ ) se calculó para evaluar los cambios de color total sufrido en las hamburguesas como resultado de los días de almacenamiento en refrigeración. Por lo tanto,  $\Delta E_{C-T}$  se calculó entre las muestras del grupo control (C) y el grupo tratado (T) utilizando la escala de color CIE- $L^*a^*b^*$  para cada día de medición de la siguiente manera:

$$\Delta E_{C-T} = [(L^*_T - L^*_C)^2 + (a^*_T - a^*_C)^2 + (b^*_T - b^*_C)^2]^{1/2}$$

#### 7.3.4. Análisis sensorial

Para la evaluación sensorial de las hamburguesas cocinadas (siguiendo el mismo procedimiento de cocción) se empleó un test hedónico (Peryam y Pilgrim, 1957) con escala de siete puntos (cuadro 5). Cada hamburguesa se cocinó y cortó en cuatro partes para ofrecerlas a un panel no entrenado. Se les indicó a los jueces que evaluaran los atributos de olor, color, sabor y textura, marcando con una “X” la calificación que consideraron oportuna asignarle a cada muestra. La escala hedónica que se utilizó fue la siguiente:



**Cuadro 5.** Escala hedónica de siete puntos.

<b>Escala</b>	<b>Valor</b>
Me gusta muchísimo	7
Me gusta mucho	6
Me gusta poco	5
Ni me gusta ni me disgusta	4
Me disgusta poco	3
Me disgusta mucho	2
Me disgusta muchísimo	1

### 7.3.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los parámetros evaluados en la fase 1 (CFT, actividad antioxidante, azúcares reductores totales, pH y  $a_w$  de los aditivos), la fase 2 (determinación de acrilamida) y la fase 3 (evaluación antimicrobiana, análisis de acidez, determinación de color e inhibición de la oxidación de lípidos y proteínas) se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Mientras que los resultados de determinación de actividad antioxidante (fase 1) de las especias culinarias maceradas en los distintos disolventes se analizaron con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 24 x 6 (especias x disolventes). Cuando el análisis fue significativo ( $p \leq 0.05$ ) se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey con el fin de establecer las diferencias existentes entre cada tratamiento.

Por otra parte, los resultados de diferencia total de color y del análisis sensorial (fase 3) se realizaron mediante la prueba de Hipótesis por la metodología de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0.05$ ).

Se calcularon coeficientes de correlación de Pearson para establecer asociaciones lineales entre variables de interés. Todos los análisis estadísticos se realizaron por medio del paquete Minitab v.16.0.



## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Fase 1 del experimento. Elaboración de aditivos comestibles

#### 8.1.1. Contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de las especias culinarias y binas de especias

La actividad antioxidante de acuerdo a la técnica del radical DPPH• de 24 especias maceradas en seis distintos disolventes utilizados (agua, mezcal, tequila, vodka, ron y etanol/agua) se puede observar en el cuadro 6 (a y b). Los resultados obtenidos señalan que las 24 especias estudiadas mostraron actividad antioxidante tanto en los extractos hidrosolubles como en los extractos etanólicos. Dicha actividad se puede deber a la presencia de diversos constituyentes fenólicos, tales como rosmanol, epirosmanol, e isorrosmanol en el romero; ácido rosmarínico,  $\alpha$ -pineno y timol en el orégano; carvacrol y cimeno en tomillo; eugenol y cineol en hojas de laurel (Hernández-Hernández *et al.*, 2009; Bitar *et al.*, 2008; Hatzidimitrioua *et al.*, 2007); ácido vinílico, cafeico y gálico en canela; ácido hidroxibenzoico y carofileno en clavo; eugenol y limoneno en pimienta negra (El-Ghorab *et al.*, 2010; Chaieb *et al.*, 2007; Yanishieva *et al.*, 2006), quercetina y alil-cistenina en ajo (Brewer, 2011); ácido ferúlico y cinámico en cebolla (Gorinstein *et al.*, 2008).

Se puede destacar que las especias maceradas en ron presentaron la más alta actividad antioxidante, en comparación de las especias que fueron maceradas en los cinco disolventes restantes. Esto se puede deber a que este disolvente presentó mayor porcentaje de etanol (40%) en comparación con el mezcal (28%), tequila (35%), vodka (38%) y agua, excepto la solución preparada de etanol/agua (40%-60%). Esto indica que posiblemente el porcentaje presente de etanol en el ron pudo favorecer la extracción de compuestos fenólicos. Otro factor que puede atribuirse a la alta actividad antirradical de las especias maceradas en ron, es que durante el proceso de fabricación de esta bebida, según la norma mexicana NOM-142-SSA1-1995, este puede presentar trazas de alcoholes de peso molecular superiores al alcohol etílico,



los cuales se expresan como alcohol amílico, dichos compuestos también pudieron haber influido en favorecer el proceso de extracción de los compuestos fenólicos de las especias.

Dentro las especias maceradas en ron, la canela fue la especia que presentó la mayor actividad antioxidante (93311  $\mu\text{mol ET/L}$ ). Esto concuerda con las investigaciones de Morales *et al.* (2014), Vallverdú-Queralt *et al.* (2014), Lv *et al.* (2012), Wen *et al.* (2009), Castañeda *et al.* (2008), Chen (2008), Muchuweti *et al.* (2007) y Murcia *et al.* (2004), los cuales han confirmado que la canela se encuentra entre las especias con mayor actividad antioxidante en comparación con orégano, tomillo, cilantro, hojas de buganvilia, hojas de té verde, hojas de laurel, romero, mejorana, perejil, albahaca, menta, anís, jengibre, vainilla, entre otras.

Cabe señalar, que la obtención de una mayor actividad antioxidante mediante el uso de solventes etanólicos ya ha sido comprobada por Liang *et al.* 2010, Hernández-Hernández *et al.* 2009, Wang *et al.* 2008 y Ghiselli *et al.* 2000. Watanabe y Ayano (1974) analizaron la actividad antioxidante de la fracción hidrosoluble y soluble en etanol de 11 especias molidas, encontrando que la mayoría de las actividades antioxidantes parecieron residir en las fracciones solubles en etanol. Dicho efecto también se pudo observar en el presente trabajo, pues de manera general, los extractos etanólicos de las 24 especias exhibieron una mayor actividad antioxidante que los extractos hidrosolubles.

Por otra parte, Kanatt *et al.* (2010) señalan que el agua no es el mejor solvente de extracción para fenólicos de material vegetal. Sin embargo, con extractos de agua, no ocurre ningún problema de residuos tóxicos que se originen de disolventes grado reactivo como etanol, metanol, acetato de etilo o butanol, por lo que se puede decir que el uso de bebidas alcohólicas de consumo humano puede ser una alternativa confiable de disolvente.



**Cuadro 6a.** Actividad antioxidante por DPPH<sup>•</sup> (μmol ET/L) de las especias maceradas en disolventes.

Especia	DISOLVENTE					
	Agua	Mezcal	Tequila	Vodka	Ron	Etanol/agua
Chile Piquín	4167 <sup>fg/w</sup>	10250 <sup>efghi/yx</sup>	9250 <sup>hij/yxw</sup>	5540 <sup>kl/xw</sup>	13250 <sup>fg/zy</sup>	15917 <sup>h/z</sup>
Chile ancho	3618 <sup>fgh/x</sup>	8167 <sup>fghij/y</sup>	7417 <sup>ijkl/y</sup>	8000 <sup>jk/y</sup>	12000 <sup>gh/z</sup>	12940 <sup>hij/z</sup>
Chile pasilla	1958 <sup>ij/y</sup>	6083 <sup>ijk/z</sup>	9917 <sup>hij/z</sup>	1361 <sup>l/y</sup>	10167 <sup>ghij/z</sup>	8973 <sup>klmn/z</sup>
Chile de árbol	1271 <sup>j/w</sup>	8083 <sup>ghij/y</sup>	15528 <sup>fg/z</sup>	2417 <sup>l/xw</sup>	6333 <sup>jk/yx</sup>	6440 <sup>nop/yx</sup>
Chile guajillo	4570 <sup>f/z</sup>	6080 <sup>ijk/z</sup>	7280 <sup>kl/z</sup>	8360 <sup>jk/z</sup>	6880 <sup>ik/z</sup>	6780 <sup>nop/z</sup>
Chile habanero	1148 <sup>j/w</sup>	5160 <sup>jk/y</sup>	4960 <sup>lm/y</sup>	2960 <sup>l/x</sup>	7960 <sup>hijk/z</sup>	5060 <sup>p/y</sup>
Pimiento	1662 <sup>j/w</sup>	6460 <sup>ij/x</sup>	9860 <sup>hij/z</sup>	8060 <sup>jk/y</sup>	7760 <sup>ijk/y</sup>	6460 <sup>nop/x</sup>
Cúrcuma	1648 <sup>j/w</sup>	5460 <sup>jk/yx</sup>	4560 <sup>lm/x</sup>	4860 <sup>kl/x</sup>	6360 <sup>jk/y</sup>	9760 <sup>ijklm/z</sup>
Ajo	3358 <sup>gh/v</sup>	7431 <sup>hij/w</sup>	12508 <sup>gh/z</sup>	10969 <sup>ij/y</sup>	8892 <sup>hij/x</sup>	11662 <sup>ijk/zy</sup>
Canela	26994 <sup>a/v</sup>	50867 <sup>a/w</sup>	75681 <sup>a/x</sup>	86348 <sup>a/y</sup>	93311 <sup>a/z</sup>	88089 <sup>a/y</sup>
Pimienta negra	2838 <sup>hi/x</sup>	10482 <sup>efghi/z</sup>	11892 <sup>hi/z</sup>	12354 <sup>hij/z</sup>	8431 <sup>hijk/y</sup>	11046 <sup>ijkl/z</sup>
Jengibre	3800 <sup>fgh/w</sup>	16354 <sup>d/y</sup>	19508 <sup>e/z</sup>	13431 <sup>hi/x</sup>	20277 <sup>de/z</sup>	15097 <sup>h/yx</sup>



**Cuadro 6b.** Actividad antioxidante por DPPH• ( $\mu\text{mol ET/L}$ ) de las especias maceradas en disolventes.

Especia	Agua	Mezcal	Tequila	Vodka	Ron	Etanol/agua
Cilantro	8710 <sup>d/y</sup>	12662 <sup>def/z</sup>	8354 <sup>jk/y</sup>	12662 <sup>hij/z</sup>	10892 <sup>ghi/zy</sup>	13559 <sup>hi/z</sup>
Ruda	10611 <sup>c/x</sup>	7111 <sup>hij/x</sup>	8556 <sup>j/x</sup>	25667 <sup>f/z</sup>	17333 <sup>ef/y</sup>	19222 <sup>g/y</sup>
Cebolla	1444 <sup>j/y</sup>	1778 <sup>k/y</sup>	2333 <sup>m/y</sup>	4655 <sup>kl/z</sup>	4440 <sup>k/z</sup>	5667 <sup>op/z</sup>
Orégano	7407 <sup>e/x</sup>	16444 <sup>d/y</sup>	17852 <sup>ef/y</sup>	16000 <sup>gh/y</sup>	17222 <sup>ef/y</sup>	31444 <sup>d/z</sup>
Hierbas de olor	11426 <sup>c/x</sup>	8296 <sup>fghij/w</sup>	6667 <sup>ijkl/w</sup>	18889 <sup>g/y</sup>	20333 <sup>de/y</sup>	25556 <sup>ef/z</sup>
Albahaca	3627 <sup>fgh/v</sup>	26190 <sup>c/y</sup>	26571 <sup>d/y</sup>	30571 <sup>de/z</sup>	20381 <sup>de/w</sup>	23905 <sup>f/x</sup>
Clavo	27405 <sup>a/w</sup>	34762 <sup>b/x</sup>	40603 <sup>b/x</sup>	58000 <sup>b/y</sup>	92667 <sup>a/z</sup>	59968 <sup>b/y</sup>
Tomillo	3786 <sup>fgh/x</sup>	24476 <sup>c/y</sup>	31333 <sup>c/z</sup>	27524 <sup>ef/zy</sup>	31048 <sup>c/z</sup>	27333 <sup>e/zy</sup>
Romero	10944 <sup>c/wv</sup>	13175 <sup>de/w</sup>	9175 <sup>ij/v</sup>	35333 <sup>cd/z</sup>	23619 <sup>d/x</sup>	31714 <sup>d/y</sup>
Hojas de laurel	17924 <sup>b/v</sup>	12140 <sup>defg/u</sup>	19790 <sup>e/w</sup>	35505 <sup>c/x</sup>	38743 <sup>b/y</sup>	41886 <sup>c/z</sup>
Epazote	1210 <sup>j/x</sup>	6171 <sup>ijk/zy</sup>	5219 <sup>klm/y</sup>	9314 <sup>ijk/z</sup>	8362 <sup>hijk/zy</sup>	8362 <sup>lmno/zy</sup>
Comino	3114 <sup>gh/v</sup>	11505 <sup>efgh/z</sup>	7600 <sup>kl/x</sup>	9219 <sup>ijk/y</sup>	8267 <sup>hijk/yx</sup>	5695 <sup>op/w</sup>

Medias con superíndice distinto (a – p) denotan diferencia significativa entre las especias (por columna) (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

Medias con superíndice distinto (z – u) denotan diferencia significativa entre las especias (por fila) (Tukey,  $p \leq 0.05$ )



A partir de la canela macerada en ron se realizaron mezclas de dos especias (binas) con las 23 especias restantes del grupo, ya que además de las propiedades antioxidantes de cada especia individual, se ha confirmado que existen efectos sinérgicos en las combinaciones especia-especia y especia-antioxidante (BHT, BHA, BHQT, entre otros) (Marinova *et al.*, 2008; Hirasa y Takemasa, 2002; Watanabe y Ayano, 1974). Los resultados de actividad antioxidante (DPPH•) de las 23 binas se muestran en el cuadro 7 (a y b). Las tres binas que presentaron la mayor actividad antioxidante fueron: canela-clavo (98, 632  $\mu\text{mol ET/L}$ ), canela-hierbas de olor (89, 368  $\mu\text{mol ET/L}$ ) y canela-orégano (86,842  $\mu\text{mol ET/L}$ ).

Con respecto al contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de las binas canela-clavo, canela-hierbas de olor y canela-orégano, éstos se muestran en la figura 8, en las figuras 9, 10 y 11 la actividad antioxidante por los métodos ABTS•+, FRAP y ORAC, respectivamente, mientras que en la figura 12 la actividad quelante.

Las tres binas presentaron una muy alta correlación ( $r > 0.9$ ) ( $p \leq 0.05$ ) entre CFT y actividad antioxidante por DPPH•, ABTS•+, FRAP y ORAC, así como una buena correlación ( $r > 0.7$ ) entre CFT y actividad quelante (anexo 2). Por lo tanto, se puede decir que la actividad antioxidante y la actividad quelante de las tres binas están en función de la concentración de compuestos fenólicos totales que presenten.

Los resultados obtenidos mostraron que la bina canela-clavo fue la que presentó el mayor contenido de CFT (7538 mg EAG/L), actividad quelante (0.00028 mol EDTA/L) y la más alta capacidad antioxidante por el método ABTS•+ (1243 mg VCEAC/mL), FRAP (150 mg ácido ascórbico/mL) y ORAC (55400  $\mu\text{mol ET/L}$ ), confirmando con ello su alta actividad antirradical obtenida por el método 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH•). Cabe mencionar que fue la canela y el clavo las especias que de manera individual mostraron la más alta actividad antioxidante por el método DPPH• dentro del grupo de las 24 especias maceradas en ron.





**Cuadro 7a.** Actividad antioxidante por DPPH• ( $\mu\text{mol ET/L}$ ) de las mezclas de dos especias (bina) maceradas en ron.

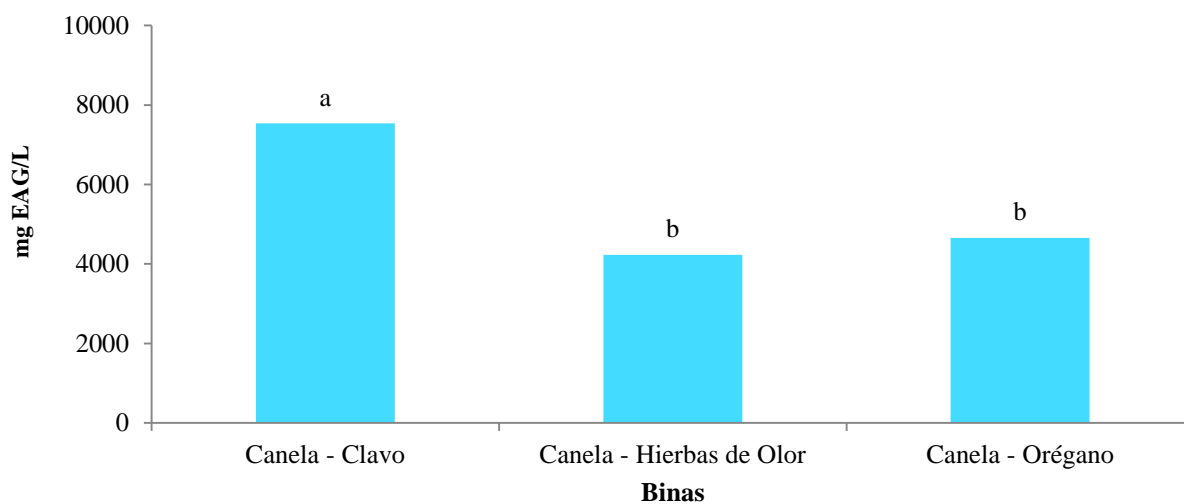
<b>Bina o mezcla de especias</b>	<b>Disolvente (Ron)</b>
Canela - Chile piquín	73965 <sup>def</sup>
Canela - Chile ancho	71053 <sup>def</sup>
Canela - Chile pasilla	77895 <sup>bcdef</sup>
Canela - Chile de árbol	69263 <sup>ef</sup>
Canela - Chile guajillo	74105 <sup>cdef</sup>
Canela - Chile habanero	72140 <sup>def</sup>
Canela - Pimiento	82632 <sup>bcd</sup>
Canela - Cúrcuma	82316 <sup>bcd</sup>
Canela - Ajo	71789 <sup>def</sup>
Canela - Pimienta negra	70596 <sup>def</sup>
Canela - Jengibre	52737 <sup>g</sup>
Canela - Cilantro	77053 <sup>bcdef</sup>
Canela - Ruda	77579 <sup>bcdef</sup>



**Cuadro 7b.** Actividad antioxidante por DPPH<sup>•</sup> ( $\mu\text{mol ET/L}$ ) de las mezclas de dos especias (binas) maceradas en ron.

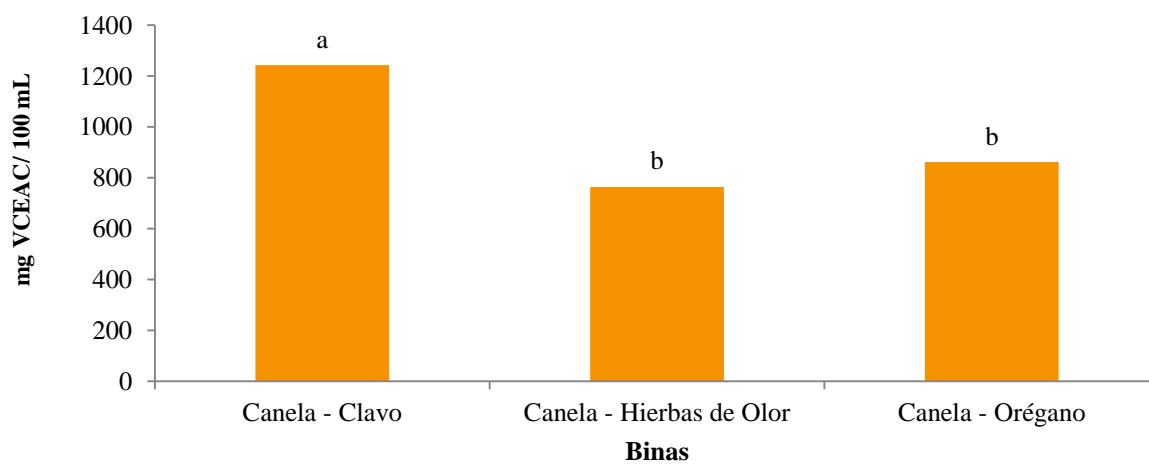
<b>Bina o mezcla de especias</b>	<b>Disolvente (Ron)</b>
Canela - Cebolla	70632 <sup>def</sup>
Canela - Orégano	86842 <sup>abc</sup>
Canela - Hierbas de olor	89368 <sup>ab</sup>
Canela - Albahaca	81684 <sup>bcd</sup>
Canela - Clavo	98632 <sup>a</sup>
Canela - Tomillo	78211 <sup>bcdef</sup>
Canela - Romero	77579 <sup>bcdef</sup>
Canela - Hojas de laurel	76211 <sup>cdef</sup>
Canela - Epazote	67684 <sup>f</sup>
Canela - Comino	82421 <sup>bcd</sup>

Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre las binas (Tukey,  $p \leq 0.05$ )



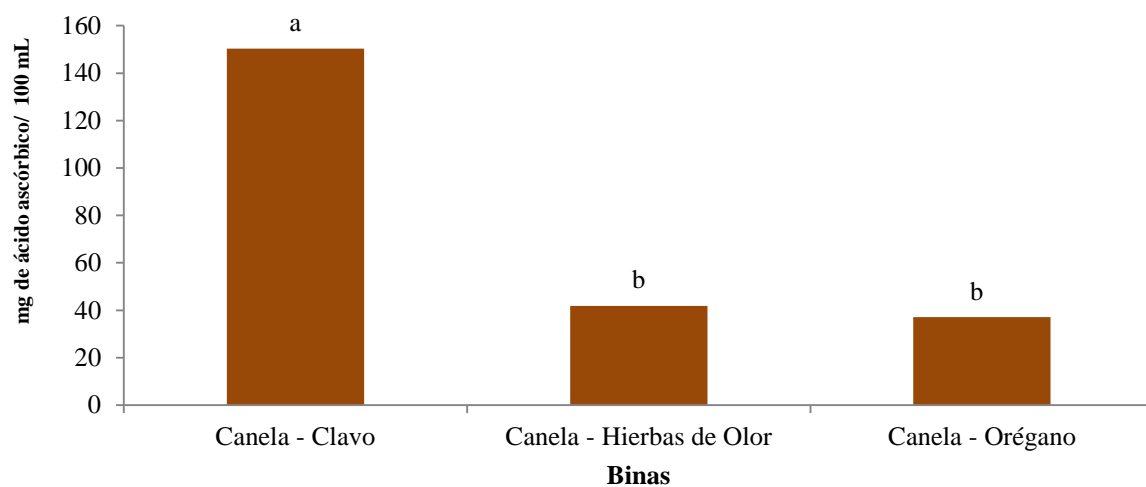
**Figura 8.** Contenido de compuestos fenólicos totales de tres binas.

Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre las binas (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

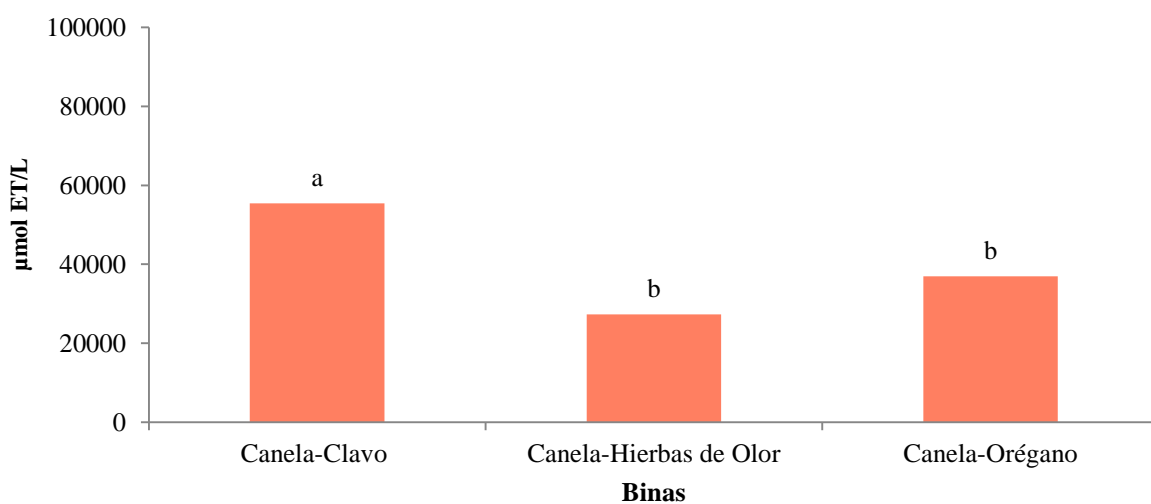


**Figura 9.** Actividad antioxidante por el método ABTS●+, de tres binas.

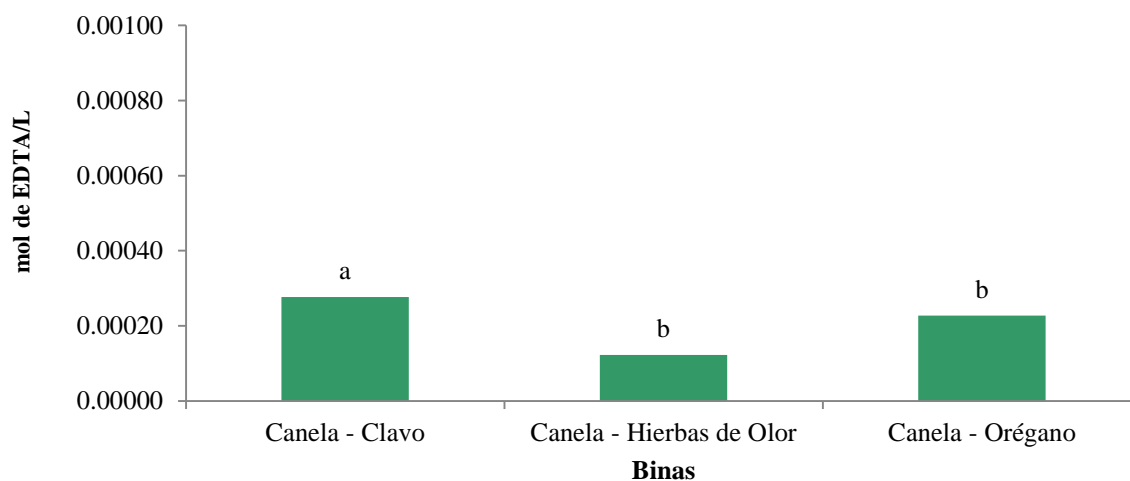
Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre las binas (Tukey,  $p \leq 0.05$ )



**Figura 10.** Actividad antioxidante por el método FRAP de tres binas. Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre las binas (Tukey,  $p \leq 0.05$ )



**Figura 11.** Actividad antioxidante por el método ORAC de tres binas. Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre las binas (Tukey,  $p \leq 0.05$ )



**Figura 12.** Actividad quelante de tres binas.

Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre las binas (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

Es importante mencionar que el etanol pudo favorecer la extracción de compuestos bioactivos. Ghiselli *et al.* (2000) señala que el etanol aumenta la absorción de los compuestos fenólicos, por lo que la capacidad antioxidante no se debe solo a los CFT, sino más bien debido a un efecto sinérgico entre ambos. Diversas investigaciones han reportado el uso de algún tipo de alcohol para la extracciones de CFT a partir de materiales vegetales (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011b; Xu *et al.*, 2010; Askun *et al.*, 2009; Touns *et al.*, 2009; Parekh *et al.*, 2005; Nuutila *et al.*, 2003; Bendini *et al.*, 2002; Jun *et al.*, 2001).

Por otra lado, los principales compuestos fenólicos presentes en la canela son catequina, epicatequina, eugenol, ácido siríngico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico y ácido cúmarico (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2014; Lv *et al.*, 2012; Brewer, 2011; Muchuweti *et al.*, 2007), mientras que los principales compuestos presentes en el clavo son eugenol, timol, carvacrol y cinamaldehído (Chaieb *et al.*, 2007; Jirovetz *et al.*, 2006), pudiéndose haber presentado una buena sinergia entre el tipo y concentración de los compuestos fenólicos presentes en las especias que conformaron la bina. Diversos reportes, tal como el de Brewer (2011), Gobert *et al.* (2010), Yeum *et al.* (2009), Iacopini *et al.* (2008) y Marinova *et al.* (2008), han señalado efectos sinérgicos de los compuestos fenólicos.

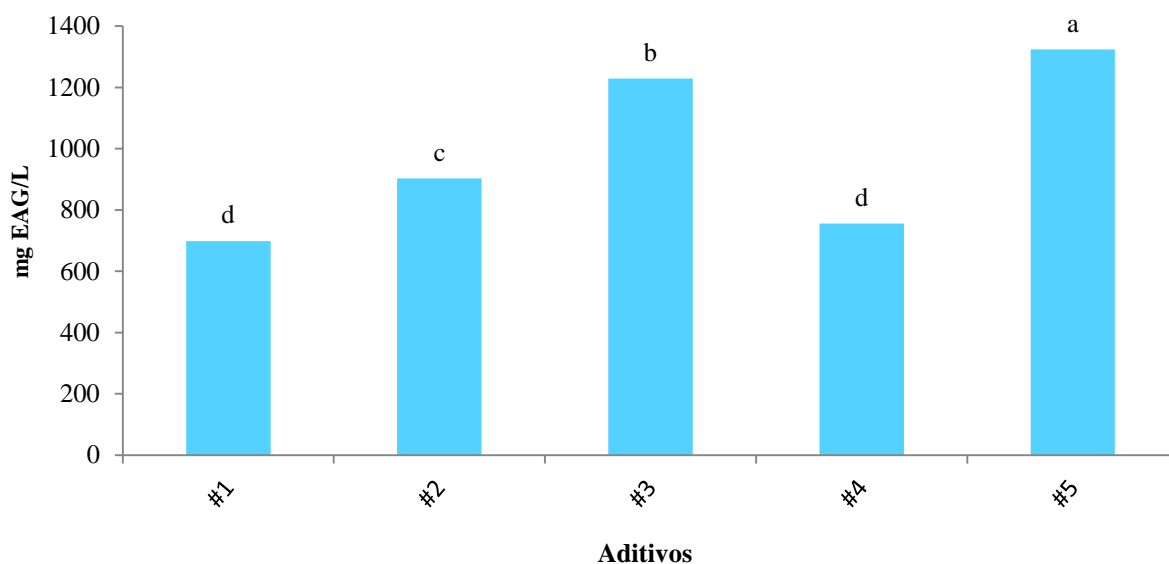


### **8.1.2. Contenido de compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante, azúcares reductores totales, pH y $a_w$ de los cinco aditivos elaborados**

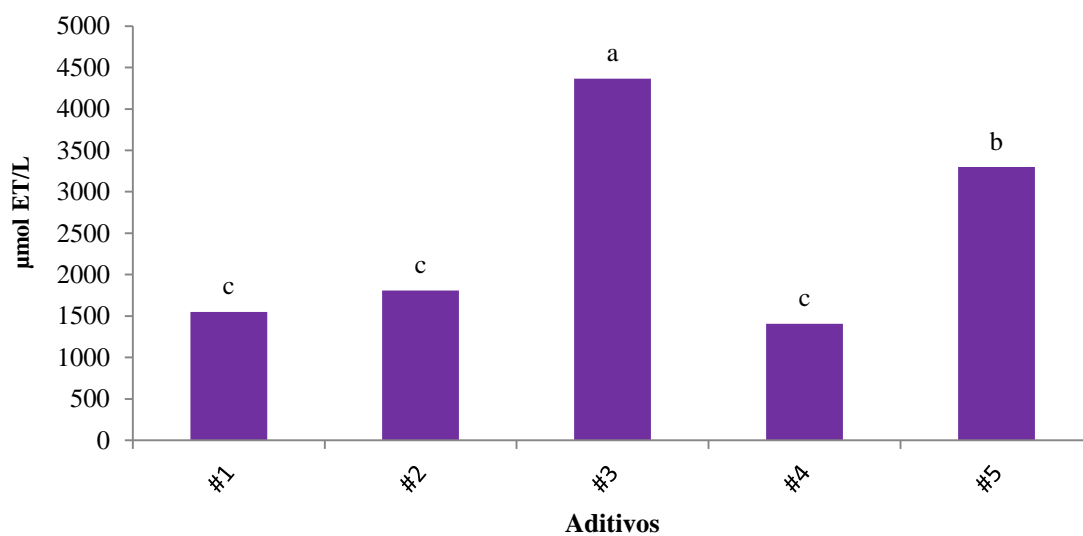
Los cinco aditivos (cuadros 2 y 3) tuvieron como ingrediente base la bina canela-clavo, posteriormente se añadieron otras especias culinarias, además de cálices de jamaica verde, jugo de limón y sal para la elaboración de cada uno de ellos con la finalidad de impartirle un mejor sabor y olor a la bina, ya que por sí sola, la bina impartió un sabor y olor muy intenso y poco agradable al alimento en que se aplicó (papas fritas y carne de cerdo).

Los aditivos empleados en esta investigación se elaboraron con especias culinarias reportadas por su alta actividad antioxidante (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2014; Brewer, 2011; Hinneburg *et al.*, 2006; Hirasa y Takemasa, 2002) y por su capacidad para inhibir la formación de acrilamida en papas fritas (Morales, *et al.*, 2014; Jiménez-Castillo *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2011; Ciesarová *et al.*, 2008), la oxidación de lípidos y proteínas en productos cárnicos (Ganhão *et al.*, 2010 a, b; Heinonen, 2007; Sánchez-Escalante *et al.*, 2003), así como el crecimiento de microorganismos patógenos, tal como *Escherichia coli* (Sulaiman *et al.*, 2014; Hirasa y Takemasa, 2002).

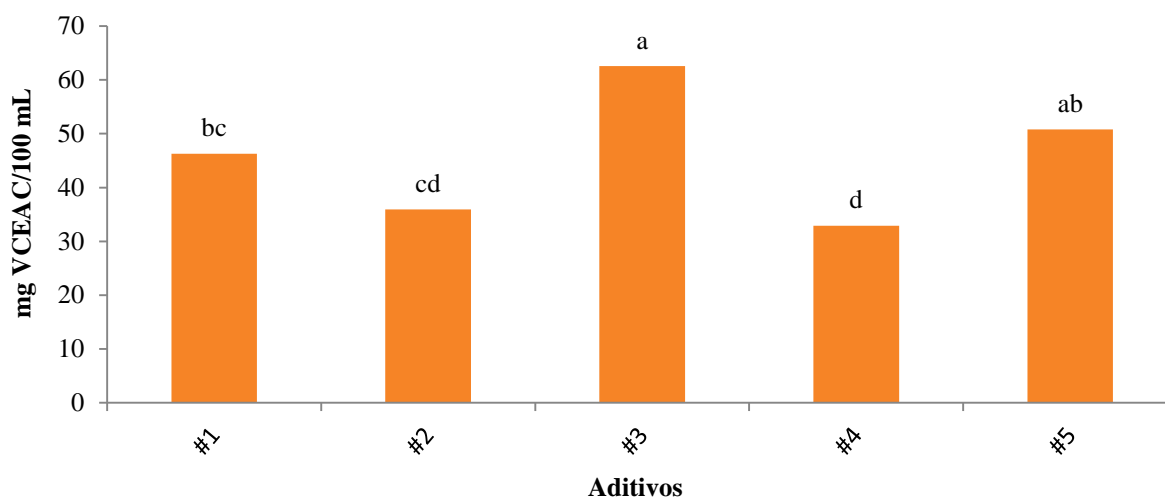
Los resultados sobre el contenido de CFT y actividad antioxidante por los métodos DPPH•, ABTS•+, FRAP y ORAC, así como actividad quelante de los aditivos elaborados, se presentan en las figuras 13, 14, 15, 16, 17 y 18 respectivamente; el contenido de azúcares reductores totales se muestra en la figura 19, mientras que los valores de pH y  $a_w$  se muestran en el cuadro 8.



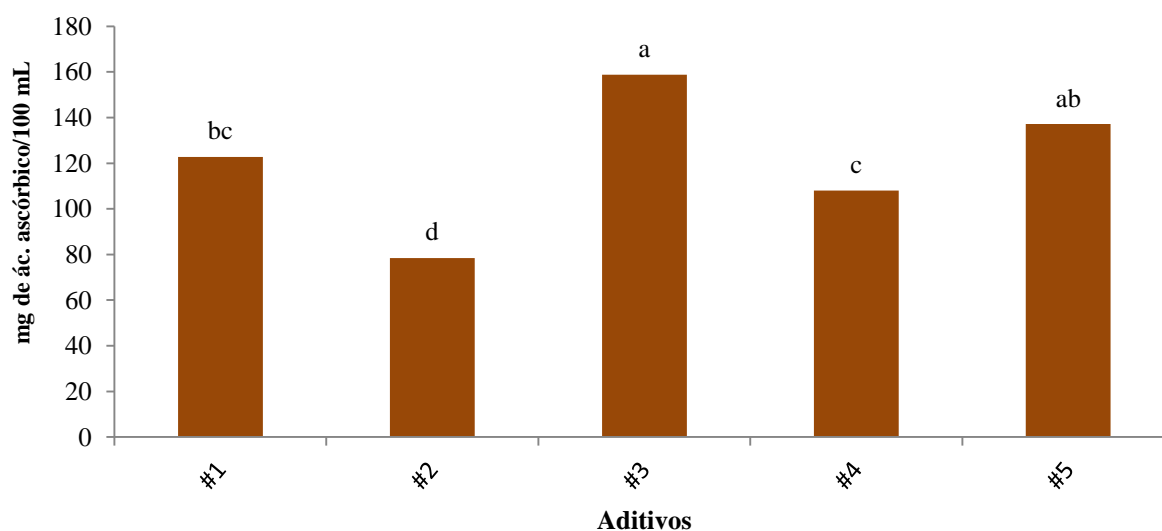
**Figura 13.** Contenido de compuestos fenólicos totales de cinco aditivos. Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre los aditivos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )



**Figura 14.** Actividad antioxidante por el método DPPH<sup>•</sup> de cinco aditivos. Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre los aditivos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

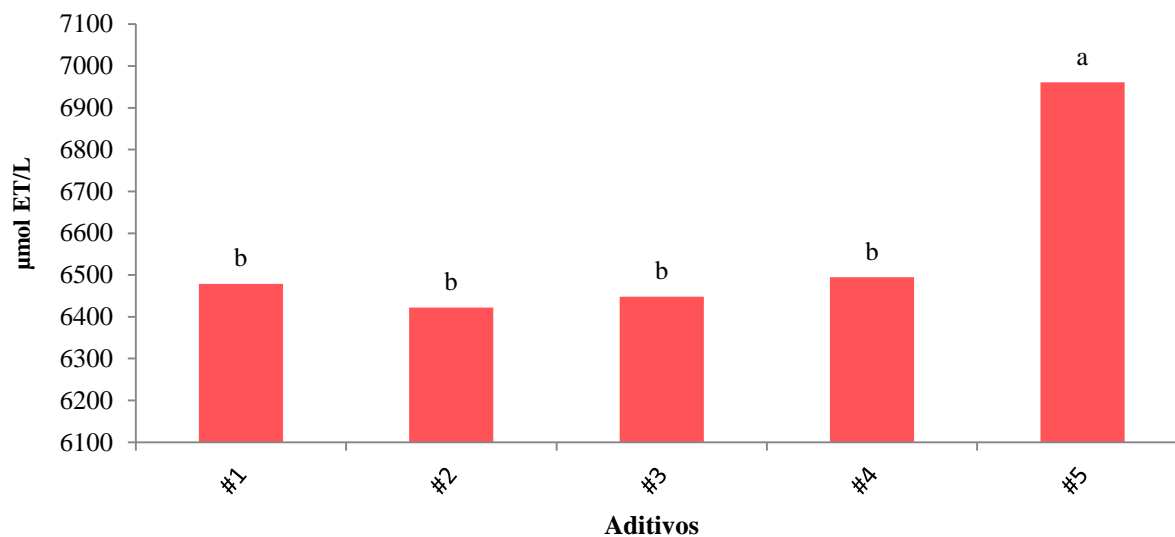


**Figura 15.** Actividad antioxidante por el método ABTS●+ de cinco aditivos. Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre los aditivos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

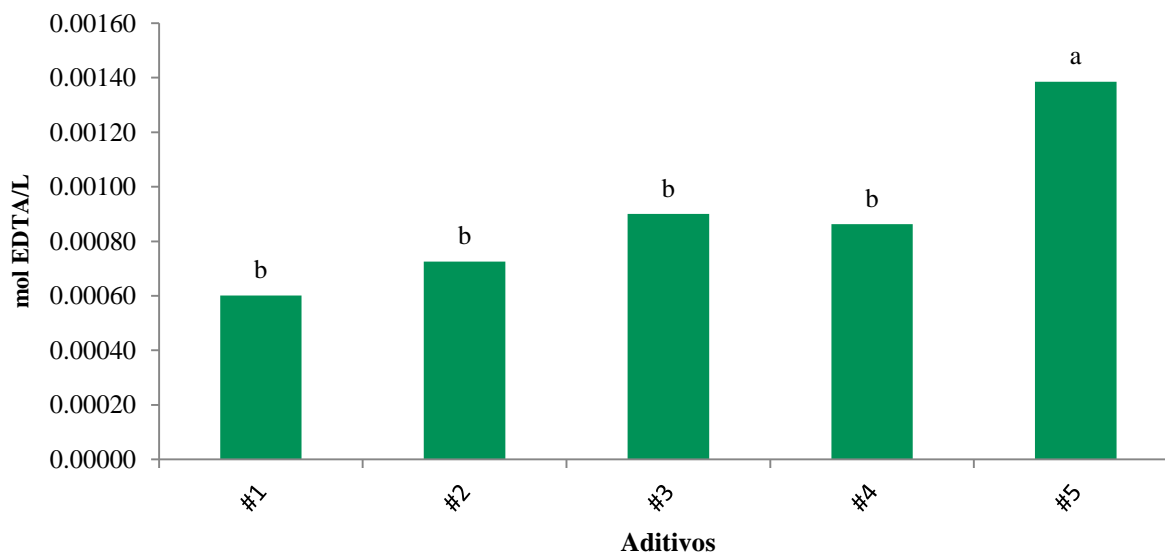


**Figura 16.** Actividad antioxidante por el método FRAP de cinco aditivos. Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre los aditivos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

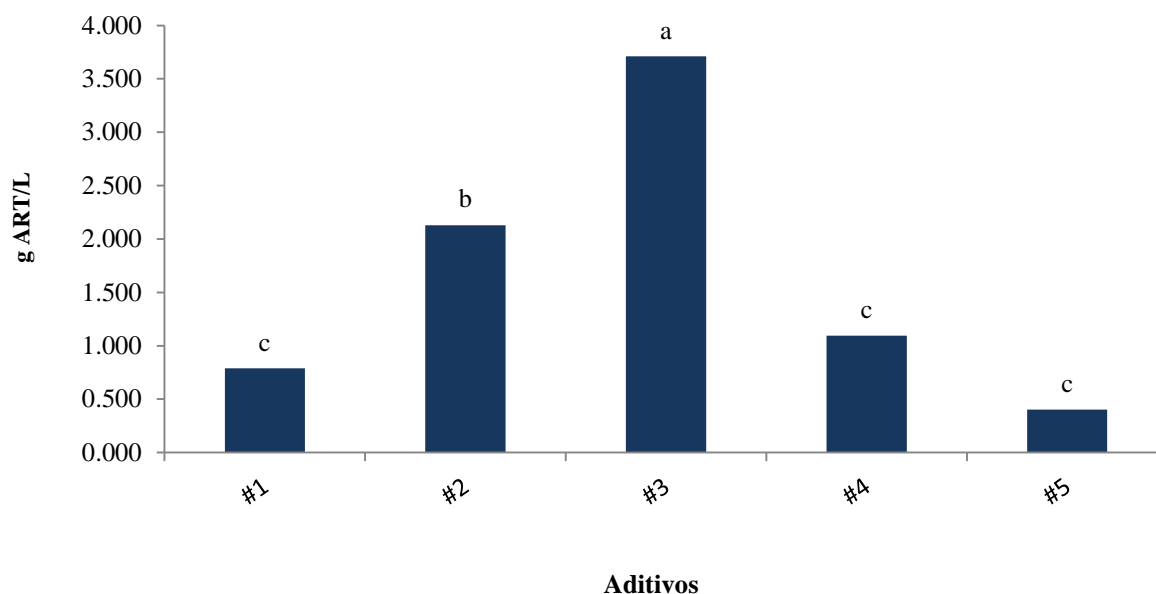




**Figura 17.** Actividad antioxidante por el método ORAC de cinco aditivos. Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre las medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ )



**Figura 18.** Actividad quelante de cinco aditivos. Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre los aditivos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )



**Figura 19.** Contenido de azúcares reductores totales de cinco aditivos. Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre los aditivos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

**Cuadro 8.** Potencial de hidrógeno (pH) y actividad de agua ( $a_w$ ) de cinco aditivos.

Aditivo	pH	$a_w$
#1	2.64 <sup>c</sup>	0.9870 <sup>b</sup>
#2	2.83 <sup>b</sup>	0.9961 <sup>a</sup>
#3	2.90 <sup>a</sup>	0.9950 <sup>a</sup>
#4	2.59 <sup>c</sup>	0.9936 <sup>a</sup>
#5	2.05 <sup>d</sup>	0.9845 <sup>b</sup>

Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre los aditivos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

Los cinco aditivos elaborados presentaron contenido de CFT y actividad antioxidante por el método DPPH•-ABTS•+, FRAP y ORAC, así como actividad quelante, siendo los aditivos #3 y #5 los que presentaron el mayor contenido de compuestos fenólicos y la mayor actividad antioxidante y quelante. Esto se puede deber principalmente a los ingredientes que diferencian a estos aditivos del resto de los demás, como lo son las hojas de laurel en el aditivo #3 y los



cálices de jamaica verde en el aditivo #5. Dichos ingredientes pudieron ejercer un mayor efecto sinérgico con el resto de las especias, potencializando su actividad antioxidante. Hasta el momento no se ha reportado el uso de cálices de jamaica verde para inhibición de glicotoxinas, ni de oxidación de lípidos y proteínas pero su actividad antioxidante ya ha sido reportada por Medina-Carrillo *et al.* (2015) y Juliani *et al.* (2009). Los aditivos también incluyen como parte de sus ingredientes jugo de limón y/o sal, los cuales no están clasificados como una especia culinaria, sin embargo, son sazoadores de uso constante en la preparación de los alimentos y están siendo utilizados para la reducción de glicotoxinas (Vangnai *et al.*, 2014; Medeiros-Vinci *et al.*, 2011; Pedreschi *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2008; Gibis, 2007; Salmon *et al.*, 1997).

Los aditivos elaborados presentaron una alta correlación  $r > 0.8$  ( $p \leq 0.05$ ) (anexo 2) entre CFT y actividad antioxidante por DPPH<sup>•</sup>, mientras que una correlación  $r < 0.8$  y  $> 0.5$  ( $p \leq 0.05$ ) entre CFT con ABTS<sup>•+</sup>, FRAP, ORAC y actividad quelante (anexo 2), por lo que se puede decir de acuerdo a este análisis que la actividad antioxidante de los aditivos está en función de los compuestos fenólicos totales.

Por otra parte, los cinco aditivos presentaron concentración de azúcares reductores totales (ART), los cuales forman parte de los reactantes durante la formación de acrilamida. El aditivo #3 mostró la mayor concentración de ART. En el anexo 3 se muestra una figura sobre la determinación de ART de cada uno de los ingredientes que integran los aditivos. En dicha figura se puede observar que todos los ingredientes presentes en los aditivos presentan azúcares reductores totales. La literatura reporta la presencia de diversos azúcares reductores en las especias, por ejemplo Hirasu y Takemasa (2002) reportaron glucosa y fructosa en cebolla, ajo, clavo y orégano; así como ramnosa, xilosa y galactosa en clavo; manosa, arabinosa, xilosa y ramnosa en orégano. Morales *et al.* (2014) determinaron el contenido de azúcares reductores de tres extractos acuosos, encontrando un valor de 0.4 g/100 g de peso seco para orégano y 0.6 g para canela, mientras que Janoszka (2010a) reportó una concentración de glucosa de 22.5 mg/g de cebolla y 0.34 mg/g de ajo.



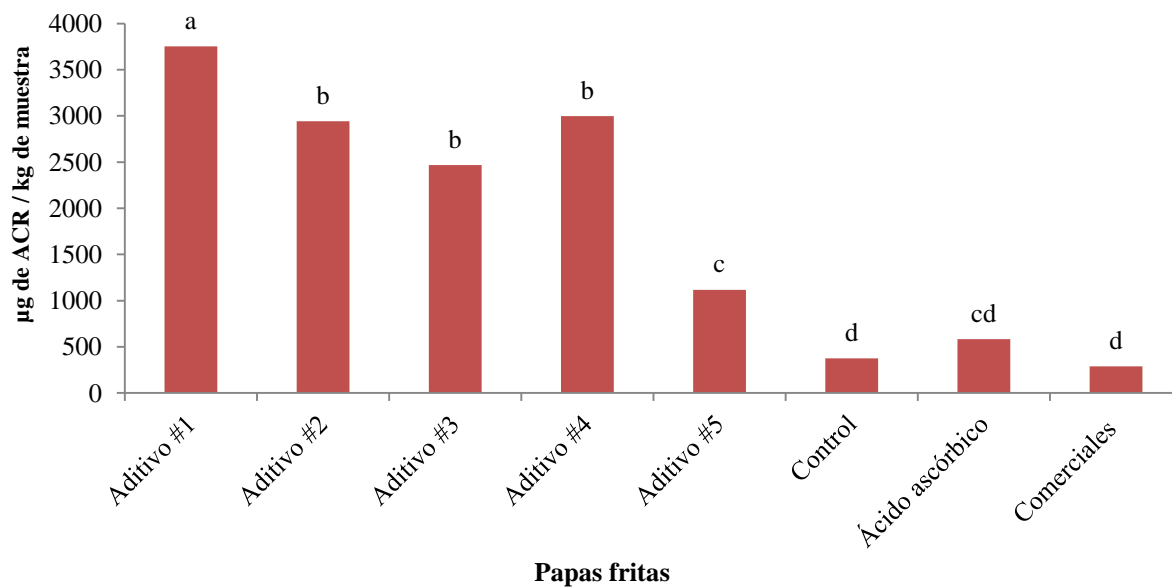
Con respecto a la medición de pH y actividad de agua ( $a_w$ ), los cinco aditivos presentaron un pH ácido  $< 3$  y una  $a_w > 0.9$ . Dichos valores se encuentran dentro de los rangos que favorecen la inhibición de la reacción de *Maillard* según lo reportado por la literatura (Ruiz-Roca, 2009; Badui-Dergal y Valdés-Martínez, 2006; Buera *et al.*, 1987; Labuza y Schmid, 1986; Lea y Hannan, 1949).

Como análisis extra se determinó la actividad antioxidante por el método DPPH<sup>•</sup> y el contenido de compuestos fenólicos totales de los cinco aditivos con la bina base y sin la bina base (anexo 4), con el objetivo de observar como la bina base (canela-clavo) potencializa tanto el contenido de CFT como actividad antioxidante de los aditivos.

## 8.2. Fase 2 del experimento: Aplicación de los aditivos en papas a freír

### 8.2.1. Contenido de acrilamida

Los resultados sobre la determinación de acrilamida en papas fritas tipo “a la francesa” se muestran en la figura 20.



**Figura 20.** Contenido de acrilamida en papas fritas.

Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )



Los resultados sobre el contenido de CFT y la actividad antioxidante (figuras 13 a 18) señalan que los cinco aditivos presentaron contenido de compuestos fenólicos y actividad quelante y antioxidante, así como un  $\text{pH} < 3$  y una  $a_w > 0.9$ , condiciones favorables para inhibir la formación de acrilamida, destacando los aditivos #3 y #5 por presentar los mejores resultados en la mayoría de las pruebas.

Los aditivos mostraron una correlación negativa significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre CFT, DPPH•, ORAC y contenido de acrilamida de  $r = -0.859$ ,  $r = -0.610$  y  $-0.803$  respectivamente. Es decir, a mayor contenido de fenoles y actividad antioxidante menor contenido de acrilamida. De los cinco aditivos elaborados, el aditivo #5 fue el que presentó los mejores resultados de reducción de acrilamida. Sin embargo, ni el aditivo #5, ni el resto de los aditivos elaborados lograron inhibir de manera significativa la formación de acrilamida con respecto a las papas control, papas con ácido ascórbico y papas comerciales, provocando en las papas fritas un efecto contrario, es decir promovieron la formación de esta glicotoxina. Las papas con el aditivo #1 fueron las que presentaron la mayor concentración de acrilamida (3752  $\mu\text{g}/\text{kg}$  muestra), superando seis veces más el valor indicativo máximo sugerido por la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) de 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de papas fritas (EFSA, 2012).

Respecto a las papas con ácido ascórbico, estas no presentaron una reducción significativa de acrilamida (584  $\mu\text{g}/\text{kg}$  muestra), como se esperaba, en comparación con las papas control (377  $\mu\text{g}/\text{kg}$  muestra) y papas comerciales (289  $\mu\text{g}/\text{kg}$  muestra). Las investigaciones de Hamzalioglu *et al.* (2013) y Hamzalioglu y Gökmen (2012) reportan que los antioxidantes con grupos carbonilo, tales como el ácido ascórbico y ácido dihidroascórbico, pueden reaccionar directamente con asparagina para formar acrilamida, al actuar como donantes de grupos carbonilo (Constantinou y Koutsidis, 2016). Así mismo, las condiciones de freído (temperatura y tiempo) y la concentración de ácido ascórbico (5g) utilizadas en esta investigación, pudieron no favorecer el efecto inhibitor del ácido ascórbico sobre la acrilamida.



Referente a las papas comerciales, éstas no presentaron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con las papas control, ni con las papas con ácido ascórbico, mientras que la diferencia presentada con respecto a las papas con aditivo se puede deber a que comúnmente en la industria de alimentos se emplean aditivos sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroquinona terciaria (BHQT), para evitar reacciones de oxidación e impedir el enranciamiento y decoloración del alimento, así como para inhibir la formación de acrilamida (Ou *et al.*, 2010). Sin embargo, existen reportes científicos que han demostrado que estos antioxidantes sintéticos poseen efectos citotóxicos (Karre *et al.*, 2013; Musa y Arslan, 2011) por lo que su uso no es recomendable.

El incremento de acrilamida en las papas con aditivo se puede deber a diversos factores, como lo es el contenido de azúcares reductores totales (grupos carbonilo), los cuales forman parte de los reactantes activos para el desarrollo de la reacción de *Maillard* y son los principales determinantes de la formación de acrilamida en papas fritas (Sanny *et al.*, 2012). En el presente estudio los cinco aditivos elaborados presentaron ART (figura 19), cuyos valores fueron de 0.788, 2.130, 3.712, 1.095 y 0.403 g ART/L, para el aditivo #1, #2, #3, #4 y #5, respectivamente. Sin embargo, no se presentó una correlación significativa entre la concentración de ART y el contenido de ACR ( $r = 0.090$ ;  $p = 0.750$ ), lo cual puede indicar que el contenido de acrilamida para esta investigación no está en función de la concentración de los ART de los aditivos.

Los altos niveles de acrilamida en las papas con aditivo también puede estar relacionado con la degradación de los compuestos fenólicos cuando estos son sometidos a altas temperaturas, es decir el tratamiento térmico reduce su capacidad de atrapamiento de compuestos reactivos intermedios de la reacción de *Maillard* que inducen la formación de acrilamida; el grado de sensibilidad varía entre los distintos compuestos fenólicos (Jin *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2011). Es probable que algunos de los compuestos fenólicos presentes en los cinco aditivos empleados en esta investigación pudieron presentar una baja estabilidad térmica, degradándose cuando fueron sometidos a la temperatura de freído de las papas (180 °C), reduciendo así su capacidad antioxidante.



La estructura de los polifenoles es otro de los factores que pueden estar involucrados en un mayor contenido de acrilamida en las papas con aditivo. Visioli (2012) reportó que los polifenoles que contienen grupos *o*-difenoles y/o grupos carbonilo di-insaturados están involucrados tanto en la formación y eliminación de acrilamida. Mientras Kotsiou *et al.* (2011) y Zheng *et al.* (2009) señalan que los compuestos fenólicos que contienen un grupo aldehído (grupo funcional que contiene un grupo carbonilo) en su estructura, favorecen el contenido de acrilamida.

Por otra parte, Bassama *et al.* (2010) señalan que la capacidad antioxidante de los polifenoles depende del número y posición de sus sustituyentes hidroxilo y que su efecto se debe a que el átomo de hidrogeno del grupo hidroxilo del polifenol es capaz de combinarse con grupos radicales libres, neutralizándolos e inhibiendo las reacciones en cadena. A mayor número de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos mayor actividad antioxidante. Es probable que algunos de los compuestos fenólicos presentes en los cinco aditivos empleados en esta investigación pudieron presentar grupos *o*-difenoles, carbonilos di-insaturados, aldehídos o un bajo número de sustituyentes hidroxilo, promoviendo así la formación de acrilamida.

Cabe señalar que en años recientes, el uso de compuestos polifenólicos ha provocado efectos discordantes, pues no solo han demostrado ser eficaces para la reducción de acrilamida sino que también han estado involucrados en estimular la formación de esta glicotoxina (Liu *et al.*, 2015; Budryn *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2012).

Algunas investigaciones que han reportado efectos discordantes en el contenido de acrilamida mediante el uso de compuestos polifenólicos son:

Oral *et al.* (2014) utilizaron dos compuestos fenólicos puros (ácido cúmarico y hesperetina) en un sistema modelo de asparagina/glucosa, el cual fue sometido a calentamiento a 180 °C por 15 min, observaron que con el uso de ácido cúmarico se logró una reducción de acrilamida del 53%, mientras que con hesperetina provocó un aumento del 9%.



Budryn *et al.* (2013) realizaron extracciones de hojas de té verde y granos de café verde y los aplicaron a 100 g de masa para rosquillas o donas, utilizando tres distintas concentraciones 0.25, 0.5 y 1 g de extracto. Ellos encontraron que la adición de 0.25 g de extracto de hojas de té verde y la adición de 1 g de extracto de granos de café verde favorecieron la formación de acrilamida, mientras que las concentraciones restantes de extractos tanto de hojas de té como granos de café verde causaron una disminución en el contenido de acrilamida.

Kotsiou *et al.* (2010) emplearon dos concentraciones (2.2 y 216.9 mg) de extractos de aceite de oliva virgen en un sistema modelo de asparagina/glucosa. La adición de 2.2 mg de extracto provocó una inhibición de la acrilamida, mientras que una concentración de 216.9 mg favoreció la formación de acrilamida.

Cheng *et al.* (2010) señalaron que las proantocianidinas de manzana fueron eficientes para reducir acrilamida en papas fritas a una concentración de 0.50%. Sin embargo, cuando se utilizaron concentraciones de 0.25% y 1% hubo un incremento en la formación de la misma.

Por otra parte, las investigaciones que reportan solamente incrementos de acrilamida son:

Hamzalioglu *et al.* (2013) quienes reportaron que la adición de curcumina favoreció la formación de acrilamida en un sistema modelo asparagina/fructosa.

Vattem y Shetty (2003) reportaron que los antioxidantes fenólicos del orégano en rodajas de papas estimularon la formación de acrilamida, al igual que el extracto fenólico de las hojas de bambú. Al respecto Zhang *et al.* (2007) y Zhang *et al.* (2006) han señalado que su efecto inhibidor o promotor sobre la formación de acrilamida, es dependiente de la concentración utilizada de este extracto.

Constantinou y Koutsidis (2016), así como Cai *et al.* (2014) reportaron que la adición de ácido ferúlico a un sistema modelo asparagina/glioxal y la adición de ácido clorogénico en un





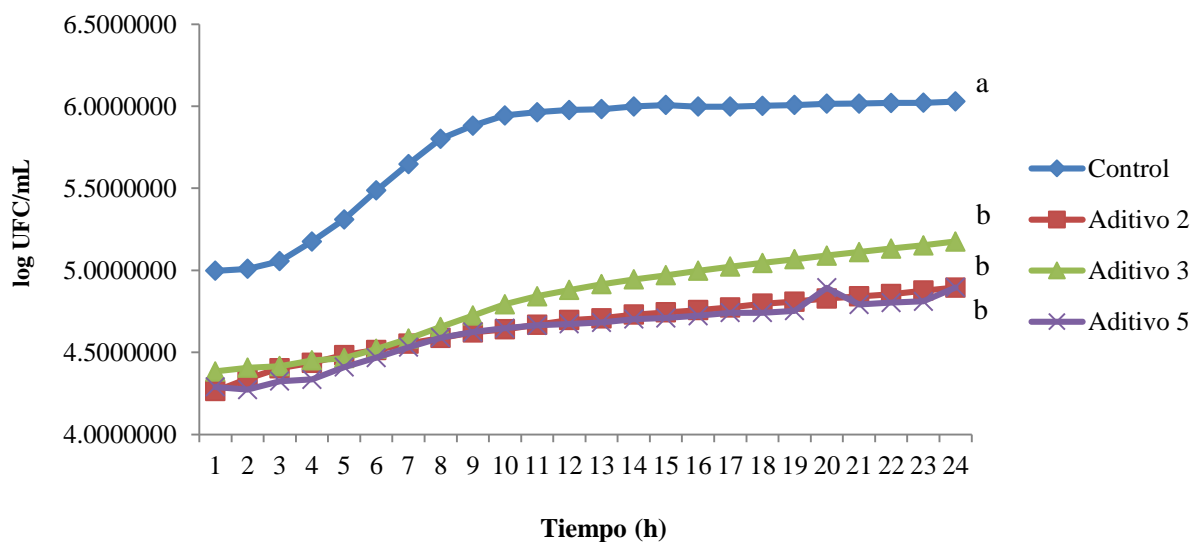
sistema modelo asparagina/glucosa, respectivamente, mostró un efecto promotor sobre la formación de acrilamida.

Hasta el momento, los resultados sobre la promoción en la formación de acrilamida mediante compuestos fenólicos son polémicos, puesto que ello depende de diversos factores, principalmente de la estructura, concentración y capacidad antioxidante de los polifenoles (Liu *et al.*, 2015).

### **8.3. Fase 3 del experimento: Aplicación de los aditivos en carne de cerdo**

#### **8.3.1. Actividad antimicrobiana de los aditivos *in vitro***

Conforme a los resultados obtenidos en la figura 21, los aditivos #2, #3 y #5 mostraron un efecto bacteriostático *in vitro*. Los tres aditivos analizados redujeron la velocidad de crecimiento bacteriano en comparación con la muestra control; el aditivo #5 redujo la velocidad de crecimiento microbiano en un 41.20 %, mientras que el aditivo #2 y #3 en un 38.85% y 23.38% respectivamente. Es decir, con la aplicación de los aditivos, el tiempo exponencial o de duplicación bacteriana disminuyó, siendo de 12 h aproximadamente para los aditivos #5 y #2, para el aditivo #3 de 9 h, mientras que para la muestra control fue de 7 h; lo cual podría indicar que el aditivo #5 muestra un mejor efecto. Sin embargo, entre los resultados de los tres aditivos no se presentó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), lo que significa que los tres aditivos tienen el mismo efecto bacteriostático sobre *Escherichia coli* O157:H7.



**Figura 21.** Concentración de *E. coli* en CST durante 24 h a 37 °C.

Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

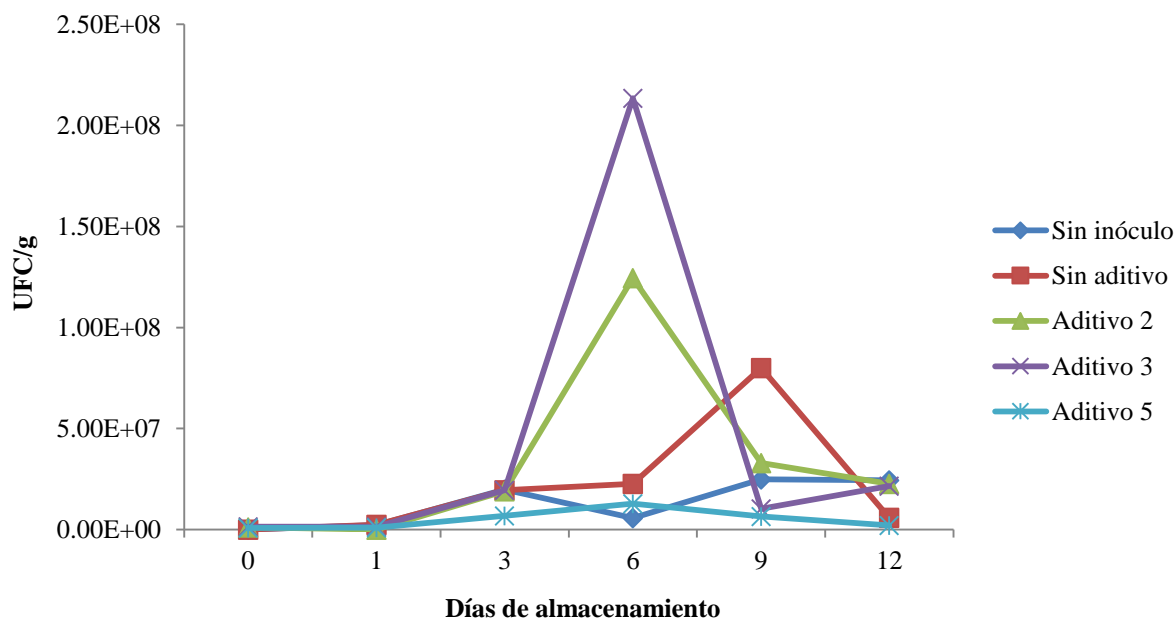
La actividad bacteriostática de los tres aditivos estudiados frente a *Escherichia coli* O157:H7 se puede deber a los fitoquímicos activos presentes en las especias que los integran, tales como ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides, los cuales han sido reportados que poseen actividad antimicrobiana (Gharibi *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2007). Entre los compuestos que destacan por poseer una notable actividad antimicrobiana está el ácido p-cumárico (Kchaou *et al.*, 2016), ácido rosmarínico (Moreno *et al.*, 2006) y carvacrol (Bothelho *et al.*, 2008). La actividad antimicrobiana de los compuestos polifenólicos podría atribuirse a su interacción con la membrana celular de los microorganismos. Estos compuestos podrían inhibir las actividades de proteasas y proteínas transportadoras, que podrían afectar a las funciones bacterianas (Kchaou *et al.*, 2016; Reygaert, 2014).

Por otra parte, Hirasa y Takemasa (2002) afirman que los compuestos polifenólicos con un grupo hidroxilo (-OH) o un grupo aldehído (-CHO) tienden a poseer una fuerte actividad antimicrobiana. El grupo hidroxilo puede formar enlaces de hidrógeno con el sitio activo de una enzima, ocasionando su desactivación. Mientras que la inhibición del crecimiento por el grupo aldehído se considera que puede ser en parte debida a sus reacciones con los grupos sulfhidrilo necesario para el crecimiento microbiano (Farag *et al.*, 1989).



### 8.3.2. Actividad antimicrobiana de los aditivos *in vivo* aplicados en hamburguesas de carne de cerdo cruda

Como se puede observar en la figura 22, de los tres aditivos analizados, solo el aditivo #5 muestra una actividad bacteriostática estable a lo largo de los 12 días de almacenamiento y no muestra diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con la muestra sin inóculo (cuadro 9), mostrando con ello que a pesar de que la muestra con aditivo #5 fue inoculada con una alta concentración de bacterias *Escherichia coli* O157:H7 ( $10^5$  UFC/mL), logró reducir el crecimiento microbiano. Por otra parte, el aditivo #5, a partir del día 3 de almacenamiento, registró valores menores que la muestra sin aditivo, lo que resultó significativo ( $p \leq 0.05$ ) el día 9. Sin embargo, debido a la alta concentración de bacterias inoculadas, la vida útil de la carne cruda de cerdo se redujo al día 9 de almacenamiento, ya que a partir de ese día se perdieron las características sensoriales de calidad deseables en la carne (color, olor y textura). Con respecto a los aditivos #2 y #3, estos no mostraron un efecto bacteriostático de manera significativa ( $p > 0.05$ ), presentándose antes la fase exponencial (día 6) con respecto a la muestra sin aditivo (día 9).



**Figura 22.** Efecto de los aditivos sobre el crecimiento de *E. coli* en hamburguesas de carne de cerdo cruda almacenadas a 4 °C durante 12 días.



**Cuadro 9.** Número de unidades formadoras de colonias (UFC) en hamburguesas de carne de cerdo cruda inoculadas con *Escherichia coli* O157:H7 y almacenadas a 4 °C durante 12 días.

Muestra	Días					
	0	1	3	6	9	12
Sin inóculo	1.20E+04 <sup>b</sup>	2.20E+06 <sup>a</sup>	1.98E+07 <sup>a</sup>	5.70E+06 <sup>c</sup>	2.48E+07 <sup>b</sup>	2.43E+07 <sup>a</sup>
Sin aditivo	4.17E+04 <sup>b</sup>	2.45E+06 <sup>a</sup>	1.95E+07 <sup>a</sup>	2.27E+07 <sup>c</sup>	8.00E+07 <sup>a</sup>	5.92E+06 <sup>a</sup>
Aditivo 2	1.15E+06 <sup>a</sup>	4.67E+04 <sup>b</sup>	1.91E+07 <sup>a</sup>	1.25E+08 <sup>b</sup>	3.30E+07 <sup>ab</sup>	2.27E+07 <sup>a</sup>
Aditivo 3	1.39E+06 <sup>a</sup>	1.41E+06 <sup>ab</sup>	1.95E+07 <sup>a</sup>	2.14E+08 <sup>a</sup>	1.03E+07 <sup>b</sup>	2.15E+07 <sup>a</sup>
Aditivo 5	7.77E+05 <sup>ab</sup>	1.05E+06 <sup>ab</sup>	6.90E+06 <sup>a</sup>	1.29E+07 <sup>c</sup>	6.55E+06 <sup>b</sup>	2.13E+06 <sup>a</sup>

Medias con superíndice distinto dentro de un día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

La efectividad bacteriostática del aditivo #5 mostrada en el análisis *in vitro* se conservó para el sistema *in vivo*. Como se mencionó anteriormente en el punto 8. 3. 1 dicha efectividad se puede deber a la presencia de fitoquímicos activos en los ingredientes que integran al aditivo #5 los cuales han sido reportados que poseen actividad antimicrobiana (Gharibi *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2007; Aboaba y Efuwape, 2001). Estos son capaces de inhibir el metabolismo celular de los microorganismos causando alteraciones en la membrana (Kchaou *et al.*, 2016; Reygaert, 2014).

Dentro de los ingredientes que integran al aditivo #5 y que no están presentes en los aditivos #2 y #3, se encuentra la jamaica, el ajo y pimienta negra, los cuales pudieron haber contribuido a una mayor efectividad bacteriostática. La actividad antimicrobiana de la jamaica, ajo y pimienta negra ha sido reportada por diversos investigadores.

Sulaiman *et al.* (2014) compararon la actividad antimicrobiana de extractos acuosos de ajo (*Allium sativum*), jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y jengibre (*Zingiber officinale*), así como la combinación de los tres contra *Escherichia coli*, encontrando una efectiva inhibición con jamaica de manera individual y en combinación con ajo y jengibre atribuyendo su efectividad al contenido de flavonoides, terpenoides, alcaloides, taninos, saponinas, antraquinonas y



compuestos fenólicos. Así mismo, Rahman *et al.* (2011) mostraron la actividad antimicrobiana de la combinación de extractos acuosos de cebolla (*Allium cepa*) y ajo (*Allium sativum*) contra dicha bacteria, atribuyendo su actividad al compuesto activo alicina presente en el ajo y a los compuestos organosulfurados y fenólicos presentes en la cebolla. La alicina actúa inhibiendo de manera parcial la síntesis de ADN y proteínas, mientras que de manera total la síntesis de ARN (Eja *et al.*, 2007). Cuando los extractos acuosos se utilizaron por separado no lograron mostrar una actividad antimicrobiana efectiva contra *E. coli*.

Por otra parte, Higginbotham *et al.* (2014) utilizaron extractos de jamaica como un aditivo en salchichas para inhibir la reproducción de *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, donde concluyeron que es altamente efectivo para la inhibición de estas especies bacterianas y que a mayor concentración y tiempo de inmersión mejor fue el efecto antimicrobiano. La actividad antimicrobiana de *Hibiscus sabdariffa* (jamaica) se debe principalmente a la presencia de dos fitoquímicos activos: gosipentina y ácido protocateico (Chao y Yin, 2009). Huhtanen (1980) probó extractos etanólicos de 33 especies contra *Clostridium botulinum*, de las especies ensayadas encontró que la nuez moscada, el laurel y la pimienta negra mostraron fuerte actividad inhibidora frente a esta bacteria. Se ha informado que el efecto inhibidor del crecimiento microbiano de la pimienta negra se debe a su principal constituyente activo que es la piperina (Reshmi *et al.*, 2010).

Otros estudios que han hecho uso de especias culinarias y mostrado una inhibición efectiva contra *E. coli* se encuentra el de Salami *et al.* (2016) quienes mostraron la efectividad de las semillas y hojas de hinojo contra dicha bacteria. Ortega-Nieblas *et al.* (2011) utilizaron aceites esenciales obtenidos de hojas de orégano, los cuales mostraron una alta actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*. De igual manera, Amrita *et al.* (2009) confirmaron la actividad antimicrobiana de cuatro especias (cúrcuma, canela, clavo y jengibre) siendo la cúrcuma la especia que presentó el mayor porcentaje de inhibición.



Por otro lado, algunas especias se usan rutinariamente en los productos cárnicos y es probable que actúen en ellos inhibiendo el crecimiento bacteriano, dependiendo de las cantidades empleadas en la formulación (Hirasa y Takemasa, 2002).

En el presente estudio el crecimiento significativo de *E. coli* con los aditivos #2 y #3 puede deberse a diferentes factores, entre ellos la concentración inoculada  $10^5$  UFC/mL. Miyamoto (1986) estudió las propiedades antimicrobianas de un extracto etanólico de wasabi sobre *E. coli*, encontrando que la propiedad antimicrobiana de ese extracto aumentaba al aumentar las cantidades añadidas. Así mismo, Xiong *et al.* (2017) señalaron que el galato de epigalatoecatequina presente en el té verde mostró actividad antibacteriana contra *E. coli* en una manera dependiente de la dosis.

En el presente trabajo los aditivos estudiados se diluyeron al 50%. Esta dilución se consideró debido a que cuando se aplicaba el aditivo concentrado el sabor que impartía a las hamburguesas era demasiado intenso a especias. Este factor pudo haber influido para que no se llevara a cabo una eficaz actividad antimicrobiana con los aditivos #2 y #3, ya que es probable que no se logró un balance entre los compuestos fitoquímicos antimicrobianos y los nutrientes para el crecimiento bacteriano. Es decir, la dilución utilizada al 50% de los aditivos no alcanzó la concentración mínima inhibidora. Así mismo, cabe señalar que la concentración de bacterias de *E. coli* inoculadas en las muestras podría considerarse alta  $10^5$  UFC/mL, pudiendo no ser suficientes los compuestos antibacterianos presentes en los aditivos #2 y #3. Por otra parte, las bacterias gram-negativo (*E. coli*) suelen ser más resistentes al ataque de compuestos antibacterianos debido a que poseen una membrana lipídica externa de protección adicional a la membrana citoplasmática (Kossah *et al.*, 2011; Bamoniri *et al.*, 2010).

Hasta el momento, son pocas las investigaciones que al hacer uso de especias culinarias para inhibir el crecimiento de *E. coli* reflejan un efecto contrario, es decir aumento en el crecimiento de dicha bacteria. Dentro de los estudios que demuestran un crecimiento de *E. coli* está el de Noda *et al.* (1985), quienes indicaron que el jugo de ajo promovía el crecimiento de dicho microorganismo y era dependiente de la concentración. A una dilución de 1:750 veces



no se observó crecimiento de *E. coli*, pero la bacteria se encontró a diluciones en el rango de 1:15000 a 1:150000 veces. Se señaló que la escordinina, un constituyente fitoquímico del ajo, tenía capacidad para promover el crecimiento de *E. coli*. Así mismo, los investigadores señalaron que a bajas concentraciones el ácido tánico presente en el tomillo y el ácido ascórbico presente en varias especias frescas actuaron como factores de promoción en el crecimiento de *E. coli*.

La diferencia significativa presente entre los aditivos #2, #3 y #5 se puede deber a la naturaleza de las sustancias antimicrobianas presentes en las especias y sus mecanismos de acción sobre el tipo de microorganismo utilizado en el ensayo (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011b). Así mismo, en el aditivo #5 pueden encontrarse compuestos polifenólicos que posean un mayor número de grupos hidroxilo (-OH) y/o grupos aldehído (-CHO), los cuales tienden a poseer una fuerte actividad antimicrobiana (Hirasa y Takemasa, 2002). De igual forma, la concentración utilizada de los aditivos #2 y #3 pudo no ser la suficiente para inhibir el crecimiento microbiano.

Por otra parte, se desconoce si alguno de los constituyentes fitoquímicos de las especias empleadas en los aditivos #2 y #3 posea capacidad para promover el crecimiento de la bacteria, encontrándose en una concentración suficiente. Sin embargo, los extractos de productos naturales seguirán siendo un punto de partida común en la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos.

### **8.3.3. Porcentaje de acidez titulable en hamburguesas de carne cruda de cerdo recubiertas con aditivo e inoculadas con *Escherichia coli***

Después de la muerte de un animal de carnicería, el 1% del glucógeno presente en el músculo se convierte en ácido láctico durante la glucólisis anaerobia, dicho ácido es el causante directo de la disminución de los valores de pH en la carne (Lawrie, 1998; Jay, 2002).

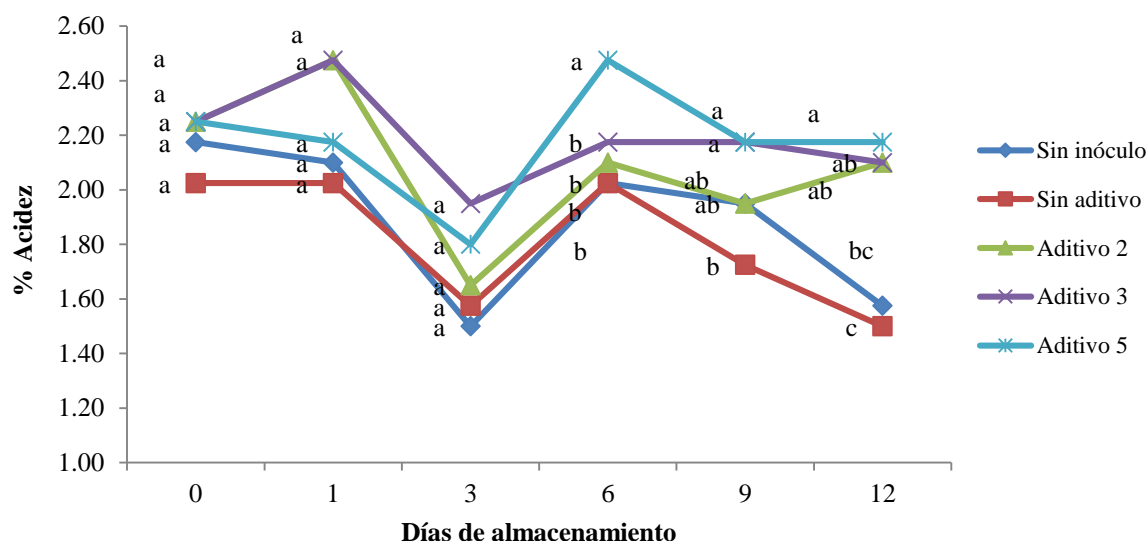


En la figura 23 se muestran los resultados de porcentaje de acidez de las hamburguesas de carne de cerdo cruda inoculadas con *Escherichia coli* O157:H7. Se puede observar una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) durante el día 6 de almacenamiento para las hamburguesas con el aditivo #5, las cuales presentaron 2.48 % de ácido láctico, siendo este el valor más alto con respecto al resto de las muestras, lo cual está correlacionado con las medias de UFC ( $r = -0.721$ ,  $p = 0.028$ ) obtenidas en el análisis *in vivo* para el día 6 de almacenamiento, donde los aditivos #2 y #3 mostraron un crecimiento significativo de *E. coli*. Es decir, a menor porcentaje de acidez en el aditivo #2 (2.10 % de ácido láctico) y #3 (2.18 % de ácido láctico), mayor crecimiento de *E. coli* y a mayor porcentaje de acidez en el aditivo #5, menor crecimiento de *E. coli*.

Así mismo, se puede observar una diferencia significativa en el día 9 de almacenamiento entre el aditivo #5 y la muestra sin aditivo, presentando el aditivo #5 un mayor porcentaje de acidez y es precisamente en el día 9 en el análisis *in vivo* donde se presenta una diferencia significativa entre esas dos muestras en el número de UFC, encontrándose un menor crecimiento de *E. coli* con el aditivo #5. Cabe mencionar, que los tres aditivos presentaron pH bajos, 2.83, 2.90 y 2.05 para los aditivos #2, #3 y #5, respectivamente, factor que influyó en la modificación de acidez de la carne.

La actividad antimicrobiana del ácido láctico se produce a través de la difusión de las moléculas de este compuesto en las células microbianas, hasta que se alcanza el equilibrio de acuerdo con el gradiente de pH, causando ruptura de la membrana, inhibición de las reacciones metabólicas básicas y la muerte de la célula microbiana (Brul y Coote, 1999). Por otra parte, la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos presentes en los aditivos podría atribuirse a su interacción con la membrana celular de los microorganismos. Estos compuestos podrían inhibir las actividades de proteasas y proteínas transportadoras, que podrían afectar a las funciones bacterianas (Kchaou *et al.*, 2016; Reygaert, 2014). Sin embargo, en los aditivos #2 y #3 los compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana pudieron no ser suficientes para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7.





**Figura 23.** Porcentaje de acidez (ácido láctico) de hamburguesas de carne de cerdo cruda inoculadas con *Escherichia coli* O157:H7 almacenadas a 4 °C durante 12 días.

Medias con superíndice distinto dentro de un día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

De manera general, en los demás días de almacenamiento se pudo observar como las hamburguesas con aditivo presentaron los valores más altos de porcentaje de acidez de ácido láctico, lo cual se ve relacionado a valores bajos en el número de UFC en el análisis *in vivo*. Esto se puede deber a que las especias culinarias empleadas en la preparación de los aditivos son fuente disponible de carbohidratos (glucosa), la cual es sujeta a fermentación por los microorganismos generando con ello la presencia de ácido láctico (Newton y Gill, 1978). Sin embargo, los valores de acidez pudieron no ser suficientes en el aditivo #2 y #3 para ayudar a favorecer una acción bacteriostática.

### 8.3.4. Color en hamburguesas de carne cruda de cerdo recubiertas con aditivo e inoculadas con *Escherichia coli*

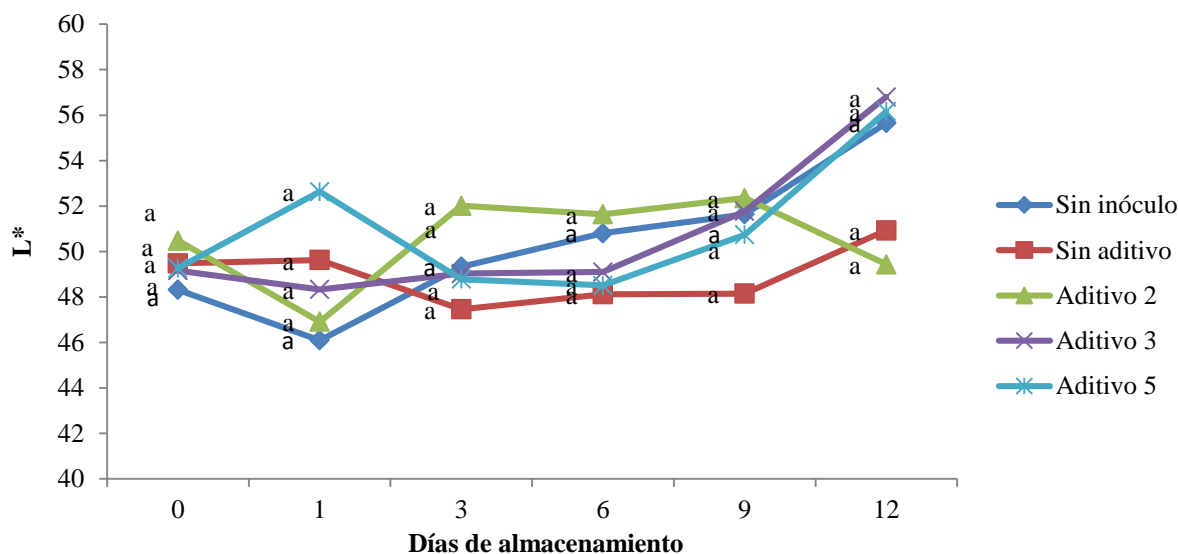
Las figuras 24 y 25 muestran la evolución de los parámetros de luminosidad o brillantez y color respectivamente de las hamburguesas recubiertas con aditivo e inoculadas con *E. coli* durante los 12 días de almacenamiento refrigerado.



Se considera que el ángulo matiz (*Hue*) proporciona información sobre el color de la carne (Brewer *et al.*, 2001), mientras que la luminosidad ( $L^*$ ) rige la calidad de los productos cárnicos, pues Zhu y Brewer (1998) señalan que el valor de  $L^*$  muestra un coeficiente de correlación más alto con la percepción visual de enrojecimiento y podría considerarse el mejor indicador instrumental de enrojecimiento visual (Joo *et al.*, 1995).

De acuerdo a los presentes resultados, las hamburguesas analizadas no mostraron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos con respecto al parámetro de luminosidad (figura 24). En todas las muestras se observó una luminosidad media que osciló entre los 45 y 57 a lo largo de los 12 días de almacenamiento, lo cual se puede deber para el caso de las hamburguesas con aditivo al color propio de éstos (tonalidad naranja tenue con ligeros toques cafés), restando luminosidad o brillantez, particular de la carne. Así mismo, se pudo deber al deterioro microbiano el cual se produce cuando los nutrientes de la carne como glucosa, aminoácidos libres y los compuestos volátiles son metabolizados durante el crecimiento bacteriano, contribuyendo con ello al desarrollo de colores desagradables, así como malos olores y sabores (Cappelletti *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2013; Nychas *et al.*, 2008).

El deterioro microbiano también pudo haber sido la causa para las hamburguesas sin aditivo, pues cabe señalar, que la inoculación se realizó con una alta carga microbiana ( $10^5$  UFC/mL), mientras que para las hamburguesas sin inóculo se pudo deber a la propia carga microbiana implícita ya en la carne.



**Figura 24.** Efecto de los aditivos sobre la luminosidad o brillantez de las hamburguesas de carne de cerdo cruda inoculadas con *E. coli* y almacenadas a 4 °C durante 12 días.

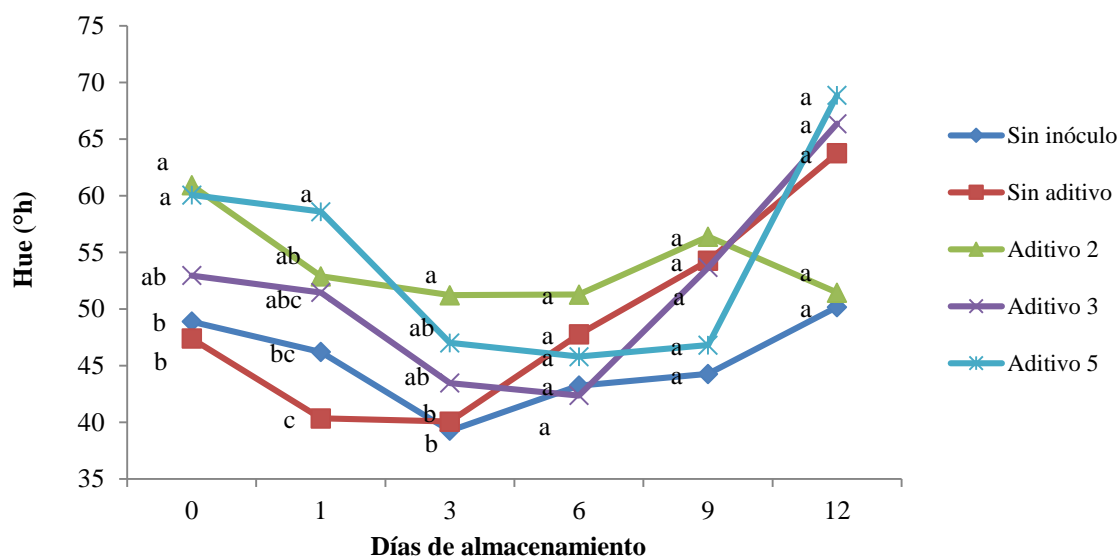
Medias con superíndice distinto dentro de un día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

Con respecto al ángulo matiz, indicativo del color (García-Tejeda *et al.*, 2011), los resultados obtenidos (figura 25) presentaron diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos durante los 3 primeros días de almacenamiento refrigerado. Los aditivos #2 y #5 no lograron inhibir la decoloración de la carne de cerdo cruda ya que presentaron valores significativamente más altos que las hamburguesas sin inóculo, sin aditivo y con aditivo #3, situándose en una tonalidad de rangos naranjas tenues, esto debido al color propio de los aditivos. Por otro lado, el aditivo #3 no presentó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con respecto a las hamburguesas sin inóculo y sin aditivo a lo largo de los 12 días de almacenamiento, por lo que se puede decir que ninguno de los aditivos logró inhibir la decoloración de la carne cruda de cerdo inoculada con *E. coli*.

Cabe recalcar que a partir del día 6 de almacenamiento, todas las muestras (con excepción de la muestra con aditivo 2) comenzaron a mostrar un aumento en sus valores, tomando tonalidades amarillas, sin presentar diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre ellas. La decoloración o tonalidad amarilla de la carne puede deberse a una ausencia de sustratos



carbohidratos fácilmente disponibles, al suceder esto los microorganismos atacan inmediatamente a los aminoácidos causando alteración que se manifiesta con olores desagradables y cambios de decoloración (Newton y Gill, 1978). La decoloración también puede deberse a procesos oxidativos que provocan la degradación de lípidos y proteínas presentes en la carne (Chelh *et al.*, 2007), iniciando de esta forma el deterioro de su calidad sensorial.



**Figura 25.** Efecto de los aditivos sobre el color de las hamburguesas de carne de cerdo cruda inoculadas con *E. coli* y almacenadas a 4°C durante 12 días.

Medias con superíndice distinto dentro de un día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

En resumen, ninguno de los aditivos logró inhibir la decoloración de las hamburguesas durante el almacenamiento refrigerado, así mismo no disminuyeron pero tampoco mejoraron la luminosidad de la carne inoculada, ya que no mostraron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con respecto a las hamburguesas sin inóculo y sin aditivo. A partir del día 6 de almacenamiento, todas las hamburguesas comenzaron a aumentar sus valores tomando tonalidades amarillas y acortando su vida de anaquel.



Por otra parte, la diferencia numérica total de color ( $\Delta E$ ) entre las hamburguesas control (hamburguesas sin inóculo) y las hamburguesas tratadas (sin aditivo, con aditivo #2, #3 y #5) en los días 0, 1, 3, 6, 9 y 12 se muestra en el cuadro 10. De acuerdo a Francis y Clydesdale (1975) las modificaciones de color medidas instrumentalmente entre dos muestras de carne dadas se pueden considerar como cambios visuales notables cuando los valores de  $\Delta E$  son superiores a 2.

Los resultados obtenidos en el presente estudio señalan una  $\Delta E$  mayor a 2 para todas las muestras dentro de cada día de almacenamiento, excepto las hamburguesas sin aditivo en el día 3, las hamburguesas con aditivo #3 en el día 9 y 12 y las hamburguesas con aditivo #5 en el día 12. Es decir, de manera general las hamburguesas tratadas sufrieron cambios de color durante el almacenamiento refrigerado el cual podría ser percibido por los consumidores. Sin embargo, no se presentó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en el  $\Delta E$  entre las hamburguesas tratadas dentro de cada día de almacenamiento, lo cual coincide con los resultados obtenidos de luminosidad y ángulo matiz (*Hue*) donde ninguna de las muestras tratadas logró inhibir la decoloración de la carne de cerdo inoculada con *E. coli*, presentando igualdad con las hamburguesas control.

**Cuadro 10.** Diferencia total de color ( $\Delta E$ ) entre la muestra sin inóculo y las muestras tratadas en hamburguesas de carne de cerdo cruda inoculadas con *E. coli* y almacenadas a 4 °C durante 12 días.

Muestras	Días					
	0	1	3	6	9	12
<b>Sin aditivo</b>	3.40	3.83	1.96	2.96	4.60	5.63
<b>Aditivo 2</b>	3.15	2.29	3.89	3.51	4.52	7.54
<b>Aditivo 3</b>	2.67	2.89	2.21	5.08	1.73	1.82
<b>Aditivo 5</b>	3.24	7.21	2.59	3.64	3.78	1.75

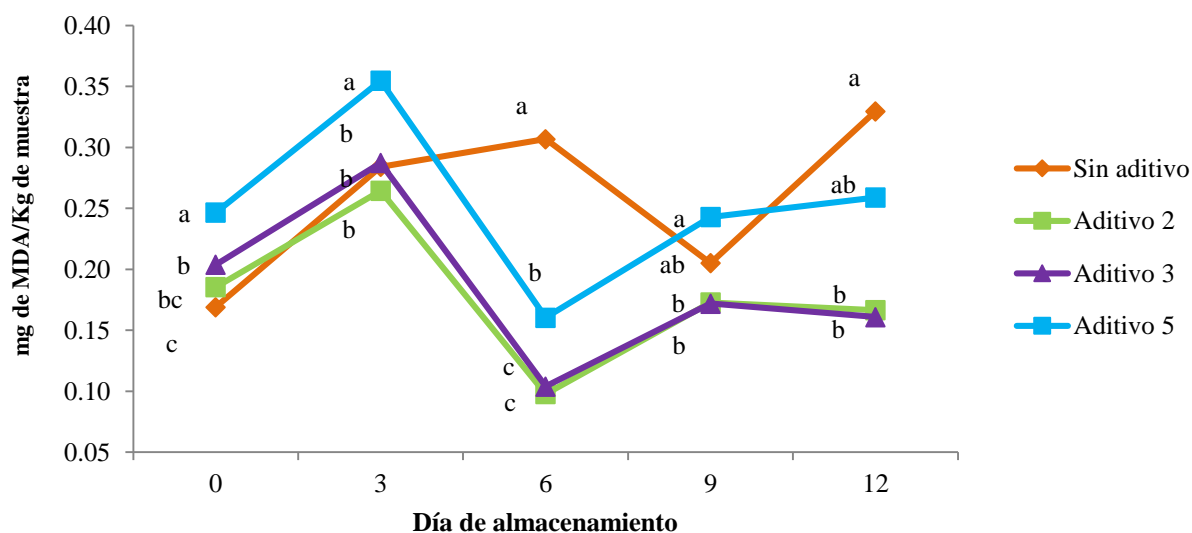
Medias sin superíndice denotan igualdad entre los tratamientos (Tukey,  $p > 0.05$ )



### 8.3.5. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada

Los valores promedios de TBARS determinados durante los 12 días de almacenamiento refrigerado en las hamburguesas crudas y cocinadas variaron desde 0.17 a 0.35 mg MDA/kg de muestra en hamburguesas crudas y de 0.18 a 1.09 mg MDA/kg de muestra en hamburguesas cocinadas.

Los resultados de MDA en hamburguesas crudas (figura 27) muestran diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ), donde se puede apreciar como las hamburguesas sin aditivo mostraron un incremento de más del doble al final del período de almacenamiento de 0.17 a 0.33 mg MDA, debido a que no estuvo presente ningún compuesto inhibidor. Mientras que las hamburguesas con aditivo #2 y #3 lograron disminuir la concentración de MDA con respecto a las hamburguesas sin aditivo y con aditivo #5, pudiéndose observar dicho efecto a partir del día 6 de almacenamiento.

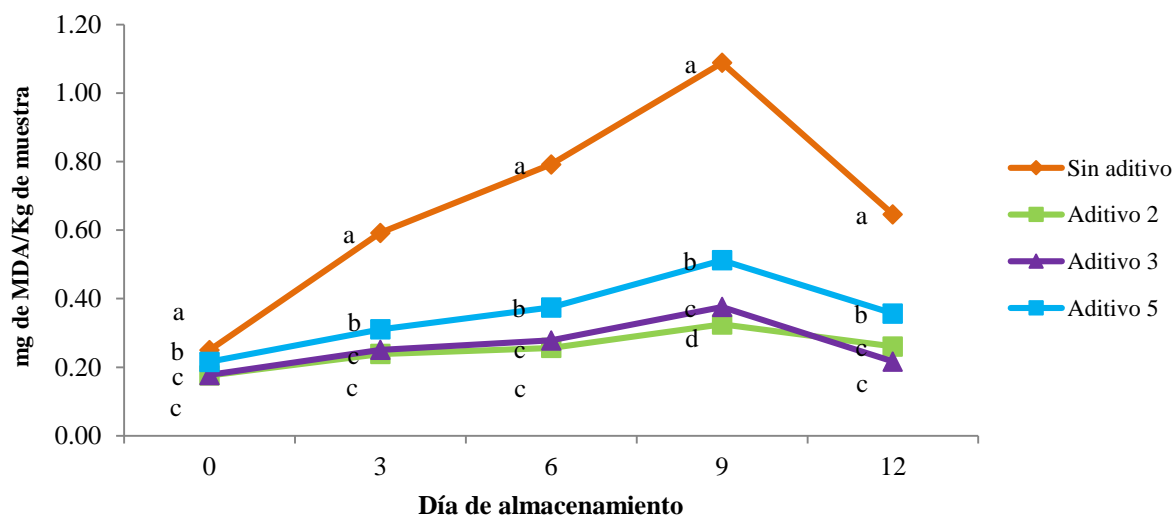


**Figura 26.** Efecto de los aditivos sobre la concentración de MDA de las hamburguesas de carne de cerdo cruda y almacenada a 4 °C durante 12 días.

Medias con superíndice distinto dentro de un día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )



Los resultados de TBARS en hamburguesas cocinadas (figura 28) también presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las muestras. Los tres aditivos fueron capaces de disminuir la concentración de MDA con respecto a las hamburguesas sin aditivo a lo largo de los 12 días de almacenamiento, siendo los aditivos #2 y #3 los que lograron de manera significativa un mejor efecto en relación al aditivo #5.



**Figura 27.** Efecto de los aditivos sobre la concentración de MDA de las hamburguesas de carne de cerdo cocinada y almacenada a 4 °C durante 12 días.

Medias con superíndice distinto dentro de un día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

La concentración de TBARS aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) en las hamburguesas sin aditivo durante el almacenamiento refrigerado, como resultado probable de la aparición de reacciones oxidativas de lípidos. Por el contrario, las hamburguesas tratadas con aditivo mostraron concentraciones menores de TBARS con el tiempo durante el almacenamiento. Entre las muestras tratadas, las hamburguesas con aditivo #2 y #3 presentaron las concentraciones de TBARS más bajas al final del almacenamiento refrigerado tanto en hamburguesas crudas como cocinadas.



Los valores de TBARS por encima de 0.5 mg MDA/Kg de muestra son críticos, ya que indican un nivel de productos de oxidación de lípidos que producen un olor y sabor rancio que puede ser fácilmente detectado por los consumidores (Wood *et al.*, 2008). Este nivel de rancidez se alcanzó después de la cocción en las hamburguesas sin aditivo, aumentando sus valores durante el posterior almacenamiento refrigerado, indicando con ello que el proceso de cocción puede ser capaz de acelerar las velocidades de oxidación de lípidos.

Los aditivos con capacidad antioxidante empleados en el presente estudio mejoraron la estabilidad oxidativa de los lípidos tanto en hamburguesas crudas como cocinadas. De esta manera, la intensa actividad antioxidante mostrada por los aditivos en los ensayos *in vitro* (figuras 14 a 18) predijo de forma eficiente el efecto protector de los aditivos sobre los lípidos en productos cárnicos reales. Otros autores han obtenido resultados similares, al evaluar distintos materiales de plantas en hamburguesas crudas (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011b; Ibrahim *et al.*, 2010; Bekhit *et al.*, 2009; Jo *et al.*, 2003) y cocinadas (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011c).

Así mismo, se puede mencionar a Janoszka (2010b) y Polak *et al.* (2011) quienes obtuvieron resultados exitosos en la reducción de TBARS al utilizar cebolla y ajo en carne de cerdo, así como tocoferoles y ácido ascórbico en paté de hígado de pollo. De igual forma, Jayathilakan *et al.* (2007) lograron disminuir la oxidación de lípidos con la misma eficacia que ciertos antioxidantes sintéticos en productos cárnicos cocidos mediante la utilización de canela y/o clavo. Sin embargo, son pocos los estudios que han intentado demostrar la eficacia de las mezclas de antioxidantes naturales contra la oxidación de lípidos (Ahn *et al.*, 2007). Uno de ellos, es la investigación realizada por Armenteros *et al.* (2016) quienes utilizaron una mezcla de aceites esenciales de ajo, canela, clavo y romero, obteniendo resultados favorables al inhibir la oxidación de lípidos en jamones ibéricos.

El efecto protector de los aditivos contra la oxidación de lípidos se puede atribuir a los componentes naturales de las especias que integran a los aditivos con probado potencial antioxidante tales como ácidos fenólicos, diterpenos fenólicos y flavonoides (Brewer, 2011).





Algunos de los compuestos fenólicos que forman parte de las especias culinarias que integran a los aditivos, tal como el ácido gálico presente en la canela y las catequinas presentes en el ajo (Brewer, 2011) se han descrito como inhibidores de la formación de compuestos carbonilo a partir de proteínas miofibrilares (Estévez y Heinonen, 2010). Así mismo, se ha reportado que los extractos de ajo inhiben la oxidación de los lípidos al actuar como atrapadores de radicales hidroxilo en varios productos cárnicos (Aguirrezábal *et al.*, 2000).

Por otra parte, la baja actividad inhibitoria significativa ( $p \leq 0.05$ ) del aditivo #5 con respecto a los aditivos #2 y #3 puede deberse a que dentro de sus ingredientes el aditivo #5 presenta cloruro de sodio (NaCl) el cual se dice que mejora la solubilidad del ión  $Fe^{3+}$ , estimulando así sus efectos pro-oxidantes (Osinchak *et al.*, 1992). La oxidación de lípidos disminuye la vida útil de los productos cárnicos causando daño sobre atributos nutricionales y sensoriales, tal como el desarrollo de olores y sabores a rancio (Gandemer, 2002). Además, algunos TBARS como el MDA, han sido reportados como compuestos con potencial tóxico y mutagénico para el ser humano (Del Río *et al.*, 2005). Por lo tanto, los aditivos #2 y #3 en hamburguesas crudas y los aditivos #2, #3 y #5 en hamburguesas cocinadas pueden ser una estrategia eficiente para disminuir los efectos adversos causados por la oxidación de lípidos.

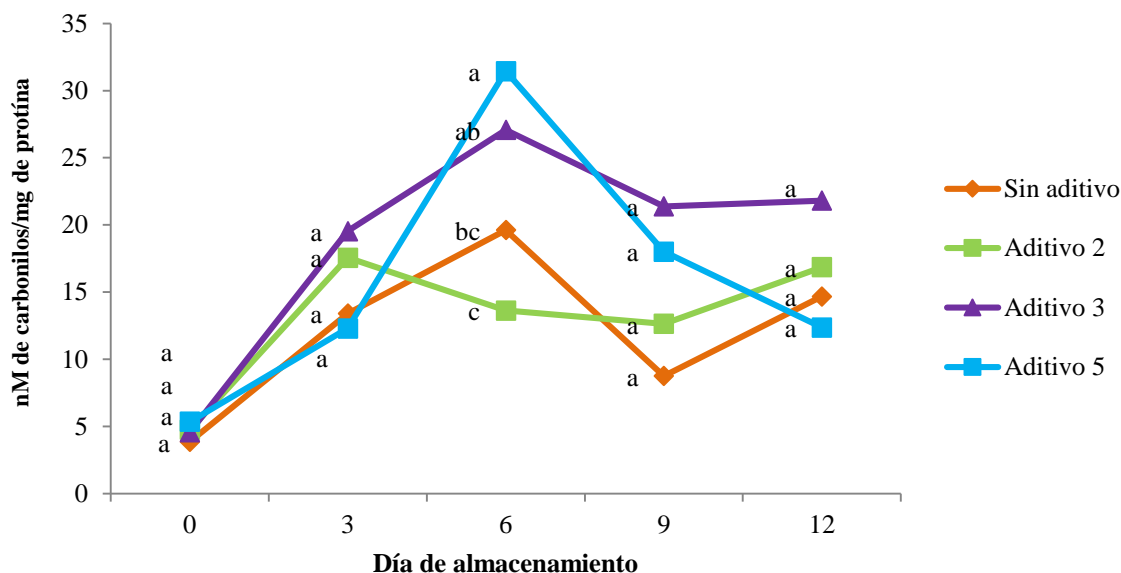
### **8.3.6. Determinación del total de carbonilos de proteína por la técnica DNPH en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada**

Los valores promedios de carbonilos hallados durante los 12 días de almacenamiento en las hamburguesas crudas y cocinadas variaron desde 3.86 hasta 31.45 nM carbonilos/mg de proteína en hamburguesas crudas y de 5.48 a 55.18 nM carbonilos/mg de proteína en hamburguesas cocinadas.

Los resultados de carbonilos en hamburguesas crudas (figura 29) no mostraron una reducción significativa ( $p > 0.05$ ) de carbonilos de las hamburguesas con aditivo con respecto a las hamburguesas sin aditivo durante los 12 días de almacenamiento. Es decir, ninguno de los tres



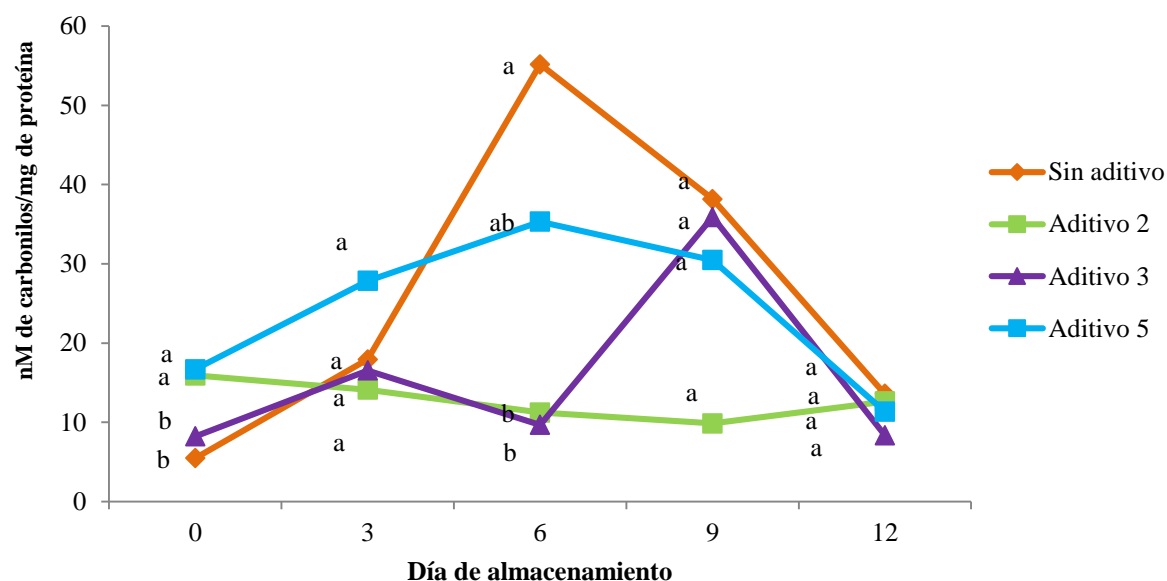
aditivos aplicados logró ejercer una acción inhibitoria sobre la oxidación de proteínas en hamburguesas crudas.



**Figura 28.** Efecto de los aditivos sobre la concentración de carbonilos de las hamburguesas de carne de cerdo cruda y almacenada a 4 °C durante 12 días.

Medias con superíndice distinto dentro de un día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

En relación a los resultados de carbonilos en hamburguesas cocinadas (figura 30), se presentó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las muestras únicamente en el día 6 de almacenamiento, mostrando una reducción de carbonilos los aditivos #2 y #3 con respecto a las hamburguesas sin aditivo. Sin embargo, este efecto no fue eficaz en los demás días de muestreo. Por otra parte, el aditivo #5 no mostro diferencia significativa con respecto a las hamburguesas sin aditivo, por lo que podría considerarse que ninguno de los tres aditivos aplicados logró una eficiente acción inhibitoria sobre la oxidación de proteínas en hamburguesas cocinadas.



**Figura 29.** Efecto de los aditivos sobre la concentración de carbonilos de las hamburguesas de carne de cerdo cocinada y almacenada a 4 °C durante 12 días.

Medias con superíndice distinto dentro de un mismo día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

De manera general, el uso de los aditivos estudiados en la presente investigación no logró disminuir de manera significativa ( $p > 0.05$ ) la cantidad de carbonilos derivados de la oxidación de proteínas en las hamburguesas, tanto crudas como cocinadas, con respecto a aquellas que no incluían aditivo. Estos resultados demuestran que las proteínas musculares sufrieron reacciones oxidativas durante el almacenamiento refrigerado de las hamburguesas y a causa de la alta temperatura de cocción empleada para el caso de las hamburguesas cocinadas. Pues se sabe que el aumento de la susceptibilidad de las carnes cocidas a la carbonilación de proteínas se puede atribuir a la disrupción de los tejidos miofibrilares como resultado de las altas temperaturas, que a su vez conduce a la liberación de hierro no hemo (no proteico) y a una mayor incorporación de oxígeno al sistema. El hierro no hemo también ha sido reconocido como un promotor principal de la formación de restos de carbonilo a partir de proteínas miofibrilares (Estévez y Heinonen, 2010).

Los carbonilos derivados de proteínas son productos bien conocidos de la oxidación de ciertos aminoácidos tales como prolina, arginina y lisina y su detección usando el método de DNPH



se ha empleado como valorización de la oxidación de proteínas en alimentos musculares (Estévez *et al.*, 2009). Los carbonilos más representativos de la oxidación de proteínas son los semialdehídos  $\alpha$ -amino adípico y  $\gamma$ -glutámico, ya que representan alrededor del 70% del total de carbonilos proteicos en proteínas oxidadas (Requena *et al.*, 2001).

En comparación con los resultados del presente estudio, Ganhão *et al.* (2010b) encontraron de igual forma niveles altos de carbonilos proteicos en carne de cerdo sometida a cocción y un posterior almacenamiento en frío, lo que pone de manifiesto el impacto de las altas temperaturas sobre la estabilidad oxidativa de las proteínas musculares. El grado de carbonilación en proteínas se ha investigado tanto en hamburguesas crudas como cocinadas y se ha encontrado que los productos cárnicos cocidos contienen mayores cantidades de carbonilos, lo que sugiere que las operaciones de fabricación promueven la formación de carbonilos (Estévez, 2011).

Por otra parte, existen estudios que han reportado resultados contradictorios con respecto al impacto del procedimiento de refrigeración en la formación de carbonilos de proteínas oxidadas en carne cruda. Algunos autores han señalado que no hay aumento de la cantidad de carbonilos durante el almacenamiento refrigerado (Smet *et al.*, 2008; Lund *et al.*, 2007). Sin embargo, se sabe que la formación de la oxidación lipídica en los sistemas cárnicos tiene lugar más rápidamente que la degradación oxidativa de las proteínas miofibrilares (Estévez *et al.*, 2009).

Por lo tanto, es aceptable que las especies reactivas de oxígeno o los hidoxiperóxidos derivados de la oxidación lipídica promuevan la oxidación de proteínas. La correlación positiva ( $r=0.560$ ;  $p=0.000$ ) encontrada en el presente estudio entre la oxidación proteica y lipídica en hamburguesas cocinadas, apoya la teoría de que la oxidación de lípidos y proteínas están acoplados en los sistemas cárnicos alimentarios. De hecho, numerosos investigadores de la carne han reportado acerca de dicha interacción entre lípidos y proteínas (Estévez *et al.*, 2008; Ventanas *et al.*, 2007, Ventanas *et al.*, 2006), lo cual es apoyado por el hecho de que las especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas durante las primeras etapas de la oxidación de



lípidos pueden unirse a residuos de aminoácidos susceptibles para desencadenar su degradación oxidativa (Stadtman y Levine, 2003).

En contraste con los resultados de la oxidación lipídica, las diferencias entre los tratamientos con respecto a la oxidación proteica no fueron tan claros y esto está de acuerdo con otros autores (Smet *et al.*, 2008; Lund *et al.*, 2007).

Cabe destacar la falta de correspondencia entre la actividad antioxidante de los aditivos en los ensayos *in vitro* y la actividad de tales aditivos frente a la oxidación de proteínas tanto en hamburguesas crudas como cocinadas. Los ensayos *in vitro* (figuras 14 a 18) de los aditivos pueden proporcionar una predicción fiable del comportamiento de estos frente a la oxidación de lípidos en sistemas de carne reales, más el efecto sobre la oxidación de proteínas podría no estar relacionado. Estos resultados reflejan que la química detrás de los procesos de oxidación de lípidos y proteínas puede diferir considerablemente entre los sistemas cárnicos (Lund *et al.*, 2008).

Los pocos estudios dedicados a evaluar el impacto de compuestos fenólicos sobre la oxidación de proteínas en carne cruda refrigerada reportan resultados contradictorios. Lund *et al.* (2007) reportan acciones prooxidantes de romero añadido en carne de cerdo refrigerada. Así mismo, Estévez y Heinonen (2010) reportan efectos contradictorios de antioxidantes naturales tales como ácido ascórbico y tocoferoles sobre la estabilidad oxidativa de las proteínas musculares.

Por otro lado, Haak *et al.* (2008) también reportaron resultados ambiguos mientras estudiaban el impacto del  $\alpha$ -tocoferol solo y en combinación con compuestos fenólicos sobre la oxidación de proteínas en carne de cerdo cruda y cocinada. Como compuestos redox activos, los compuestos fenólicos muestran una variedad de acciones que pueden conducir a acciones antioxidantes y/o prooxidantes hacia las proteínas alimentarias. En el presente estudio, el efecto prooxidante mostrado por los aditivos frente a la oxidación de proteínas puede atribuirse a una variedad de factores que incluyen la concentración de compuestos bioactivos,



la presencia de metales de transición y otros promotores de oxidación, así como la composición y estructura de la proteína (Estévez y Heinonen, 2010).

De acuerdo con los resultados del presente estudio, otros autores también han informado que ciertas estrategias antioxidantes con eficacia probada frente a la oxidación de lípidos no fueron tan eficaces contra la oxidación de proteínas (Haak *et al.*, 2009; Mercier *et al.*, 2004) o incluso mostraron actividad pro-oxidante (Estévez y Cava, 2006).

En el 2010 los investigadores Estévez y Heinonen propusieron un mecanismo probable por el cual los compuestos fenólicos podrían promover la formación de los semialdehídos  $\alpha$ -amino adípico (AAS) y  $\gamma$ -glutámico (GGS) a partir de proteínas miofibrilares. En presencia de metales de transición como el cobre o hierro, los compuestos fenólicos tales como el ácido clorogénico sufrirían un proceso de autooxidación que conduce a la formación de quinonas las cuales muestran actividad de amina-oxidasa. Las formas quinónicas de fenoles catalizan la desaminación oxidativa de aminoácidos susceptibles para formar semialdehídos como el AAS y GGS.

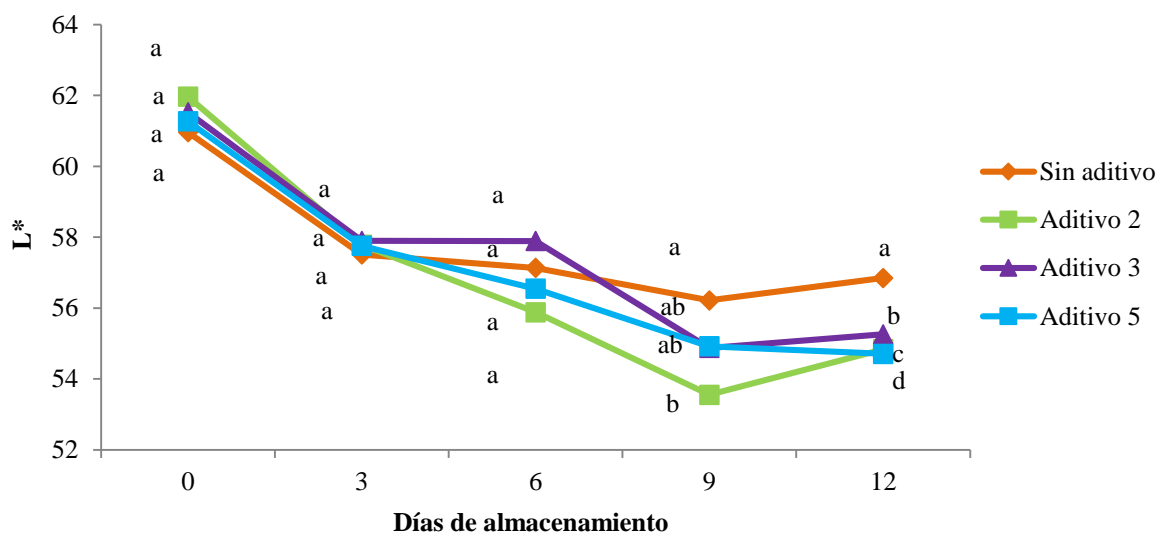
El impacto de la oxidación de proteínas sobre la calidad de los productos cárnicos no ha sido muy estudiado. Sin embargo, se acepta generalmente que la aparición de la oxidación de proteínas en alimentos conduce a una pérdida del valor nutritivo debido a que los compuestos de carbonilo derivan de aminoácidos esenciales que ya no están disponibles. Además, algunos estudios han establecido una relación entre el inicio de la oxidación de las proteínas y el deterioro de la textura en la carne fresca y cocinada (Ganhão *et al.*, 2010b; Lund *et al.*, 2008).

### **8.3.7. Evaluación de color en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada**

Las figuras 31 y 32 muestran la evolución de las mediciones instrumentales de luminosidad ( $L^*$ ) y ángulo *Hue* durante los 12 días de almacenamiento refrigerado de las hamburguesas de carne de cerdo cruda.



El análisis de resultados del parámetro de luminosidad de las hamburguesas crudas señala una pérdida de brillantez para todas las muestras a lo largo de los 12 días de almacenamiento, presentándose diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre ellas a partir del día 9, donde las hamburguesas con aditivo #2 fueron las que presentaron la mayor pérdida de brillantez con respecto al resto de las muestras, mientras que las hamburguesas sin aditivo fueron las que presentaron la menor pérdida.



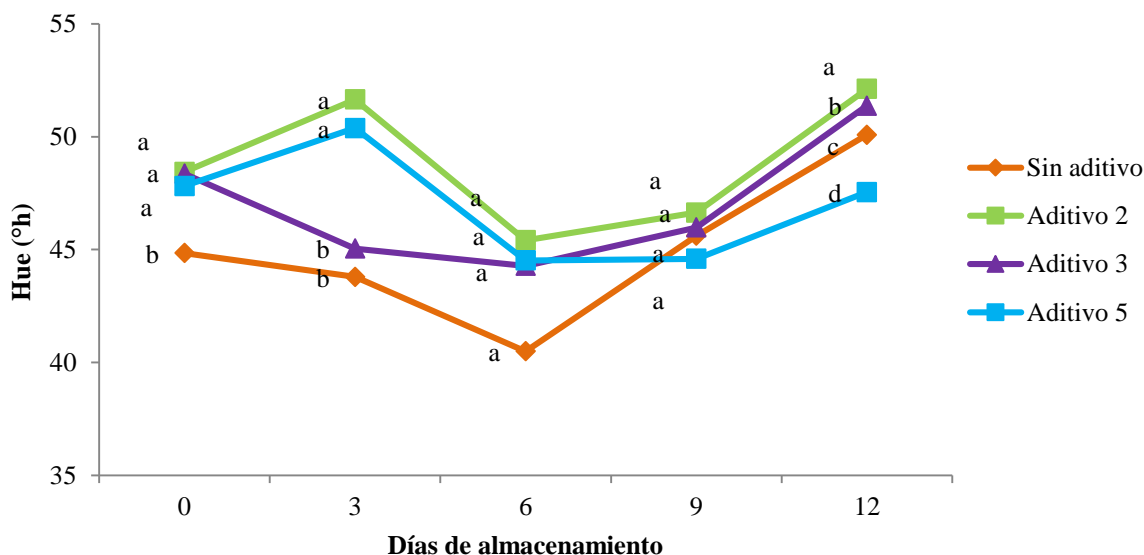
**Figura 30.** Efecto de los aditivos sobre la luminosidad o brillantez de las hamburguesas de carne de cerdo cruda y almacenada a 4 °C durante 12 días.

Medias con superíndice distinto dentro de un mismo día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

Respecto a los valores obtenidos del ángulo *Hue* de las hamburguesas crudas, puede observarse que la adición de los aditivos estudiados no tuvo un efecto significativo ( $p \geq 0.05$ ) sobre la inhibición de la decoloración de la carne con respecto a las hamburguesas sin aditivo. Valores más altos de grados *Hue* para la hamburguesas tratadas con aditivo con respecto a las hamburguesas sin aditivo durante los 6 primeros días de almacenamiento puede deberse a que los aditivos estudiados tenían un color naranja tenue con ligeros toques cafés como resultado de la extracción de pigmentos de las especias y la bina base utilizada. Los pigmentos se transfirieron probablemente a las hamburguesas durante su elaboración, provocando la modificación de su color. Sin embargo, después del día 6 tanto las hamburguesas con y sin



aditivo presentaron un aumento en sus valores tomando tonalidades amarillas tenues, siendo significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el día 12, donde las hamburguesas con aditivo #2 fueron las que presentaron el valor más alto, es decir la mayor decoloración.



**Figura 31.** Efecto de los aditivos sobre el color de las hamburguesas de carne de cerdo cruda y almacenada a 4 °C durante 12 días.

Medias con superíndice distinto dentro de un mismo día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

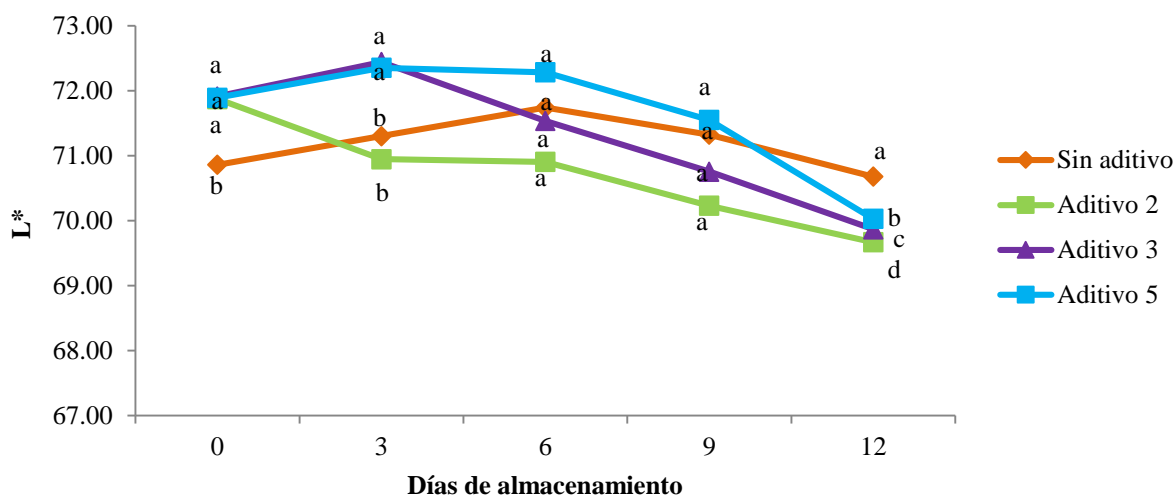
En resumen, las hamburguesas sin aditivo presentaron la menor decoloración al ser más rojizas que las hamburguesas con aditivo. Sin embargo, después del día 6 de almacenamiento todas las muestras comenzaron a aumentar sus valores tomando tonalidades amarillas y sufriendo pérdida de brillantez y enrojecimiento durante el almacenamiento refrigerado, acortando así su vida de anaquel.

Por otra lado, las figuras 33 y 34 muestran la evolución de las mediciones instrumentales de luminosidad ( $L^*$ ) y ángulo *Hue* durante los 12 días de almacenamiento refrigerado de las hamburguesas de carne de cerdo cocinada.





El análisis de los resultados del parámetro de luminosidad de las hamburguesas cocinadas señala una ligera pérdida de brillantez para todas las muestras, pues los valores entre ellas presentaron una diferencia menor a 3 puntos que osciló desde 72.44 hasta 69.67 durante los 12 días de almacenamiento, presentándose diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las muestras durante los 3 primeros días de almacenamiento, donde las hamburguesas con aditivo presentaron una mayor luminosidad con respecto a las hamburguesas sin aditivo. Sin embargo, al final del período de almacenamiento (día 12) todas las hamburguesas con aditivo perdieron luminosidad de manera significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a las hamburguesas sin aditivo.



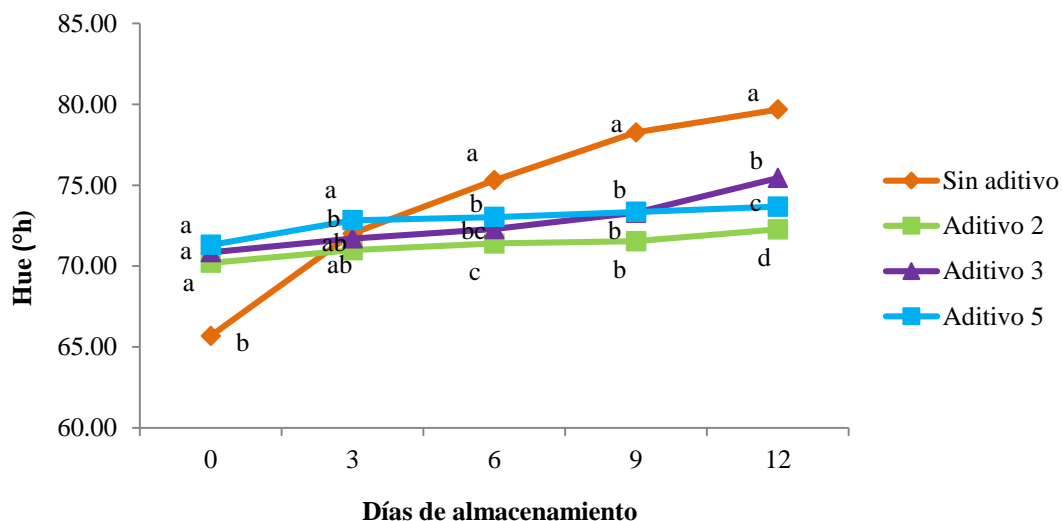
**Figura 32.** Efecto de los aditivos sobre la luminosidad o brillantez de las hamburguesas de carne de cerdo cocinada y almacenada a 4 °C durante 12 días.

Medias con superíndice distinto dentro de un mismo día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

Respecto a los valores obtenidos del ángulo *Hue* de las hamburguesas cocinadas, puede observarse que la adición de los aditivos estudiados tuvo un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a las hamburguesas sin aditivo, ya que los aditivos tenían un color naranja tenue con ligeros toques cafés como resultado de la extracción de pigmentos de las especias y la base utilizada. Los pigmentos se transfirieron probablemente a las hamburguesas durante su elaboración, provocando la modificación de su color e intensificándolo tras el proceso de cocción, ocasionando así una coloración café con ligeros toques dorados, o en otras palabras



una tonalidad tostada. Durante el día inicial de almacenamiento las hamburguesas sin aditivo presentaron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) una menor tonalidad café o tostada que las hamburguesas con aditivo, mientras que durante el 3 día de almacenamiento las hamburguesas sin aditivo presentaron igualdad de color con respecto a las hamburguesas con aditivo. Sin embargo, a partir del día 6 de almacenamiento las hamburguesas sin aditivo aumentaron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) sus valores de ángulo *Hue* presentando una tonalidad amarilla con toques verdosos con respecto a las hamburguesas con aditivo, mientras que las hamburguesas con aditivo logran proteger la coloración tostada a lo largo de los 12 días de almacenamiento, siendo las hamburguesas con aditivo #2 las que mejor conservaron la coloración tostada.



**Figura 33.** Efecto de los aditivos sobre el color de las hamburguesas de carne de cerdo cocinada y almacenada a 4 °C durante 12 días.

Medias con superíndice distinto dentro de un mismo día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

En resumen, las hamburguesas sin aditivo presentaron la mayor decoloración al aumentar sus valores del ángulo *Hue* a lo largo de los 12 días de almacenamiento y tomando una tonalidad amarilla, acortando así su vida de anaquel. Mientras que las hamburguesas con aditivo lograron conservar la coloración tostada de las hamburguesas cocinadas a lo largo de los 12 días de almacenamiento.



La decoloración que sufrieron las hamburguesas crudas se puede deber a la aparición de reacciones oxidativas de lípidos (Faustman *et al.*, 2010; Haak *et al.*, 2006; Estévez *et al.*, 2003) durante el almacenamiento refrigerado de la carne, lo que llevo a la conversión de la oximioglobina (responsable del color rojo brillante característico de carne fresca) (Ledward, 1991) en metamioglobina (responsable del color amarillo pálido). El proceso de decoloración se define típicamente por la disminución de la luminosidad y la tonalidad roja, con un aumento del tono amarillo (Faustman *et al.*, 2010). El incremento de la amarillez en particular, puede deberse a la acumulación de pigmentos de bases de *Schiff* a partir de complejos lípido-proteína como resultado del estrés oxidativo (Chelh *et al.*, 2007).

Durante el almacenamiento refrigerado, la acumulación de metamioglobina y la decoloración de la carne depende en gran medida de la presencia de sistemas reductores en la carne (Ledward, 1991) que actúen sobre la oxidación de lípidos (Faustman *et al.*, 2010; Estévez *et al.*, 2003). Son varios los autores que han relacionado la pérdida de enrojecimiento en carnes sometidas a almacenamiento refrigerado a la aparición de reacciones oxidativas (Yu *et al.*, 2010; Bekhit *et al.*, 2009; Haak *et al.*, 2009). Se conoce que los productos de oxidación de lípidos primarios tales como hidroxiperóxidos y otras especies de oxígeno reactivo oxidan el hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) de la oximioglobina a su forma férrica ( $Fe^{3+}$ ) presente en metamioglobina (Faustam *et al.*, 2010). Así mismo, existen estudios que también han destacado el papel de los productos de oxidación de lípidos secundarios, tales como aldehídos insaturados, sobre la formación de metamioglobina en carne fresca porcina (Suman *et al.*, 2006).

A pesar de que los aditivos lograron disminuir las reacciones oxidativas de lípidos (TBARS) tanto en hamburguesas crudas como cocinadas, no lograron inhibir la decoloración de la carne en hamburguesas crudas al no poder proteger a los hemopigmentos contra la oxidación. Esto se confirma con la no correlación existente entre color y oxidación de lípidos (TBARS) para hamburguesas crudas la cual fue de  $r=0.080$  ( $p=0.738$ ). Chen *et al.* (1999) reportaron tendencias similares a las descritas en el presente estudio sobre la decoloración de la carne de cerdo cruda.



Por otra parte, los aditivos si lograron inhibir la decoloración en hamburguesas cocinadas, presentando correlación entre color y oxidación de lípidos la cual fue de  $r=0.690$  ( $p=0.001$ ). Esto se puede deber a que el proceso de cocción intensifico el color tostado de las hamburguesas con aditivo, debido al color propio de estos (naranja tenue con ligeros toques cafés), provocando una menor percepción del cambio de tonalidad de tostado a amarillo claro. Así mismo, puede destacarse la defensa antioxidante de los aditivos los cuales pueden ser los responsables de proteger a los hemopigmentos contra los procesos oxidativos en las hamburguesas cocinadas.

Respecto al diferencial de color, en los cuadros 11 y 12 se muestra la diferencia numérica total de color ( $\Delta E$ ) entre las hamburguesas control (hamburguesas sin aditivo) y las hamburguesas tratadas (con aditivo #2, #3 y #5) de carne de cerdo cruda y cocinada respectivamente, durante los días 0, 3, 6, 9 y 12 de almacenamiento.

Según Francis y Clydesdale (1975) las modificaciones de color medidas instrumentalmente entre dos muestras de carne dadas se pueden considerar como cambios visuales notables cuando los valores de  $\Delta E$  son superiores a 2. De acuerdo, al diferencial total de color ( $\Delta E$ ) de las hamburguesas crudas se encontró una  $\Delta E$  mayor a 2 para las hamburguesas con aditivo #2 a partir del día 3 de almacenamiento y para las hamburguesas con aditivo #5 durante el día 12, siendo las hamburguesas con aditivo #2 las que presentaron el mayor  $\Delta E$ . Es decir, las hamburguesas con aditivo #2 sufrieron cambios de color durante el almacenamiento refrigerado el cual podría ser percibido por los consumidores. Estadísticamente se presentó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el  $\Delta E$  entre las hamburguesas tratadas dentro del día 9 y 12 de almacenamiento. Esto coincide con los resultados obtenidos de luminosidad ( $L^*$ ) y ángulo *Hue* de las hamburguesas crudas donde en el día 12 se presentó diferencia significativa entre las muestras, siendo las hamburguesas con aditivo #2 las que presentaron la mayor decoloración.



**Cuadro 11.** Diferencia total de color ( $\Delta E$ ) entre la muestra sin aditivo y las muestras tratadas en hamburguesas de carne de cerdo cruda y almacenada a 4 °C durante 12 días.

Muestras	Días				
	0	3	6	9	12
<b>Aditivo 2</b>	1.64 <sup>a</sup>	2.06 <sup>a</sup>	2.15 <sup>a</sup>	3.03 <sup>a</sup>	2.73 <sup>a</sup>
<b>Aditivo 3</b>	1.78 <sup>a</sup>	1.39 <sup>a</sup>	1.54 <sup>a</sup>	1.46 <sup>c</sup>	1.80 <sup>c</sup>
<b>Aditivo 5</b>	1.62 <sup>a</sup>	1.98 <sup>a</sup>	1.85 <sup>a</sup>	1.83 <sup>b</sup>	2.22 <sup>b</sup>

Medias con superíndice distinto dentro de un día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los aditivos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

En el caso de las hamburguesas cocinadas se encontró una  $\Delta E$  mayor a 2 para las hamburguesas con aditivo #2 en el día 12 de almacenamiento. Sin embargo, estadísticamente se presentó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el  $\Delta E$  entre las hamburguesas tratadas a partir del día 3 de almacenamiento, donde las hamburguesas con aditivo #2 presentaron el mayor diferencial de color durante los días 6, 9 y 12 de almacenamiento. Esto coincide con los resultados obtenidos del ángulo *Hue* de las hamburguesas cocinadas, donde a partir del día 6 de almacenamiento todas las hamburguesas con aditivo presentaron diferencia significativa con respecto a las hamburguesas control, siendo precisamente las hamburguesas con aditivo #2 las que presentaron la mayor diferencia con respecto a las hamburguesas sin aditivo. Es decir las hamburguesas con aditivo #2 lograron conservar el color tostado de las hamburguesas cocinadas a lo largo de los 12 días de almacenamiento, mientras que las hamburguesas sin aditivo comenzaron a aumentar sus valores a partir del día 3 de almacenamiento tomando tonalidades amarillentas.

**Cuadro 12.** Diferencia total de color ( $\Delta E$ ) entre la muestra sin aditivo y las muestras tratadas en hamburguesas de carne de cerdo cocinada y almacenada a 4 °C durante 12 días.

Muestras	Días				
	0	3	6	9	12
<b>Aditivo 2</b>	1.51 <sup>a</sup>	0.56 <sup>c</sup>	1.35 <sup>a</sup>	1.95 <sup>a</sup>	2.32 <sup>a</sup>
<b>Aditivo 3</b>	1.57 <sup>a</sup>	1.10 <sup>a</sup>	0.94 <sup>b</sup>	1.36 <sup>b</sup>	1.49 <sup>c</sup>
<b>Aditivo 5</b>	1.80 <sup>a</sup>	1.09 <sup>b</sup>	0.76 <sup>c</sup>	1.09 <sup>c</sup>	1.50 <sup>b</sup>

Medias con superíndice distinto dentro de un día de almacenamiento denotan diferencia significativa entre los aditivos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )



### 8.3.8. Análisis sensorial

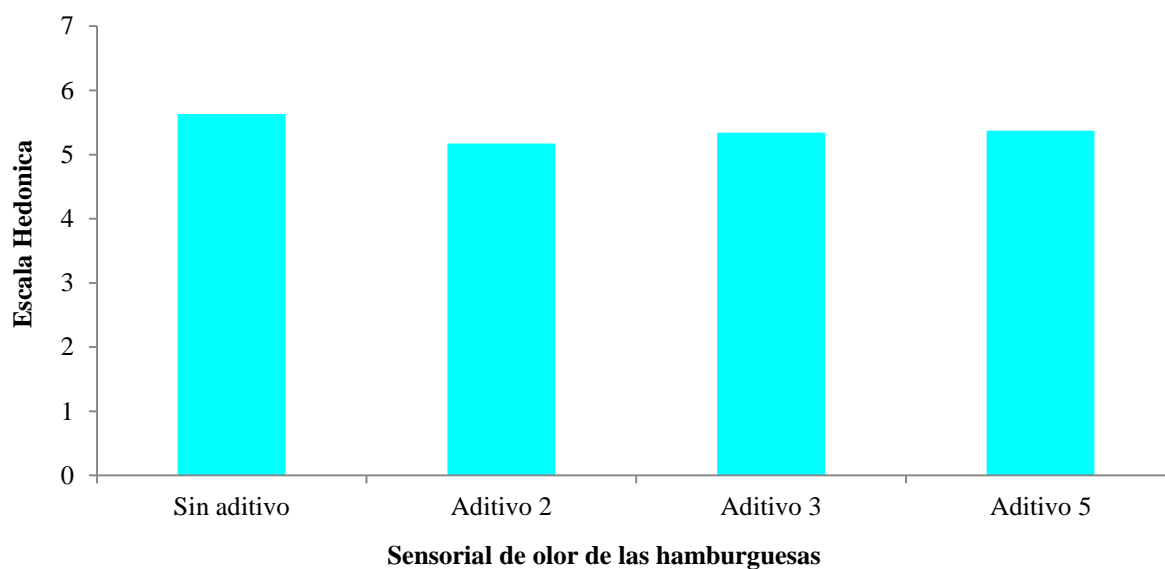
En las figuras 34, 35, 36 y 37 se muestran los resultados correspondientes a las evaluaciones sensoriales (atributos de olor, color, textura y sabor respectivamente) realizadas a las hamburguesas cocinadas, sin aditivo y con los distintos aditivos (#2, #3 y #5).

En relación a los atributos de olor y color, los resultados obtenidos no mostraron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos, es decir la aplicación de los aditivos no modificó perceptivamente ni el olor ni el color propio de una carne cocinada.

Referente al atributo de textura, se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, siendo las hamburguesas adicionadas con el aditivo #5, las que mostraron mayor aceptabilidad para dicho atributo e igualando la textura de las hamburguesas que no llevaban aditivo. Mientras que las hamburguesas que fueron adicionadas con el aditivo #2 fueron las que tuvieron menor aceptación entre los catadores.

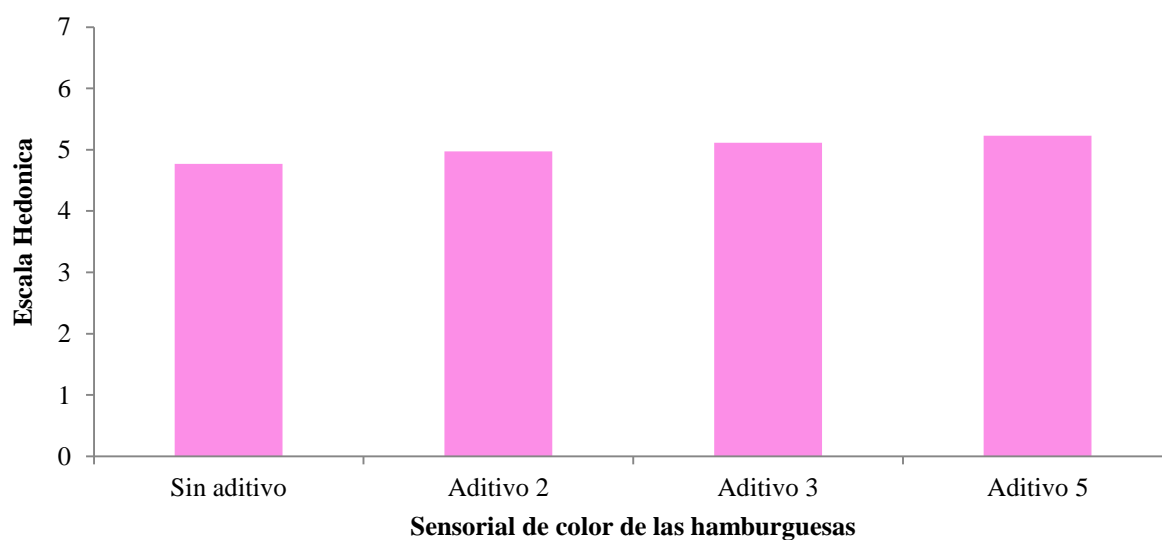
En la evaluación correspondiente al atributo de sabor, se presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las distintas fuentes de variación utilizadas en el diseño experimental, siendo las hamburguesas con aditivo #5 las que presentaron mayor preferencia entre los panelistas, superando a las hamburguesas sin aditivo, mientras que la de menor aceptación fueron las hamburguesas con aditivo #2.

En general, la adición de los tres aditivos a las hamburguesas, no tuvieron un efecto negativo en la preferencia de los catadores, ya que los resultados de los cuatro atributos (olor, color, textura y sabor) evaluados estuvieron en la escala de 4 a 6, que va desde “ni me gusta ni me disgusta” hasta “me gusta mucho”, destacando la preferencia por las hamburguesas con aditivo #5 entre los comensales.



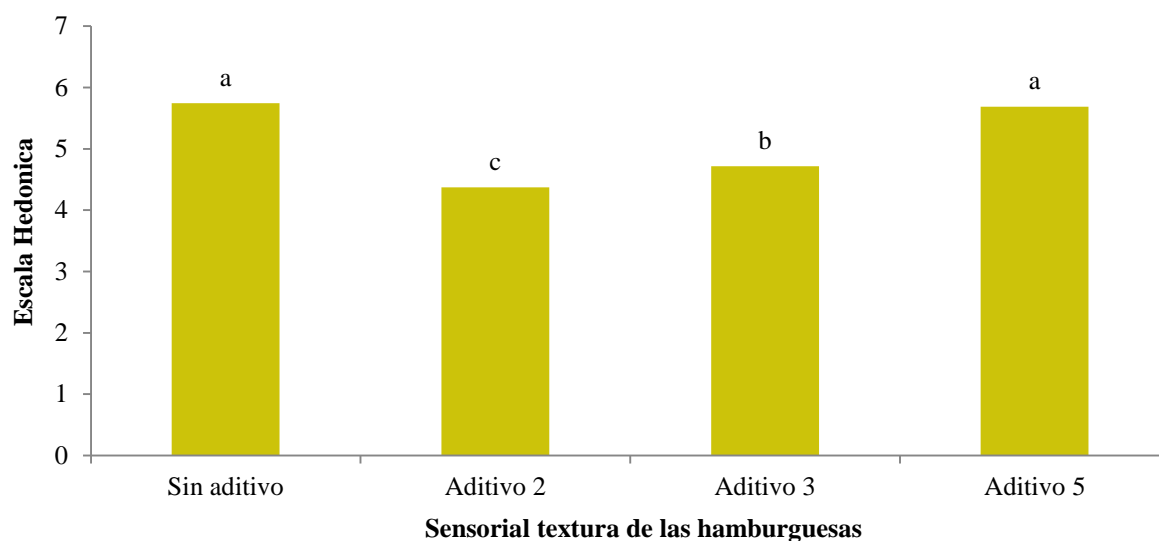
**Figura 34.** Efecto de los aditivos en la evaluación sensorial de olor de las hamburguesas cocinadas.

Medias sin superíndice denotan igualdad entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ).



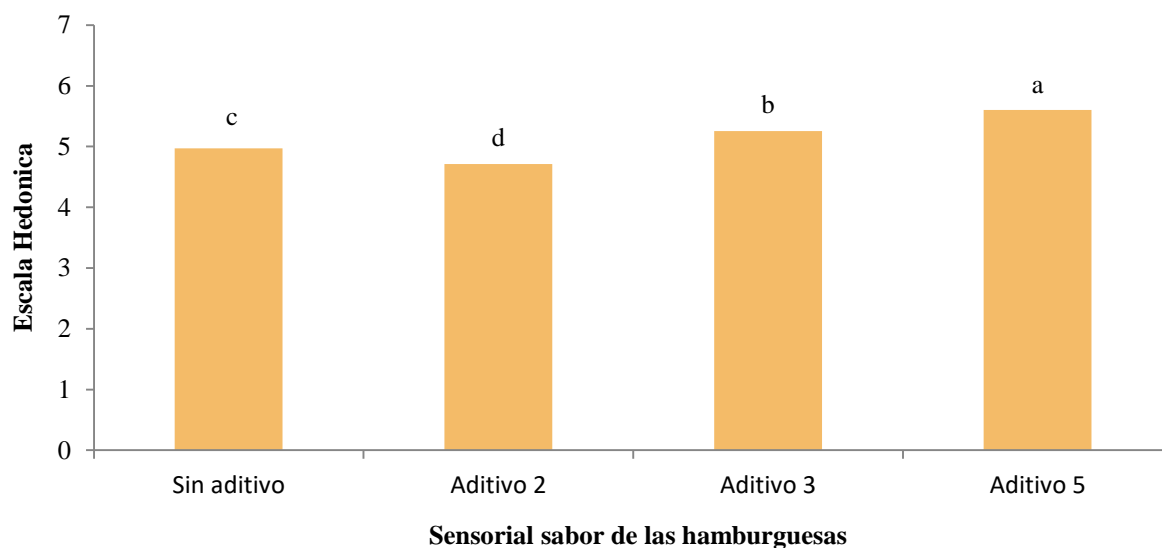
**Figura 35.** Efecto de los aditivos sobre la evaluación sensorial del color de las hamburguesas cocinadas.

Medias sin superíndice denotan igualdad entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ).



**Figura 36.** Efecto de los aditivos sobre la evaluación sensorial de textura de las hamburguesas cocinadas.

Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 37.** Efecto de los aditivos sobre la evaluación sensorial de sabor de las hamburguesas cocinadas.

Medias con superíndice distinto denotan diferencia significativa entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).





## IX. CONCLUSIONES

- ❖ La canela macerada en ron fue la especia culinaria que presentó la mayor actividad antioxidante.
- ❖ Las tres binas que presentaron la mayor actividad antioxidante fueron canela-clavo, canela-hierbas de olor y canela-orégano.
- ❖ La bina canela-clavo fue la que presentó la mayor capacidad antioxidante, quelante y contenido de CFT.
- ❖ Ninguno de los cinco aditivos desarrollados logró inhibir la formación de acrilamida en papas fritas “tipo a la francesa”.
- ❖ El aditivo #5 es una fuente potencial de actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* O157:H7 y puede ser un aditivo natural para extender el tiempo de conservación de productos cárnicos crudos refrigerados.
- ❖ El efecto inhibitor de los aditivos #2 y #3 sobre la oxidación lipídica en hamburguesas de carne de cerdo cruda y los aditivos #2, #3 y #5 en hamburguesas cocinadas, almacenadas en refrigeración, se puede atribuir a sus compuestos fenólicos que mostraron actividad antioxidante y quelante.
- ❖ La aplicación de los aditivos #2, #3 y #5 tanto en hamburguesas de carne de cerdo cruda y cocinada no inhiben la oxidación de proteínas. Sin embargo, los tres aditivos si logran proteger la decoloración de la carne de cerdo cocinada.
- ❖ La inclusión de los aditivos #2, #3 y #5 no altera la aceptabilidad organoléptica de las hamburguesas de carne de cerdo cocinada.



## X. RECOMENDACIONES

- ❖ Variar la concentración y forma de presentación (polvo) de los cinco aditivos para evaluar si presentan actividad inhibitoria frente a la formación de acrilamida en papas fritas.
- ❖ Determinar la concentración de asparagina en las papas, la cual forma parte de los reactantes principales en la formación de acrilamida.
- ❖ Realizar un perfil de los compuestos presentes en el aditivo #5 para determinar cuáles son los principales responsables de la actividad bacteriostática presentada contra *Escherichia coli* O157:H7 en hamburguesas crudas de carne de cerdo.
- ❖ Variar la concentración de los ingredientes presentes en los aditivos #2 y #3 para evaluar si presentan actividad bacteriostática contra *Escherichia coli* O157:H7 en hamburguesas crudas de carne de cerdo.
- ❖ Realizar un perfil de los compuestos fenólicos presentes en los aditivos #2, #3 y #5 para determinar cuáles son los principales compuestos bioactivos responsables de la inhibición de la oxidación lipídica en hamburguesas crudas y cocinadas de carne de cerdo.
- ❖ Variar la concentración de los ingredientes en los aditivos #2, #3 y #5 para evaluar si presentan actividad inhibitoria frente a la oxidación proteica.
- ❖ Probar la actividad bacteriostática y antioxidante de los aditivos #2, #3 y #5 en otras clases de carne.



## XI. LITERATURA CITADA

- Aboaba, O. and Efuwape, B. M. (2001). Antibacterial Properties of Some Nigerian Species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 13: 183-188.
- Aguirrezábal, M. M., Mateo, J., Domínguez, M. C. and Zumalacárregui, J. M. (2000). Garlic was as effective as the mixture of additives in inhibiting lipid oxidation. *Meat Science*, 54: 77-81.
- Ahn, J., Grün, I. U. and Mustapha, A. (2007). Effects of plant extracts on microbial growth, color change and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*, 24 (1): 7-14.
- Alais, C. y Linden, G. (1990). Manual de bioquímica de los alimentos. Masson. Barcelona.
- Amadori, M. (1925). Products of condensation between glucose and p-phenetidine. *Atti de lla Accademia Nazionale dei Lincei*, 2: 337-345.
- Ames, J. M. (1990). Control of the *Maillard* reaction in food systems. *Trends in Food Science & Technology*, 1: 150-154.
- Amrita, V., Sonal, D. and Shalini, R. (2009). Antibacterial Effect of Herbs and Spices Extract on *Escherichia coli*. *Electronic Journal of Biology*, 5 (2): 40-44.
- Andevari, G. T. and Rezaei, M. (2011). Effect of gelatin coating incorporated with cinnamon oil on the quality of fresh rainbow trout in cold storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 46 (11): 2305-2311.
- Andriot, I., Quére, J. L. and Guichard, E. (2004). Interactions between coffee melanoidins and flavor compounds: impact of freeze-drying (method and time) and roasting degree of coffee on melanoidins retention capacity. *Food Chemistry*, 85: 289-294.



- ANIAME (Asociación Nacional de Industriales de Aceites y Mantecas Comestibles, A.C.). (2009). Freír, los ácidos grasos y la salud. *Revista ANIAME*, 64 (13): 14, 15 y 23.
- Anzaldúa-Morales, A. (1994). La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y la Práctica. Acribia. Zaragoza, España.
- Armenteros, M., Morcuende, D., Ventanas, J. and Estévez, M. (2016). The application of natural antioxidants via brine injection protects Iberian cooked hams against lipid and protein oxidation. *Meat Science*, 116: 253-259.
- Arribas-Lorenzo, G. (2013). Análisis, inhibición e ingesta de nuevos contaminantes químicos de procesado en alimentos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas, 44-62 p.
- Ashoor, S. H. and Zent, J. B. (1984). The *Maillard* browning of common amino acids and sugars. *Journal of Food Science*, 49: 1206-1207.
- Askun, T., Gulendam, T., Fatih, S. and Mustafa, A. (2009). In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *Food Chemistry*, 116: 289-294.
- Badui-Dergal, S. (2006). Química de los alimentos. Capítulo 9: Aditivos. Cuarta edición. Editorial Pearson Addison Wesley, 507-543 p.
- Badui-Dergal, S. y Valdés-Martínez, S. E. (2006). Química de los alimentos. Capítulo 2: Hidratos de carbono. Cuarta edición. Editorial Pearson Addison Wesley, 29-109 p.
- Bamoniri, A., Ebrahimabadi, A. H., Mazoochi, A., Behpour, M., Jookar Kashi, F. and Batooli, H. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Semenovia tragioides* Boiss from Iran. *Food Chemistry*, 112: 553-558.



- Baisier, W. M. and Labuza, T. P. (1992). *Maillard* browning kinetics in a liquid model system. *Journal Agriculture of Food Chemistry*, 40: 707-713.
- Bartkiene, E., Jakobsonė, I., Pugajeva, I., Bartkevics, V., Vidmantienė, D. and Juodeikiene, G. (2015). Influence of the addition of *Helianthus tuberosus* L. fermented with different lactobacilli on acrylamide content in biscuits. *Journal of Food Science and Technology*, 50: 431-439.
- Bassama, J., Brat, P., Bohuon, P., Boulanger, R. and Gunata, Z. (2010). Study of acrylamide mitigation in model system: Effect of pure phenolic compounds. *Food Chemistry*, 123: 558-562.
- Bekhit, A. E. D., Geesink, G. H., Ilian, M. A., Morton, J. D. and Bickerstaffe, R. (2009). The effects of natural antioxidants on oxidative processes and metmyoglobin reducing activity in beef patties. *Food Chemistry*, 81: 175-187.
- Bello-Gil, D., Carrera-Bocourt, E. and Díaz-Maqueira, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA (Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar)*, 2: 45-50.
- Bendini, A., Toschi, T. G. and Lercker, G. (2002). Antioxidant activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) leaves. *Italian Journal of Food Science*, 14 (1): 17-24.
- Benítez, W. y Sánchez, M. (2000). Aspectos generales de la producción porcina tradicional. FAO, 2000.
- Berlett, B.S. and Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 20313-20316.



- Biedermann, M., Noti, A., Biedermann-Bremm, S., Noti, A., Grob, K., Egli, P. and Mandli, H. (2002). Experiments on acrylamide formation and possibilities to decrease the potential of acrylamide formation in potatoes. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93: 668-687.
- Bitar, A., Ghaddar, T., Malek, A., Haddad, T. and Toufeili, I. (2008). Sensory thresholds of selected phenolic constituents from thyme and their antioxidant potential in sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85 (7): 641.
- Bothelho, M., Nogueira, N. A., Bastos, G. M., Fonseca, S. G., Lemos, T. L. and Matos, F. J. (2008). Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40 (3): 349-356.
- Botsoglou, N. A., Yannakopoulos, A. L., Fletouris, D. J., Tserveni-Goussi, A. S. and Fortomaris, P. D. (1997). Effect of dietary thyme on the oxidative stability of egg yolk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3711-3716.
- Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 221-247.
- Brewer, M. S., Zhu, L. G., Bidner, B., Meisinger, D. J. and McKeith, F. K. (2001). Measuring pork color: Effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. *Meat Science*, 57: 169-176.
- Brul, S. and Coote, P. (1999). Preservative agents in foods modes of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 1-17.



- Buchanan, R. L. and Doyle, M. P. (1997). Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Technology*, 51(10): 69-76.
- Buckley, D. J., Morrisey, P. A. and Gray, J. I. (1995). Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *Journal of Animal Science*, 73: 3122-3130.
- Budryn, G., Z., Elewicz, D., Nebesny, E., Oracz, J. and Krysiak, W. (2013). Influence of addition of green tea and green coffee extracts on the properties of fine yeast pastry fried products. *Food Research International*, 50: 149-160.
- Buera, M. F., Chirife, J., Resnik, S.L. and Lozano, R. D. (1987). Nonenzymatic browning liquid model systems of high water activity: Kinetics of color changes due to caramelization of various single sugars. *Journal of Food Science*, 52: 1059.
- Cabrera-Díaz, E. y Pérez-Montaña, J. L. (2002). Agentes patógenos transmitidos por alimentos. Capítulo 7: *Escherichia coli*. Ed. Universidad de Guadalajara. Vol. 1: 175-178.
- Cai, Y., Zhang, Z., Jiang, S., Yu, M., Huang, C., Qiu, R. and Zhou, H. (2014). Chlorogenic acid increased acrylamide formation through promotion of HMF formation and 3-aminopropionamide deamination. *Journal of Hazardous Materials*, 268: 1-5.
- Cao, G. and Prior, R. (1999) Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in Biological samples. Oxidants and Antioxidants. *Methods in Enzymol*, 299: 50-62.
- Cappelletti, M., Ferrentino, G. and Spilimbergo, S., (2015). High pressure carbon dioxide on pork raw meat: Inactivation of mesophilic bacteria and effects on colour properties. *Journal of Food Engineering*, 156: 55-58.



- Carrasco, E. U., Villarroel, M. y Cevallos, L. C. (2002). Efecto de recubrimientos comestibles sobre la calidad sensorial de pimentones verdes (*Capsicum annuum* L.) durante el almacenamiento. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52: 84-90.
- Cascone, A. (2005). Study and prevention of lipid oxidation in meat. Tesis Doctoral. Nápoles, Italia. Universidad de Nápoles. 11 p.
- Castañeda, C. B., Ramos, LL. E. e Ibañez, V. L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*, 8 (1): 56-72.
- Castillo-Juaárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. and Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122:402-405.
- Castro-Rosas, J. and Escartín, E. F. (2000). Survival and growth of *Vibrio cholera* O1, *Salmonella typhi*, and *Escherichia coli* O157:H7 in alfalfa sprouts. *Journal of Food Science*, 65 (1): 162-165.
- Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A. M. and Keller, J. N. (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773: 93-104.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*, 21 (6): 501-506.





- Chao, C. Y. and Yin, M. C. (2009). Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Food borne Pathogens and Disease*, 6: 201-206.
- Chelh, I., Gatellier, P. and Sante-Lhoutellier, V. (2007). Characterisation of fluorescent Schiff bases formed during oxidation of pig myofibrils. *Meat Science*, 76: 210–215.
- Chen, H. and Gu, Z. (2014). Effect of Ascorbic Acid on the Properties of Ammonia Caramel Colorant Additives and Acrylamide Formation. *Journal of Food Science*, 79: C1678-C1682.
- Chen, X., Jo, C., Lee, J. I. and Ahn, D. U. (1999). Lipid oxidation, volatiles and colour changes of irradiated pork patties as affected by antioxidants. *Journal of Food Science*, 64: 16-19.
- Chen, Z. (2008). Research of antioxidative capacity in essential oils of plants. *China Cond*, 11: 40-43.
- Cheng, K., Shi, J., Ou, S., Wang, M. and Jiang, Y. (2010). Effects of fruit extracts on the formation of acrylamide in model reactions and fried potato crisps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 309-312.
- Cheong, T. K., Hwang, E. and Hyong, L. (2005). Reducing acrylamide in fried snack products by adding amino acids. *Journal of Food Science*, 70: 354-357.
- CIE (Comission Internationale de l'Éclairage). (1978). Recommendations on uniform color spaces-color equations, psychometric color terms. Supp nr 2 to CIE Publ nr 15 (E-1.3.L) 1971 (9TC-1-3), Paris, France: CIE.



- Ciesarová, Z., Suhaj, M. and Horváthová, J. (2008). Correlation between acrylamide contents and antioxidant capacities of spice extracts in a model potato matrix. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47: 1-5.
- Cifuni, G. F., Napolitano, F., Riviezzi, A. M., Braghieri, A. and Girolami, A. (2004). Fatty acid profile, cholesterol content and tenderness of meat from Podolian young bulls. *Meat Science*, 67: 289-29.
- Codex Alimentarius. (2016). Norma general para los aditivos alimentarios.
- Constantinou, C. and Koutsidis, G. (2016). Investigations on the effect of antioxidant type and concentration and model system matrix on acrylamide formation in model *Maillard* reaction systems. *Food Chemistry*, 197: 769-775.
- Consumer information from USDA. (1997). *Food Safety and Inspection Service*, Food Safety and Consumer Education Office.
- Contini, C., Alvarez, R., O'Sullivan, M., Dowling, D. P., Gargan, S. O. and Monahan, F. J. (2014). Effect of an active packaging with citrus extract on lipid oxidation and sensory quality of cooked turkey meat. *Meat Science*, 96: 1171-1176.
- Contreras, J. y García, M. (2005). *Alimentación y cultura, perspectivas antropológicas*. Ariel, España. 21 p.
- CPM (Confederación de Porcicultores Mexicanos). (2009). <http://www.porcimex.org/>
- Cremer, D. R. and Eichner, k. (2000). The reaction Kinetics for the formation of Strecker aldehydes in low moisture model systems and plant powders. *Food Chemistry*. 71(1): 37-43.



- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M. and Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* (American Society for Microbiology), 26 (4): 822-880.
- Cruz, S., Gómez, A., García, V., Álvarez, L., Cáceres, A., Morales, J., Cobar, O., Samayoa, C. y Orozco, I. G. (2006). Caracterización de aceites esenciales y extractos de ocho especies mesoamericanas de Piperáceas y evaluación de la actividad biocida para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos Guatemala.
- Davis, K. E., Prasad, C., Vijayagopal, P., Juma, S., Adams-Huet, B. and Imrhan, V. (2015). Contribution of dietary advanced glycation end products (AGE) to circulating AGE: role of dietary fat. *British Journal of Nutrition*, 114: 1797-1806.
- De Azevedo Gomes, H., Da Silva, E. N., Lopes Do Nascimento, M. R. and Fukuma, H. T. (2003). Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat. *Food Chemistry*, 80: 433-437.
- De Vleeschouwer, K., Van der Plancken, I., Loey, A. V. and Hendrickx, M. E. (2006). Impact of pH on the kinetics of acrylamide formation/elimination reactions in model systems. *Journal Agriculture of Food Chemistry*, 54: 7847-7855.
- Del Río D., Stewart, A. J. and Pellegrini, N. (2005). Una revisión de estudios recientes en malondialdehyde como la molécula tóxica y marcador biológico de la tensión oxidativa. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15: 316-328.



- Descalzo, A. M., Insani, E. M., Biolatto, A., Sancho, A. M., García, P. T., Pensel, N. A. and Josifovich, J. A. (2005). Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Science*, 70: 35-44.
- Dewhurst, R. J., Scollan, N. D., Lee, M. R. F., Ougham, H. J. and Humphreys, M. O. (2003). Forage breeding and management to increase the beneficial fatty acid content of ruminant products. *Journal the Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 329-336.
- Diario Oficial de la Unión Europea. (2013). Recomendaciones de la comisión relativa a la investigación de los niveles de acrilamida en los alimentos. Bruselas, 8 de noviembre del 2013, L 301/17.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). (1999). Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios". 15 de diciembre, México, D.F.
- Eja, M. E., Asikong, B. E., Abriba, C., Arikpo, G. E., Anwan, E. E. and Enyi-Idoh, K. H. (2007). A comparative assessment of the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum*) and antibiotics on diarrheagenic organisms. *Southeast Asian Journal of Trop Medicine Public Health*, 38: 343-348.
- El-Ghorab, H., Nauman, M., Anjum, F. M., Hussain, S. and Nadeem, M. (2010). Comparative study on chemical composition and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) and cumin (*Cuminum cyminum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (14): 8231-8237.
- Ertürk, O. (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biología Bratislava*, 61: 275-278.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat system: A review. *Meat Science*, 89: 259-279.



- Estévez, M. and Heinonen, M. (2010). Effect of phenolic compounds on the formation of  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes from myofibrillar proteins oxidized by copper, iron and myoglobin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 4448-4455.
- Estévez, M., Ollilainen, V. and Heinonen, M. (2009). Analysis of protein oxidation markers  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes in food proteins by using LC-ESI-Multi-Stage Tandem MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3901-3910.
- Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R. and Heinonen, M. (2008). Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Science*, 80 (4): 1290-1296.
- Estévez, M. and Cava, R. (2006). Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different types of frankfurters. *Meat Science*, 72: 348-355.
- Estévez, M., Ventanas, S. and Cava, R. (2005). Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: effect on colour and texture deterioration. *Journal of Food Science*, 70: 427-432.
- Estévez, M., Morcuende, D. and Cava, R. (2003). Oxidative and colour changes in meat from three lines of free-range reared iberian pigs slaughtered at 90 kg live weight and from industrial pig during refrigerated storage. *Meat Science*, 65: 1139-1146.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2012). Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA Journal*, 10 (10): 2938.



- Farag, S. R., Daw, Z. Y. and Abo-Raya, S. H. (1989). Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *Journal of Food Science*, 54 (1): 74-76.
- Farvin, K. H. S. and Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138:1670-1681.
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R. and Suman, S. P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: mechanistic bases and control. *Meat Science*, 86: 86-94.
- FDA (Food and Drug Administration). (2013). Draft guidance for industry: acrylamide in foods – Food and drug administration. URL<<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/UCM374534.pdf>>.
- Fernández, J., Pérez-Álvarez, J. A. and Fernández-López, J. A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59: 345-353.
- FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura). (2012). Panorama Agroalimentario Carne de Porcino. Dirección de Investigación Económica y Sectorial.
- Francis, F. J. and Clydesdale, F. M. (1975). Food Colorimetry. Theory and Applications. AVI Publishing, Westport, CT.
- Friedman, M. (2003). Chemistry, biochemistry and safety of acrylamide: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4504-4526.
- Friedman, M. (1996). Food Browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 631-653.



- Fukuda, Y., Isobe, M., Nagata, M., Osawa, T. and Namiki, M. (1986). Acidic transformation of sesamol, the sesame –oil constituent, into an antioxidant bisepoxyignan, sesaminol. *Heterocycles*, 24: 923-926.
- Gandemer G. (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, 62: 309-321.
- Ganhão, R., Estévez, M. and Morcuende, D. (2011). Suitability of the TBA method for assessing lipid oxidation in meat system with added phenolic-rich material. *Food Chemistry*, 126: 772-778.
- Ganhão, R., Morcuende, D. and Estévez, M. (2010a). Protein oxidation in emulsified cooked Burger patties with added fruit extracts: Influence on color and texture deterioration during chill storage. *Meat Science*, 85: 402-409.
- Ganhão, R., Estévez, M., Kylli, P., Heinonen, M. and Morcuende, D. (2010b). Characterization of selected wild Mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 8854-8861.
- García-Guardado, A. (2011). Inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 mediante la aplicación de altas presiones en jugo de maracuyá. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Tepic., 64 p.
- García-Tejeda, Y. V., Zamudio-Flores, P. B., Bello-Pérez, L. A., Romero-Bastida, C. A. y Solorza-Feria, J. (2011). Oxidación del almidón nativo de plátano para su uso potencia en la fabricación de materiales de empaque biodegradables: Caracterización física, química, térmica y morfológica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 12 (3): 125-135.



- Gharibi, S. H., Tabatabaei, B. E. S., Saeidi, G. H. and Goli, S. A. H. (2013). Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of three novel Iranian endemic *Achillea* species. *Industrial Crops and Products*, 50: 154-158.
- Ghiselli, A., Natella, F., Guidi, A., Montanari, I., Fantozzi, P. and Scaccini, C. (2000). Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11 (2): 76-80.
- Gibis, M. and Weiss, J. (2012). Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seed and rosemary extract in marinades on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties. *Food Chemistry*, 134: 766-774.
- Gibis, M. (2007). Effects of oil marinades with garlic, onion, and lemon juice on the formation of heterocyclic aromatic amines in fried beef patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (25): 10240-10247.
- Gil, A. (2010). Preelaboración y conservación de los alimentos. Akal, España., 74 p.
- Gobert, M., Gruffat, D., Habeanu, M., Parafita, E., Bauchart, D. and Durand, D. (2010). Plant extracts combined with vitamin E in PUFA-rich diets of cull cows protect processed beef against lipid oxidation. *Meat Science*, 85 (4): 676-83.
- Gökmen, V., Morales, F. J., Atac, B., Serpen, A. and Arribas-Lorenzo, G. (2009). Multiple-stage extraction strategy for the determination of acrylamide in foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 142-147.
- Gökmen, V. and Senyuva, H. Z. (2007). Acrylamide formation is prevented by divalent cations during Mailard reaction. *Food Chemistry*, 103: 196-203.





- Goldberg, S., Cai, W., Peppas, M., Dardaine, V., Baliga, B., Uribarri, J. and Vlassara, H. (2004). Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 104: 1287-1291.
- Gorinstein, M., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Najman, K., Drzewiecki, J., Martincova, O., Katrich, E. and Trakhtenberg, S. (2008). Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (12): 4418-4426.
- Guicin, I., Buyukokuroglu, M. E. and Kufrevioglu, O. I. (2003). Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 34: 278-281.
- Gugliucci, A. (2000). Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Revista Médica del Uruguay*, 16 (1): 58-75.
- Gul, K., Singh, P. and Wani, A. A. (2016). Chapter 4 - Safety of Meat and Poultry. *Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods*. Academic Press, San Diego, 63–77 p.
- Haak, L., Raes, K. and De Smet, S. (2009). Effect of plant phenolic, tocopherol and ascorbic acid on oxidative stability of pork patties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89: 1360-1365.
- Haak, L., Raes, K., Van Byck, S. and De Smet, S. (2008). Effect of dietary Rosemary and  $\alpha$ -tocopheryl acetate on the oxidative stability of raw and cooked pork following oxidized linseed oil administration. *Meat Science*, 78: 239-247.
- Haak, L., Raes, K., Smet, K., Claeys, E. Paelinck, H. and De Smet, S. (2006). Effect of dietary antioxidant and fatty acid supply on the oxidative stability of fresh and cooked pork. *Meats Science*, 74: 476-486.



- Hamzalioglu, A., Mogol, B., Lumaga, R., Fogliano, V. and Gökmen, V. (2013). Role of curcumin in the conversion of asparagine into acrylamide during heating. *Amino Acids*, 44 (6): 1419-1426.
- Hamzalioglu, A. and Gökmen, V. (2012). Role of bioactive carbonyl compounds on the conversion of asparagine into acrylamide during heating. *European Food Research and Technology*, 235 (6): 1093-1099.
- Hatzidimitrioua, E., Nenadisa, N. and Tsimidou, M. Z. (2007). Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry*, 105 (4): 1504–1511.
- Heinonen, M. (2007). Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51: 684-691.
- Hernández-Hernández, E., Ponce–Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M. E. and Guerrero-Legarreta, I. (2009). Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, 81 (2): 410-417.
- Hinneburg, I., Dorman, D. and Hiltunen R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 122-129.
- Higginbotham, K. L. A., Burris, K. P., Zivanovic, S., Davidson, P. M. and Stewart, C. N. (2014). Aqueous extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces as an antimicrobial rinse on hot dogs against *Listeria monocytogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 40: 274-277.
- Hirasa, K. y Takemasa, M. (2002). Ciencia y tecnología de las especias. Primera edición en lengua española. Editorial Acribia, 2-3 p; 175-217p.



- Hodge, J. E. (1953). Dehydrated foods-chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1: 928-943.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. and Prior, R. (2002) High-throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4437-4444.
- Huhtanen, C. N. (1980). Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alcohols. *Journal of Food Protection*, 43: 195-197.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P. and Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin, and resveratrol in red grapes: content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (8): 589-598.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1994). Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risk to Humans, International Agency for Research on Cancer. Lyon, 389 p.
- Ibrahim, H. M., Abou-Arab, A. A. and Abu, S. F. M. (2010). Addition of some natural plant extracts and their effects on Lamb patties quality. *Journal of Food Technology*, 8 (3): 134-142.
- Ibrahim, S. A., Yang, H. and Seo, C. W. (2008). Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Chemistry*, 109: 137-143.
- Insani, E. M., Eyherabide, A., Grigioni, G., Sancho, A. M., Pensel, N. A. and Descalzo, A. M. (2008). Oxidative stability and its relationship with natural antioxidants during refrigerated display of beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79: 444-452.



- Janoszka, B. (2010a). Heterocyclic amines and azaarenes in pan-fried meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic. *Food Chemistry*, 120: 463-473.
- Janoszka, B. (2010b). 7-Ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol in pork meat and its gravy thermally treated without additives and in the presence of onion and garlic. *Meat Science*, 86: 976-984.
- Jay, M. J. (2002). Microbiología moderna de los alimentos. Cuarta edición. Editorial Acribia, 39-41 p.
- Jayathilakan, K., Sharma, G. K., Radhakrishna, K. and Bawa, A. S. (2007). Antioxidant potential of synthetic and natural antioxidants and its effect on warmed-over-flavour in different species of meat. *Food Chemistry*, 105: 908-916.
- Jiménez-Castillo, B., Morales-Nava, F., Gómez-Guillén, M. C. y Montero-García M. P. (2012). Patente No. ES2378101A1. Título: procedimiento de obtención de una cobertura alimentaria para la inhibición de contaminantes químicos del procesado. Oficina Española de patentes y marcas. España.
- Jin, C., Wu, X. and Zhang, Y. (2013). Relationship between antioxidants and acrylamide formation: A review. *Food Research International*, 51 (2): 611-620.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A. and Schmidt, E. (2006). Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (17): 6303-6307.
- Jo, C., Son, J. H., Son, C. B. and Byun, M. W. (2003). Functional properties of raw and cooked pork patties with added irradiated, freeze-dried green tea leaf extract powder during storage at 4 °C. *Meat Science*, 64: 13-17.



- Joo, S. T., Kauffman, R. G., Kim, B. C. and Kim, C. J. (1995). The relationship between color and water holding capacity in postrigor porcine Longissimus muscle. *Journal of Muscle Foods*, 6: 211-226.
- Juliani, H. R., Welch, C. R., Wu, Q., Diouf, B., Malainy, D. and Simon, J. E. (2009) Chemistry and Quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for Developing the Natural-Product Industry in Senegal. *Journal of Food Science*, 74 (2): S113-S121.
- Jun, W. J., Han, B. K., Yu, K. W., Kim, M. S., Chang, I. S., Kim, H. Y. and Cho, H. C. (2001). Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. *Food Chemistry*, 75 (4): 439-444.
- Jung, M. Y., Choi, D. S., and Ju, J. W. (2003). A novel technique for limitation of acrylamide formation in fried and baked corn chips and in French fries. *Journal of Food Science*, 68: 1287-1290.
- Kader, A. A. (1992). Postharvest Technology of Horticultural Crops. University of California. 296 pp.
- Kaefer, M. C. and Milner, J. A. (2008). The role of herbs and spices in cancer prevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19 (6): 347-361.
- Kalita, D., Holm, G. D. and Jayanty, S. S. (2013). Role of polyphenols in acrylamide formation in the fried products of potato tubers with colored flesh. *Food Research International*, 54: 753-759.
- Kanatt, S. R., Chander, R. and Sharma, A. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *International Journal of Food Science and Technology*, 45 (2): 216-222.



- Karre, L., Lopez, K. and Getty, K. J. (2013). Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*, 94: 220-227.
- Kchaou, W., Abbès, F., Mansour, R. B., Blecker, C., Attia, H. and Besbes, S. (2016). Phenolic profile, antibacterial and cytotoxic properties of second grade date extract from Tunisian cultivars (*Phoenix dactylifera* L.). *Food Chemistry*, 194: 1048-1055.
- Kivilompolo, M. and Hyotylainen, T. (2007). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1145: 155-164.
- Koschinski, T., He, C., Mitsuhasshi, T., Bucala, L. C., Buenting, C., Heitman, K. and Vlassara, H. (1997). Orally absorbed reactive Glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy Science*, 94: 6474-6479.
- Kossah, R., Zhang, H. and Chen, W. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit extract. *Food Control*, 22: 128-132.
- Kotsiou, K., Tasioula-Margari, M., Capuano, E. and Fogliano, V. (2011). Effect of standard phenolic compounds and olive oil phenolic extracts on acrylamide formation in an emulsion system. *Food Chemistry*, 124: 242-247.
- Kotsiou, K., Tasioula-Margari, M., Kukurova, K. and Casanova, Z. (2010). Impact of oregano and virgin olive oil phenolic compounds on acrylamide content in a model system and fresh potatoes. *Food Chemistry*, 123: 1149-1155.
- Kumaran, A. and Karunakaran, R. J. (2007). In vitro antioxidant activities of metanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT Food Science Technology*, 40:344-352.



- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., García-Padilla, M. C. and Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antiocianicos. *Revista Brasileira de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 24 (4): 691-693.
- Labuza, T. F. and Schmidl, M. K. (1986). Advances in the control of browning reactions in foods, in *Role of Chemistry in the Quality of Processed Food*, Ed. O. R. Fennema, W. H. Chang and C. Y. Lii. Food and Nutrition Press, Inc. Westport, Conn.
- Lauková, L. (2011). Using natural and novel antimicrobials to improve the safety and shelf-life stability of processed meat products, in: *Processed Meats*, Woodhead Publishing Series in Food Science, *Technology and Nutrition*, 299-330 p.
- Lawrie, R. A. (1998). *Ciencia de la Carne*. Tercera edición. Editorial Acribia, 153-155 p.
- Lea, C. H. and Hannan, R. S. (1949). Studies of the reaction between proteins and reducing sugars in the dry state. I. The effects of activity of water, of pH, and of temperature on the primary reaction between casein and glucose. *Biochemical and Biophysical Acta*, 3: 313-325.
- Ledward, D. A. (1991). Letter to Editor: Meat color stability. *Journal of Food Science*. 56. vii.
- Leite de Souza, E., Guerr, N. B., Stamford, T. L. M. and Lima, E. O. (2006). Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Revista Brasileira de Farmácia*, 87: 22-25.
- Li, D., Chen, Y., Zhang, Y., Lu, B., Jin, C. and Wu, X. (2012). Study on mitigation of acrylamide formation in cookies by 5 antioxidants. *Journal of Food Science*, 77: C1144-C1149.



- Liang, R. J., Shi, S. D. and Ma, Y. J. (2010). Analysis of volatile oil composition of the peppers from different production areas. *Medicinal Chemistry Research*, 19 (2): 157-165.
- Liu, H., Wang, C., Qi, X., Zou, J. and sun, Z. (2018). Antiglycation and antioxidants activities of mogroside extract from *Siraitia grosvenorii* (Swingle) fruits. *Journal Food Science and Technology*, 55 (5): 1880-1888.
- Liu, Y., Wang, P., Chen, F., Yuan, Y., Zhu, Y., Yan, H. and Hu, X. (2015). Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination. *Food Chemistry*, 186: 46-53.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*. 134: 3479-3485.
- Lund, M. N., Christensen, M., Fregil, L. Hviid, M. S. and Skibsted, L. H. (2008). Effect of high-oxygen atmosphere packaging on mechanical properties of single muscle fibres from bovine and porcine longissimus dorsi. *European Food Research and Technology*, 227: 1323-1328.
- Lund, M. N., Hviid, M. S. and Skibsted, L. H. (2007). The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Science*, 76: 226-233.
- Lv, J., Huang, H., Yu, L., Whent, M., Niu, Y., Shi, H., Wang, T. T. Y., Luthria, D. L., Charles, D. and Yu, L. L. (2012). Phenolic composition and nutraceutical properties of organic and conventional cinnamon and peppermint. *Food Chemistry*, 132: 1442-1450.
- Maillard, L. C. (1912a). Action des acides amines sur les seces: formation des melanodines par voie methodique. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, 154: 66-68.





- Maillard, L. C. (1912b). Formation d'humus et de combustibles minéraux sans intervention de l'oxygène atmosphérique, des microorganismes, des hautes températures, ou des fortes pressions. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, 155: 1554-1558.
- Marinova E., Toneva A. and Yanishlieva N. (2008) Synergistic antioxidant effect of  $\alpha$ -tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. *Food Chemistry*, 106 (2): 628–633.
- Martins, S., Jongen, W. and Van Boekel., M. (2001). A review of *Maillard* reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*, 11: 364-373.
- Mavesty, D. L. (1938). Patent 2, 124:707. USA.
- Mead P.S., Slutsker L. and Dietz V. (1999) Food related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 607-625.
- Medeiros-Vinci, R., Mestdagh, F., Van Poucke, C., Kerkaert, B., De Muer, N., Denon, Q., Van Peteghem, C. and De Meulenaer, B. (2011). Implementation of acrylamide mitigation strategies on industrial production of French fries: Challenges and pitfalls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 898-906.
- Medina-Carrillo, R. E., Madrigal-Santillán, E. O., Machuca-Sánchez, M. L., Balois-Morales, R., Jimenez-Ruiz, E. I., Valadez-Vega, C., Morales-Gonzalez, J. A. and Sumaya-Martínez. M. T. (2015) Free radical scavenging properties and their relationship with bioactive compounds content of dehydrated calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *African Journal of Agricultural Research*, 10 (11): 1203-1210.
- Mejía-Benítez, D. P., Pérez-Juárez, M. C. y Rosas-Nexticapa, M. (2014). ¡Alerta! TBHQ en alimentos con grasa. *La Ciencia y el Hombre* 27: 1.



- Méndez, J. (2003). Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Gaceta Médica de México*, 139 (1): 49-55.
- Mercado-Mercado, G., De la Rosa-Carrillo, L, Wall-Medrano, A., López-Díaz, J. A. y Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 28 (1): 36-46.
- Mercier, Y., Gatellier, P. and Renerre, M. (2004). Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Science*, 66: 467-473.
- Miyamoto, T. (1986). *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, 14: 517.
- Miyata, T., Ueda, Y., Shinzato, T., Iida, Y., Tanaka, S., KuroKawa, K., Van Ypersele de Strihou, C. and Maeda, K. (1996). Accumulation of albuminlinked and free-form pentosidine in the circulation of uremia patients with end-stage renal failure: Renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *Journal of America Society of Nephrology*, 7: 1198-1206.
- Mondino, M. C. y Ferratto, J. (2006). El análisis sensorial, una herramienta para la evaluación de la calidad desde el consumidor. *Revista Agromensajes de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Rosario Argentina*, 4 (18).
- Montero, M. (2000). Análisis de la composición bioquímica y de posibles biomarcadores de contaminación en el erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, Lmk. Tesis Doctoral. Santiago de Compostela, Argentina. Universidad de Santiago de Compostela, 59 p.
- Morales, G., Jimenez, M., García, O., Mendoza, M. R. and Beristain, C. I. (2014) Effect of natural extracts on the formation of acrylamide in fried potatoes. *Food Science and Technology*, 58: 587-593.



- Morales, F. J. and Jiménez-Pérez., S. (2001). Free radical scavenging capacity of *maillard* reaction products as related to colour and fluorescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72: 119-125.
- Morales, F. J. and Van Boekel, M. A. J. S. (1998). A study of Advanced *Maillard* reaction in heated casein/sugar solutions: fluorescent accumulation. *International Dairy Journal*, 7: 675-683.
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S. and Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40 (2): 223-231.
- Morrisey, P. A., Sheehy, P. J. A., Galvin, K., Kerry, J. P. and Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49: 73-86.
- Mottram, D. S., Wedzicha, B. L. and Dodson, A. T. (2012). Food chemistry: acrylamide is formed in the *Maillard* reaction. *Nature*, 419: 448-449.
- Muchuweti, M., Kativu, E., Mupure, C. H., Chidewe, C., Ndhlala, A. R. and Benhura M. A. N. (2007). Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. *American Journal of Food Technology*, 2 (5): 414-420.
- Mungole, A. and Chaturvedi, A. (2011). Determination of antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* L. and *Rumex nepalensis* spreng. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2:120-128.
- Muñiz-Márquez, D., Valdivia-Urdiales, B., Carillo-Inungaray, M. L., Nevárez-Moorillón, V. G., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R. y Aguilar-González, N. C. (2010). Uso alternativo de fitoquímicos de algunas especias para el control de enfermedades



- transmitidas por alimentos. *Acta Química Mexicana (AQM)*. Universidad Autónoma de Coahuila, Año 2, Volumen 4.
- Muñoz, F. (2002). Plantas medicinales y aromáticas. Mundi-Prensa, España, 16 p.
- Murcia, M. A., Egea, I., Romojaro, F., Parras, P., Jiménez, A. M. and Martínez-Tome, M. (2004). Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52 (7): 1872-1881.
- Musa, O. M. and Arslan, D. (2011). Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. *Food Chemistry*, 129: 171-174.
- Nataro, J. P. and Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiological Reviews*, 11 (1).
- Newton, K. G. and Gill, C. O. (1978). Development of bacterial spoilage at adipose tissue surfaces of fresh meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 39 (5): 1076-1077.
- Njume, C., Afolayan, A. J., Samie, A. and Ndip, R. N. (2011). Inhibitory and bactericidal potential of crude acetone extracts of *Combretum molle* (Combretaceae) on drug-resistant strains of *Helicobacter pylori*. *Journal of Health Population and Nutrition*, 29: 438-445.
- Noda, K., Isozaki, S. and Taniguchi. (1985). Growth promoting and inhibiting effects of spices on *Escherichia coli*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 32 (11): 791-796.
- NORMA MEXICANA - NMX-FF-072- 1990. (1990). Alimentos-Especias y Condimentos-Terminología. Alimentos-Especias y condimentos-terminología. Secretaria de Salud (SSA).



NORMA OFICIAL MEXICANA – NOM-109-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestra de alimentos para su análisis microbiológico.

NORMA OFICIAL MEXICANA – NOM-110-SSA1-1994. (1994). Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NORMA OFICIAL MEXICANA - NOM-113-SSA1-1994. (1994). Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

NORMA OFICIAL MEXICANA - NOM-142-SSA1-1995. (1995). Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.

Nuutila, A. M., Pimia, R. P., Aarni, M. and Oksman-Caldentey, K. M. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 81 (4): 485-493.

Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C. and Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, Symposium on Meat Safety: From Abattoir to Consumer, 78: 77-89.

Olivas-Gastélum, R., Nevárez-Moorillón, G. V. y Gastélum-Franco, M. G. (2009). Las pruebas de diferencia en el análisis sensorial de los alimentos. *Tecnociencia Chihuahua*, 3 (1): 1-7.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2002). Consecuencias para la salud de acrilamida en los alimentos. Informe de la consulta conjunta de FAO/OMS sede central de la OMS, Ginebra, Suiza 25-27 de junio de 2002, 3-17 p.



- Oral, R. A., Dogan, M. and Sarioglu, K. (2014). Effects of certain polyphenols and extracts on furans and acrylamide formation in model system, and total furans during storage. *Food Chemistry*, 142: 423-429.
- Ortega-Nieblas, M. M., Robles-Burgueño, M. R., Acedo-Félix, E., González-León, A., Morales-Trejo, A. y Vázquez-Moreno, L. (2011). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Lippia palmeri* S. Wats). *Revista Fitotécnica Mexicana*, 34 (1): 11-17.
- Osinchak, J. E., Hultin, H. O., Zajicek, O. T., Kelleher, S. D. and Huang, C. H. (1992). Effect of NaCl on catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of fish muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, 12: 35-41.
- Ou, S., Shia, J., Huang, C., Zhang, G., Teng, J., Jiang, Y. and Yang, B. (2010). Effect of antioxidants on elimination and formation of acrylamide in model reaction systems. *Journal of Hazardous Materials*, 182: 863-868.
- Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L. and Sentandreu, M. A. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74: 44-58.
- Padhye, V. N. and Doyle, M. P. (1992). Escherichia coli O157:H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *Journal of Food Protection*, 55: 555-565.
- Palmieri, B. and Sblendorio, V. (2007). Oxidative stress tests: Overview on reliability and use part II. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 11: 383-399.
- Parekh, J., Jadeja, D., and Chanda, S. (2005). Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. *Turkish Journal of Biology*, 29: 203-210.



- Park, J. B. (2011). Identification and quantification of a major anti-oxidant and antiinflammatory phenolic compound found in basil, lemon thyme, mint, oregano, rosemary, sage, and thyme. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62: 577-584.
- Parrilla-Corza, P. (2002). A través de los sentidos. *Revista Énfasis Alimentación Latinoamérica*. Volumen VIII. Edición No. 3/ Junio-Julio 2002.
- Pedreschi, F., Granby, K. and Risum, J. (2010). Acrylamide mitigation in potato chips by using NaCl. *Food and Bioprocess Technology*, 3: 917-921.
- Peppas M., Brem, H., Ehrlinch, P., Zhang, J., Cai, W., Li, Z., Croioru, A., Thung, S. and Vlassara, H. (2003). Adverse effects of dietary Glycotoxins on Wound Healing in Genetically diabetic mice. *Diabetes*, 52: 2805-2813.
- Pérez-Chabela, M. L. y Ponce-Alquicira, E. (2013). Manual de prácticas de laboratorio de tecnología de carnes. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, 11-12 p.
- Peryam, D. R. and Pilgrim, F. J. (1957). Hedonic scale method of measuring food preference. *Food Technology*, 11: 9-14.
- Polak, T., Zlender, B., Lusnic, M. and Gasperlin, L. (2011). Effects of coenzyme Q10,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid on oxidation of cholesterol in chicken liver pâté. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 1052-1058.
- PROFECO (Procuraduría Federal del Consumidor). (2010). Estudio de calidad: aceites vegetales comestibles. *Revista del consumidor*, 36-48 p.



- Puangsoombat, k., Jirapakkul, W. and Smith, S. (2011). Inhibitory activity of Asian spices on heterocyclic amines formation in cooked beef patties. *Journal of Food Science*, 76 (8): 174-180.
- Puangsoombat, K. and Smith, J. S. (2010). Inhibition of heterocyclic amine formation in beef patties by ethanolic extracts of rosemary. *Journal of Food Science*, 75 (2): 40-47.
- Rahman, S., Parvez, K. A., Islam, R. and Khan, M. H. (2011). Antibacterial activity of natural spices on multiple drug resistant Escherichia coli isolated from drinking water, Bangladesh. *Annals of Clinical Microbiology and antimicrobials*, 10: 10.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26.
- Requena, J. R., Chao, C. C., Levine, R. L. and Stadtman, E. R. (2001). Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98: 69-74.
- Reshmi, S. K., Sathya, E. and Devi, P. S. (2010). Isolation of piperidine from *Piper nigrum* and its antiproliferative activity. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4: 562-573.
- Reygaert, W. C. (2014). The antimicrobial possibilities of green tea. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Rizzi, G. P. (1994). The *Maillard* reaction in foods. In: T.P. Labuza; G.A. Reineccius; V. Monnier; J. O'Brien; J. Baynes (Eds.). *Maillard reaction in chemistry, food and health*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.





- Rodríguez, R. I., Ramos, S., Bravo, L., Goya, L. and Martín, M. A. (2011). Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22 (12): 1186-1194.
- Rodríguez-Carpena, J. G. (2011a). Utilización de subproductos de aguacate para la mejora de las características nutricionales y la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cerdo. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Extremadura. Cáceres, España. 16-24 p.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., Andrade, M. J., Kylli, P. and Estévez, M. (2011b). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29 (10): 5625-5635.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D. and Estévez, M. (2011c). Avocado, sunflower and olive oils as replacers of pork back-fat in burger patties: effect on lipid composition, oxidative stability and quality traits. *Meat Science*, 76 (7): C1025-C1031.
- Rufián-Henares, J. A. and Morales F. J. (2008). Microtiter plate-based assay for screening antimicrobial activity of melanoidins against *E. coli* and *S. aureus*. *Food Chemistry*, 111: 1069-1074.
- Ruiz-Roca, B. (2009). Productos de la reacción de *Maillard* y su influencia en la absorción de hierro y cobre. Relación con la capacidad quelante de metales. Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, España, 9-46 p.
- Salami, M., Rahimmalek, M. and Ehtemam, M. H. (2016). Inhibitory effect of different fennel (*Foeniculum vulgare*) samples and their phenolic compounds on formation of advanced



- glycation products and comparison of antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 213: 196-205.
- Salmon, C. P., Knize, M. G. and Felton, J. S. (1997). Effects of marinating on heterocyclic amine carcinogen formation in grilled chicken. *Food and Chemical Toxicology*, 35 (5): 433-441.
- Sánchez-Escalante, A., Torrescano, G., Djenane, D., Beltrán, J. A. and Roncalés, P. (2003). Stabilisation of colour and odour of beef patties by using lycopene-rich tomato and peppers as a source of antioxidants. *Journal of Science and Food Agriculture*, 83: 187-194.
- Sanny, M., Jinap, S., Bakker, E. J., Van, B. M. A. J. S. and Luning, P. A. (2012). Is lowering reducing sugars concentration in French fries an effective measure to reduce acrylamide concentration in food service establishments. *Food Chemistry*, 135: 2012-2020.
- Schutz, H. G. (1971). Sources of invalidity in the sensory evaluation of foods. *Food Technology*, 25: 53-57.
- Seon, T. J. (2010). A Review: Special Issue: 56th International Congress of Meat Science and Technology (56th ICoMST). *Meat Science*. 15-20 August 2010. Jeju, Korea.
- Shahidi F. (2015). Handbook of antioxidants for food preservation. Cambridge, UK. Woodhead Publishing 2015; 51-78.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D. and Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 112-119.



- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M. and Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7749-7759.
- Smith, J. S., Puangsombat, K., Houser, T., Hunt, M., Gadgil, P. and Ameri R. (2011). Occurrence of Heterocyclic Amines in Muscle Foods and Mitigation with Antioxidants. Conferences. Food Safety Consortium and Animal Sciences and Industry department of Kansas State University.
- Smith, J. S., Ameri, R. and Gadgil, P. (2008) Effect of Marinades on the Formation of Heterocyclic Amines in Beef Steaks. *Journal Food Science*, 73: 1854-18591.
- Smet, K., Raes, K., Huyghebaert, G., Haak, L., Arnouts, S. and Smet, S. (2008). Lipid and protein oxidation of broiler meat as influenced by dietary natural antioxidant supplementation. *Poultry Science*, 87: 1682-1688.
- Somoza, V. (2005). Five years of research on health risks and benefits of *Maillard* reaction products: an update. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49: 663-672.
- Stadtman, E. R. and Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in protein. *Amino Acids*, 25: 207-218.
- Stahl, W. (2000). Lipid oxidation and antioxidants. *Journal Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 3: 121-126.
- Stevenson, D. E. and Hurst, R. D. (2007). Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more. *Cellular and Molecular Life Science*, 64: 2900-2916 p.
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R. and Felker, P. (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant



- properties of *cactus pear* (*Optunia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2): 442-451.
- Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H. and Nagao, M. (2004). Heterocyclic amines: mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*, 95 (4): 290-299.
- Sulaiman, F .A., Kazeem, M. O., Waheed, A. M., Temowo, S. O., Azeez, I. O., Zubair, F. I., Adeyemi, T. A., Nyang, A. and Adeyemi, O. S. (2014). Antimicrobial and toxic potential of aqueous extracts of *Allium sativum*, *Hibiscus sabdariffa* and *Zingiber officinale* in Wistar rats. *Journal of Taibah University for Science*, 8: 315-322.
- Suman, S. P., Fastman, C., Stamer, S. L. and Liebler, D. C. (2006). Redox instability induced by 4-hydroxy-2-nonenal in porcine and bovine myoglobins, at pH 5.6, 4 °C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3402-3408.
- Sumaya-Martínez M. T., Padilla-Mendoza, P. E., Morales de Teresa, M. A. y Calderón-Ramos, Z. G. (2006). Lo nuevo en alimentación para personas con diabetes en México: reducción del consumo de glicotoxinas alimentarias. *Diabetes hoy para el médico y el profesional de la salud*, 7 (1): 1548-1550.
- Sumner, J. B. and Sisler, E. B. (1944). A simple method for blood sugar. *Archives of Biochemistry*, 4: 333-336.
- Taeymans, D. and Wood, J. (2004). A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 323-347.
- Tang, X., Sun, X., Wu, V. C. H., Xie, J., Pan, Y., Zhao, Y. and Malakar, P. K. (2013). Predicting shelf-life of chilled pork sold in China. *Food Control*, 32: 334-340.



- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. and Tornqvist, M. (2002). Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 50: 4998-5006.
- Touns, M. S., Ouerghemmi, I., Wannas, W. A., Ksouri, R., Zemn, H., Marzouk, B. and Kchou, M. E. (2009). Valorization of three varieties of grape. *Industrial Crops and Products*, 30 (2): 292-296
- Tung, Y., Wu, J., Kuo, Y. and Chang, S. (2007). Antioxidant activities of natural phenolic compounds from Acacia confusa bark. *Bioresource Technology*, 98: 1120-1123.
- Uribarri, J., Peppas, M., Cai, W., Goldberg, T., Lu, M., He, C. and Vlassara, H. (2003). Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14: 728-731.
- USDA (United State Department of Agriculture). (2012).  
<http://www.usda.gov/wps/portal/usdahome>
- Vangnai, K., Houser, T. H., Hunt, M. C. and Smith, J. S. (2014). Effect of enhancement on the formation of heterocyclic amines in cooked pork loins: Preliminary studies. *Meat Science*, 98: 88-93.
- Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Martinez-Huelamo, M., Rinaldi Alvarenga, J. F., Neto-Leal, L. and Lamuela-Raventos, R. M. (2014). A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry*, 154: 299-307.
- Van Der Fels-Klerx, H. J., Capuano, E., Nguyena, H. T., Ataç Mogol, B., Kocadağlı, T., Göncüoğlu, Taş, N., Hamzalıoğlu, A., Van Boekel, M. A. J. S. and Gökmen, V. (2014). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits:



- NaCl and temperature–time profile effects and kinetics. *Food Research International*, 57: 210-217.
- Van Haute, S., Raes, K., Van Der Meeren, P. and Sampers, I. (2016). The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. *Food Control*, 68: 30-39.
- Vattem, D. A. and Shetty, K. (2003). Acrylamide in food: A model for mechanism of formation and its reduction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4 (3): 331-338.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C. and Estévez, M. (2007). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*, 77: 246-256.
- Ventanas, S., Estevez, M., Tejeda, J. F. and Ruiz, J. (2006). Protein and lipid oxidation in *Longissimus dorsi* and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. *Meat Science*, 72: 647-655.
- Vicario-Romero, I. M., Guillén-Sans, R., y Guzmán-Chozas, M. (1997). Utilización del ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para evaluar el proceso autooxidativo en alimentos. *Grasas y Aceites*, 48: 96-102.
- Vinci, R. M., Mestdagh, F. and De Meulenaer, B. (2012). Acrylamide formation in fried potato products – Present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chemistry*, 133 (4): 1138–1154.
- Visioli, F. (2012). Olive oil phenolics: Where do we stand? Where should we go? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 2017-2019.



- Vlassara, H. and Palace, M. (2002). Diabetes and Advanced Glycation End-products. *Journal of International Medicine*, 251: 87-101.
- Wang, W., Wu, N., Zu, Y. G. and Fu, Y. J. (2008). Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*, 108 (3): 1019-1022.
- Watanabe, Y. and Ayano, Y. (1974). The antioxidative activities of distilled water-soluble and ethanol-soluble fractions from ground spices. *Journal of the Japanese Society of Food and Nutrition*, 27: 181.
- Wen, L. C., Wen, Y. C., SungChuan, W. and KuangHway, Y. (2009). DPPH free-radical scavenging activity, total phenolic contents and chemical composition analysis of forty-two kinds of essential oils. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17 (5): 386-395.
- Wolfram, M. L., Kashimura, N. and Norton, D. (1974). Factors affecting the *Maillard* browning reaction between sugars and amino acids. Nonenzymic browning of dehydrated orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22: 796-800.
- Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., Hughes, S. I. and Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78: 343-358.
- Wu, C. H., Huang, S. M., Lin, J. R. and Yen, G. Y. (2011). Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. *Food & Function*, 2, 224-234.
- Xiong, L. G., Chen, Y. J., Tong, J. W., Huang, J. A., Li, J., Gong, Y. S. and Liu, Z. H. (2017). Tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits *Escherichia coli* by increasing endogenous oxidative stress. *Food Chemistry*, 217: 196-204.



- Xu, C. M., Zhang, Y. L., Wang, J. and Lu, J. A. (2010). Extraction, distribution and characterisation of phenolic compounds and oil in grapes seeds. *Food Chemistry*, 122 (3): 688-694.
- Yanishieva, N. V., Marinova, E. and Pokorny, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108: 776-793.
- Yeager, S. (2001). La guía médica de remedios alimenticios. Prevención. España, 348-349 p.
- Yeum, K. J., Beretta, G., Krinsky, N. I., Russell, R. M. and Aldini, G. (2009). Synergistic interactions of antioxidant nutrients in a biological model system. *Nutrition*, 25 (7/8): 839-846.
- Yu, J., Ahmedna, M. and Goktepe, I. (2010). Potential of peanut skin phenolic extract as antioxidative and antibacterial agent in cooked and raw ground beef. *International Journal of Food Science and technology*, 45: 1337-1344.
- Yuan, Y., Shu, C., Zhou, B., Qi, X. L., and Xiang, J. G. (2011). Impact of selected additives on acrylamide formation in asparagine/sugar *Maillard* model systems. *Food Research International*, 44: 449-455.
- Zeng, X. H., Cheng, K. W., Jiang, Y., Lin, A. X., Shi, J. J., Ou, S. Y., Chen, F. and Wang, M. F. (2009). Inhibition of acrylamide formation by vitamins in model reactions and fried potato strips, *Food Chemistry*, 116: 34-39.
- Zhang, Y., Ren, Y. and Zhang, Y. (2009). New Research Developments on Acrylamide: Analytical Chemistry, Formation Mechanism, and Mitigation Recipes. *Chemical Reviews*, 109 (9): 4375-4397.





- Zhang, Y., Chen, J., Zhang, X. L., Wu, X. Q. and Zhang, Y. (2007). Addition of antioxidant of bamboo leaves (AOB) effectively reduces acrylamide formation in potato crisps and French fries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 523-528.
- Zhang, Y. and Zhang, Y. (2007). Study on reduction of acrylamide in fried bread sticks by addition of antioxidant of bamboo leaves and extract of green tea. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 1: 131-136.
- Zhang, Y., Chen, J., Zhang, X., Wu, X. and Zhang, Y. (2006). Addition of antioxidant of bamboo leaves (AOB) effectively reduces acrylamide formation in potato crisps and French fries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2): 523-528.
- Zheng, W. and Lee, S. A. (2009). Well-done meat intake, heterocyclic amine exposure, and cancer risk. *Nutrition and Cancer*, 61 (4): 437-446.
- Zheng, W. and Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5165-5170.
- Zhu, F., Cai, Y. Z., Ke, J. and Corke, H. (2011). Dietary plant materials reduce acrylamide formation in cookie and starch-based model systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 2477-2483.
- Zhu, L. G. and Brewer, M. S. (1998). Discoloration of fresh pork as related to muscle and display conditions. *Journal of Food Science*, 63: 763-767.
- Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L. and Ewald, D. K. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4782-4787.



## ANEXOS

### ANEXO 1

#### Compuestos Fenólicos Totales

Los compuestos fenólicos totales se determinaron de acuerdo al método de Stintzing *et al.* (2005).

El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, la cual es reducida a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica. Esta reducción ocurre bajo condiciones alcalinas mediante la presencia de carbonato de sodio. La coloración azul es monitoreada a una longitud de onda de 765 nm y refleja la cantidad total de polifenoles, usualmente expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG) (Georgé *et al.*, 2005).

La técnica se inició colocando 100  $\mu\text{L}$  de muestra en viales eppendorf (por triplicado), se agregó 500  $\mu\text{L}$  de solución Folin-Ciocalteu (1:10 en agua destilada) y 400  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio (al 7.5%), inmediatamente después la muestra se agitó en vortex y se incubó a temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 30 min. Al término del tiempo se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en el lector de microplacas Power Wave XS Biotek. Se usó agua destilada como blanco. Se aplicaron diluciones a las muestras analizadas.

Para la determinación de la concentración de compuestos fenólicos totales (CFT) de las muestras se utilizó una curva estándar de ácido gálico, utilizando las siguientes concentraciones: 0, 100, 200, 300 y 400 mg de ácido gálico/L. Posteriormente se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada concentración y se colocaron en viales eppendorf aplicando la técnica antes descrita. Se usó agua destilada como solvente para el ácido gálico.

Los resultados del contenido de CFT se expresaron en mg EAG.



## Actividad Antioxidante

### 1.- Actividad antirradical por el método 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH•)

La actividad antirradical con base en el método del DPPH• se evaluó de acuerdo al procedimiento reportado por Morales y Jiménez-Pérez (2001).

El reactivo DPPH• es un radical libre, que en solución etanólica, presenta una coloración violeta fuerte y su máxima absorbancia se obtiene a una longitud de onda de 517 nm. Si se adiciona a este medio una sustancia susceptible de atrapar radicales libres, el electrón no apareado del DPPH• se aparea e inmediatamente se presenta una decoloración de la solución que puede ir hasta amarillo en razón del número de electrones apareados.

La técnica se inició preparando una solución de DPPH• a una concentración de 7.4 mg/100 mL de etanol y se agitó por 10 minutos; posteriormente se colocaron 100  $\mu$ L de muestra en viales eppendorf (por triplicado), se le agregó 500  $\mu$ L de la solución de DPPH• y se agitó en vortex vigorosamente; se dejó reposar a temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C) por una hora; transcurrido este tiempo se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 517 nm en el lector de microplacas Power Wave XS Biotek. Se usó etanol como blanco. Se aplicaron diluciones a las muestras analizadas.

Para la determinación de la concentración de la actividad antioxidante de las muestras por el método DPPH• se utilizó una curva estándar de trolox, utilizando las siguientes concentraciones: 0, 75, 150, 225 y 300  $\mu$ mol ET (equivalente a trolox)/L. Posteriormente se tomaron 100  $\mu$ L de cada concentración y se colocaron en viales eppendorf aplicando la técnica antes descrita. Se utilizó etanol como solvente para el trolox.

Los resultados de la actividad antioxidante por el método DPPH• se expresaron en  $\mu$ mol ET (equivalente de Trolox) (Carboxílico 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromo). Trolox análogo hidrosoluble de la vitamina E.



## 2.- Determinación de la actividad antirradical por el método del ABTS•+

La actividad antirradical con base en el método del ABTS•+ se evaluó de acuerdo al procedimiento desarrollado por Re *et al.* (1999) y Kuskoski *et al.* (2004).

El radical ABTS•+ se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM) con una relación 1:0.5 (v/v), incubado a 4 °C y en la oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical ABTS•+ se diluye con agua destilada hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.6 y 0.8 a una longitud de onda de 754 nm.

La técnica se inició colocando 20 µL de muestra en viales eppendorf (por triplicado), se le agregó 980 µL de la solución del radical ABTS•+, posteriormente se agitó en vortex y se dejó reposar por 7 minutos; transcurrido este tiempo se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 754 nm en el lector de microplacas Power Wave XS Biotek. Se usó agua destilada como blanco. Se aplicaron diluciones a las muestras analizadas.

Para la determinación de la concentración de actividad antioxidante de las muestras por el método ABTS•+ se utilizó una curva estándar de ácido ascórbico, utilizando las siguientes concentraciones: 0, 10, 20, 30 y 40 mg de ácido ascórbico/100 ml. Posteriormente se tomaron 20 µL de cada concentración y se colocaron en viales eppendorf aplicando la técnica antes descrita. Se utilizó agua destilada como solvente para el ácido ascórbico.

Los resultados de la actividad antioxidante por el método ABTS•+ se expresaron en mg de vitamina C (ácido ascórbico), es decir en mg de VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C); se justifica expresarlo de esta manera dado que las muestras ensayadas son alimentos, y la vitamina C es un nutrimento que se encuentra diariamente en nuestra dieta (Kim *et al.*, 2002).



### 3.- Determinación de la capacidad reductora de Fe (III) a Fe (II) (FRAP)

La actividad antirradical con base en la capacidad reductora de Fe (III) a Fe (II) se evaluó de acuerdo al procedimiento reportado por Hinneburg *et al.* (2006).

La mayoría de las actividades antioxidantes de carácter no enzimático involucran procesos redox. El ensayo de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), se basa en la capacidad de los polifenoles y del ácido ascórbico de reducir moléculas de Fe (III) a Fe (II), el cual forma una coloración azul, esta coloración es monitoreada por absorbancia a una longitud de onda de 700 nm.

La técnica se inició colocando 50  $\mu$ L de muestra en viales eppendorf (por triplicado), posteriormente se agregó 125  $\mu$ L de buffer de fosfato (0.02 M, pH 6.6) y 125  $\mu$ L de hexacianoferrato ( $K_3Fe(CN)_6$ ) (al 1%); posteriormente se agitó vigorosamente en vortex; enseguida la muestra se incubó por 30 minutos a 50 °C, transcurrido este tiempo se agregaron 125  $\mu$ L de ácido tricloacético (al 10%), nuevamente la muestra se agitó en vortex, e inmediatamente después se centrifugó por 10 minutos a 5 r.p.m. (revoluciones por minuto), del sobrenadante obtenido se tomaron 125  $\mu$ L, los cuales se mezclaron con 125  $\mu$ L de agua destilada y 25  $\mu$ L de cloruro férrico ( $FeCl_3$ ) (al 0.01%), posteriormente se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 700 nm en el lector de microplacas Power Wave XS Biotek. Se usó etanol como blanco. Se aplicaron diluciones a las muestras analizadas.

Para la determinación de la concentración de la actividad antioxidante de las muestras por el método FRAP se utilizó una curva estándar de ácido ascórbico, utilizando las siguientes concentraciones: 0, 5, 10, 15 y 20 mg de ácido ascórbico/100 mL. Posteriormente se tomaron 50  $\mu$ L de cada concentración y se colocaron en viales eppendorf aplicando la técnica antes descrita. Se utilizó agua destilada como solvente para el ácido ascórbico.

Los resultados de la capacidad reductora de Fe (III) a Fe (II) se expresaron como mg de ácido ascórbico.



#### **4.- Determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) (Oxygen Radical Absorbance Capacity)**

La metodología de ORAC se llevó a cabo por medio de los procedimientos descritos por Huang *et al.* 2002 y Cao and Prior, 1999.

El ensayo ORAC se basa en el daño causado por los radicales libres presentes en el reactivo oxidante APPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidroclorado) a una sonda fluorescente, tal como la fluoresceína, la cual va perdiendo intensidad en el color a medida que aumenta el daño oxidativo.

La técnica se inició colocando 25  $\mu\text{L}$  de muestra en viales eppendorf (por triplicado), enseguida se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína (4 $\mu\text{M}$ ), la cual antes de su uso debe llevarse a una dilución 1:500 (con buffer de fosfato), posteriormente la mezcla realizada se colocó en una microplaca, la cual fue incubada en el lector de microplacas Synergy Biotek por 30 min a 37°C, una vez transcurrido el tiempo de incubación se llevó a cabo una cinética de 30 min con lapsos de agitación cada 10 segundos y mediciones de fluorescencia cada 60 segundos. La inyección del reactivo oxidante APPH (2.03 g) se llevó a cabo a través del inyector de Synergy Biotek utilizando un volumen de 25  $\mu\text{L}$ . Como solvente de los reactivos se utilizó buffer de fosfato (pH 7.4 y 75 mM concentración final). Se utilizó una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión 520 nm. El blanco consistió en 25  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos, 125  $\mu\text{L}$  de fluoresceína y 25  $\mu\text{L}$  de APPH. Se aplicaron diluciones a las muestras analizadas.

Para la determinación de la concentración de la capacidad antioxidante de las muestras por el método ORAC se utilizó una curva estándar de trolox, utilizando las siguientes concentraciones: 0, 50 y 100  $\mu\text{mol ET}$  (equivalentes de trolox)/L. Posteriormente se tomaron 25  $\mu\text{L}$  de cada concentración y se colocaron en viales eppendorf aplicando la técnica antes descrita. Se utilizó buffer de fosfato como solvente para el trolox.

Para el cálculo de los resultados se utilizó las ecuaciones 1 y 2:



$$\text{Ec. 1} \quad \text{AUC} = \left[ \frac{R1}{R1} \right] + \left[ \frac{R2}{R1} \right] + \left[ \frac{R3}{R1} \right] + \dots \left[ \frac{Rn}{R1} \right]$$

Donde AUC es área bajo la curva (area under curve), R1 es la lectura de fluorescencia al inicio de la reacción, y Rn es la última medición.

$$\text{Ec. 2} \quad \text{Net AUC} = \text{AUC (muestra)} - \text{AUC (blanco)}$$

Donde Net AUC es área bajo la curva neta. Los valores ORAC de las muestras se calcularán automáticamente mediante el software Gen5. Los resultados de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno se expresaron en  $\mu\text{mol ET}$ .

## 5.- Determinación de la actividad quelante

La actividad quelante se determinó de acuerdo al método de Guicin *et al.* (2003).

Este método se basa en la reacción de la molécula quelante de referencia con el ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), posteriormente el ion ferroso que no fue quelado o secuestrado reacciona con la ferrozina generando color, este color es monitoreado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 562 nm y refleja la concentración de actividad quelante.

La técnica se inició colocando 100  $\mu\text{L}$  de muestra en viales eppendorf (por triplicado), posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de una solución de cloruro férrico II tetrahidratado (2 mM) y 450  $\mu\text{L}$  de metanol, enseguida la muestra se agitó en vortex dejando en reposo por 5 min a temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C); posteriormente se adicionó 400  $\mu\text{L}$  de Ferrozina (5mM), e inmediatamente después se agitó en vortex y se dejó en reposo por 10 min a temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C), una vez transcurrido el tiempo de reposo se llevó a cabo la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm en el lector de microplacas Power Wave XS Biotek. Se usó agua destilada como blanco. Se aplicaron diluciones a las muestras analizadas.



Para la determinación de la concentración de actividad quelante de las muestras se utilizó una curva estándar de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), utilizando las siguientes concentraciones: 0, 0.0002, 0.0004 y 0.0006 mol de EDTA/L. Posteriormente se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada concentración y se colocaron en viales eppendorf aplicando la técnica antes descrita. Se utilizó agua destilada como solvente para el EDTA.

Los resultados de la actividad quelante se expresaron en mol de EDTA.





### **Determinación de azúcares reductores totales**

Para la determinación de azúcares reductores se utilizó el procedimiento desarrollado por Bello-Gil *et al.* (2006) en base al método del ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS) (Sumner y Sisler, 1944).

El procedimiento se basa en una reacción redox que ocurre entre el DNS y los azúcares reductores presentes en la muestra (Sumner y Sisler, 1944). Este método ha sufrido varias modificaciones a través de los años para adecuarse al análisis de diferentes materiales y su principal ventaja radica en su alta sensibilidad y productividad debido a que es un método espectrofotométrico.

Preparación del reactivo del ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS): en frío:

Se pesaron 5 g del DNS, 150 g de tartrato de Na-K y 8 g de NaOH. Se disolvió el NaOH en 200 mL de agua destilada y se añadió en agitación el tartrato de Na-K lentamente. Se completó con agua destilada hasta 400 mL y se comenzó a añadir lentamente el ácido DNS. Se dejó en agitación toda la noche, se aforó a 500 mL y se filtró con papel filtro.

Desarrollo de la reacción:

En tubos de cristal de 10 mL se adiciono 0.5 mL de muestra y 0.5 mL del reactivo DNS. Los tubos se colocaron en baño de agua a 95 °C por 5 min. Se enfriaron hasta temperatura ambiente y se les añadió 5 mL de agua destilada. Se agitó y se realizó la lectura a 540 nm en el espectrofotómetro Power Wave XS Biotek.

Para la determinación de la concentración de azúcares reductores totales se utilizó una curva estándar de glucosa, utilizando las siguientes concentraciones: 0, 0.5, 0.7, 0.9, 1.3, 1.7 y 1.9 g/L. Posteriormente se tomaron 0.5 mL de cada concentración y se colocaron en tubos de cristal aplicando la técnica antes descrita. Se utilizó agua destilada como solvente para la glucosa. Los resultados se expresaran como gramos de ART (azúcares reductores totales).



## ANEXO 2

### Correlaciones de actividad antioxidante y CFT de las tres binas de especias

	<b>CFT</b>	<b>DPPH</b>	<b>ABTS</b>	<b>FRAP</b>	<b>ORAC</b>	<b>ACTIVIDAD QUELANTE</b>
<b>CFT</b>	1	0.932	0.990	0.963	0.916	0.760

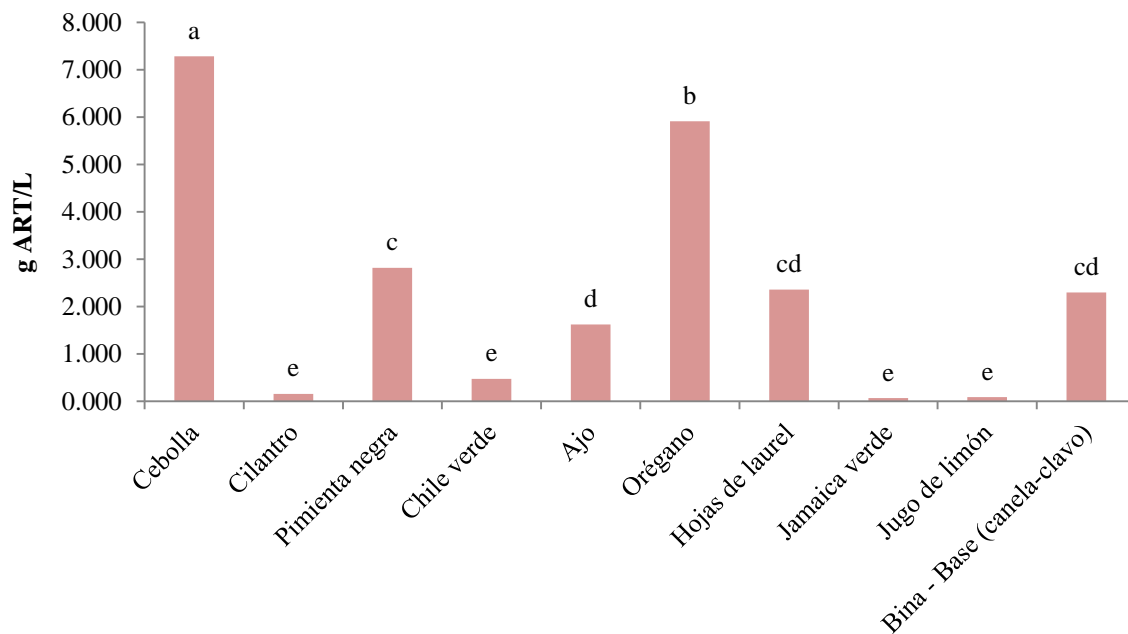
### Correlaciones de actividad antioxidante y CFT de los aditivos

	<b>CFT</b>	<b>DPPH</b>	<b>ABTS</b>	<b>FRAP</b>	<b>ORAC</b>	<b>ACTIVIDAD QUELANTE</b>
<b>CFT</b>	1	0.895	0.666	0.584	0.613	0.792



### ANEXO 3

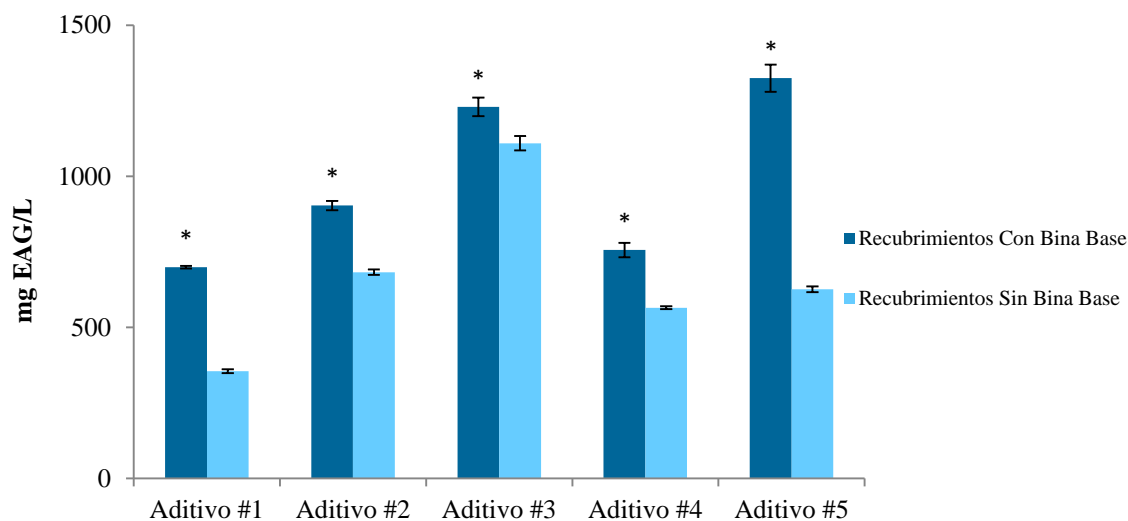
#### Contenido de azúcares reductores totales de los ingredientes que integran a los cinco aditivos





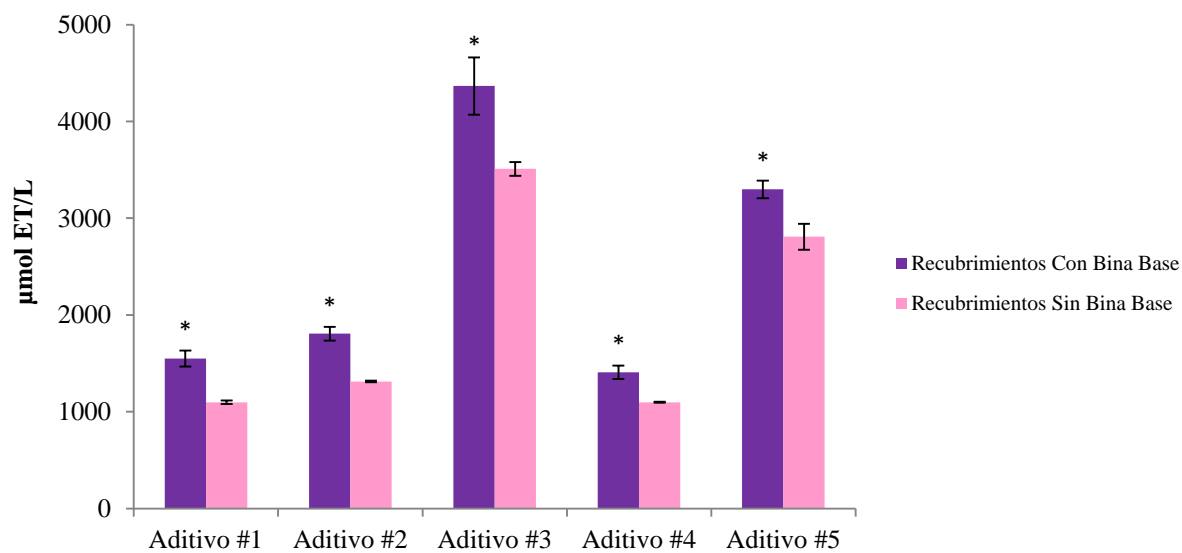
## ANEXO 4

### Contenido de compuestos fenólicos totales de los cinco aditivos



\* Presentó el mayor valor estadísticamente significativo entre el recubrimiento con y sin la bina base ( $p \leq 0.05$ ).

### Actividad antioxidante por el método DPPH• de los cinco aditivos



\* Presentó el mayor valor estadísticamente significativo entre el recubrimiento con y sin la bina base ( $p \leq 0.05$ ).