

**Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias Agroalimentarias
Escuela de Tecnología de Alimentos**

**Proyecto Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos para
optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.**

**Evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano del orégano
(*Origanum vulgare*) en polvo y en oleorresina y de la mostaza
china (*Brassica rapa var. pekinensis*) en polvo, como alternativa
natural en productos cárnicos**

Elaborado por:

Yock Mei Acón Chan

Carné:

B00034

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

Febrero 2016

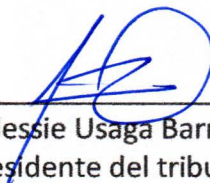
TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.


Elaborado por:

Yock Mei Acón Chan

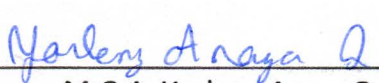
Aprobado por:



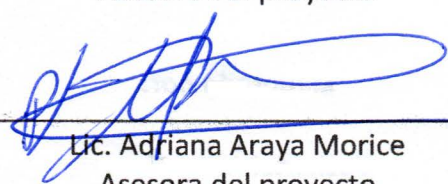
PhD. Jessie Usaga Barrientos
Presidente del tribunal



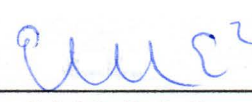
Lic. Gabriela Davidovich Young
Directora del proyecto



M.G.A. Yorlery Araya Quesada
Asesora del proyecto



Lic. Adriana Araya Morice
Asesora del proyecto



Lic. Edel Solís Solís
Profesor designado

DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Los derechos de propiedad intelectual corresponden a la Universidad de Costa Rica.

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a todos los estudiantes de la Universidad de Costa Rica que cursan la carrera de Ingeniería de Alimentos. Pese a lo complicado que parece ser y lo largo que resulta el trayecto, el hecho de que exista esta tesis es muestra suficiente de que si se puede lograr y de que vale la pena. Les dedico mi proyecto a ellos ya que son los que van a entender el esfuerzo que requiere y la pasión que se necesita para poder terminar esta carrera y espero que en un futuro poder encontrarme en la calle más y más Ingenieros de Alimentos llenos de pasión por lo que hacen, satisfechos de sus logros y con grandes ambiciones.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, debo recalcar lo complicado y al mismo tiempo divertido que resulta escribir los agradecimientos de la Tesis ya que uno no sabe ni por dónde comenzar, a quién poner de primero y qué específicamente agradecer. Entonces me disculpo de ante mano si se me olvidó mencionar a alguien, toda persona que tuvo algo que ver con el profesional que soy hoy en día merece un gracias de mi parte.

Las personas que quiero mencionar de primero es mi familia. Aunque ellos no comprenden muy bien que es Ingeniería de Alimentos, aunque al inicio les pareció una decisión de carrera muy extraña y que ni sabían que existía en el mayor de los casos siempre han estado ahí para mí con cualquier ayuda que yo requiera y con todo el apoyo que uno pudiera desear. Es difícil ser la menor y es gratificante cuando algún familiar piensa en acudir a uno para dudas en el sector profesional. Quiero agradecer en especial a mi hermana Sue que fue la que me introdujo por primera vez a la carrera, la cual al solo escuchar una breve descripción de lo que era estaba más que segura de que era la carrera para mí.

Luego quiero agradecerles a los profesores y personas que tuvieron impacto directo con este proyecto. La profe Gaby y Yorle que me regañaron y jalaron las orejas para que terminara, que me ayudaron con cualquier problema que se me presentara a lo largo de la investigación y que tuvieron la fe en mí y me seleccionaron para realizar este proyecto. La profe Andrea que fue la que primero me contacto y me ayuda a descifrar misterios químicos durante la parte experimental. La profe Adriana que siempre que ocupe me permitió un espacio para responder las dudas. A Vanny que me ayudó muchísimo en la parte de micro. A Ale que más de una vez sin siquiera pedirlo me lavó varias placas Petri. A Giova que me ayudó muchísimo en la parte de química con sus chistes y conocimientos. A Luis que me ayudó a montar los equipos, a encontrar cristalería y a pasar bien las largas horas de laboratorio. A Fede que me motivó cuando ya no quería hacer nada, que me escuchó quejarme y se aguantó mis chichas de cansancio y que me acompañó varios días y me ayudó a lavar la gran cantidad de cristalería llena de grasa. A Anthony y Valeria Z que entre los 3 nos ayudamos en lo que podíamos. Por último, a Glori que me abrió un espacio en su aparta y me motivó a terminar de escribir este documento en compañía.

Por último, quiero agradecerles a todos mis amigos y compañeros a lo largo de estos años de universidad, sin ellos todo esto jamás hubiera sido lo mismo. En especial a mis

Galactomananas: Vale, Glori, Xime, Naty, Mari, Ana M, Ana I y Mari que han sido el mejor grupo de apoyo y risas que uno pudiera desear. Sin más preámbulo, le agradezco al destino y a la vida por permitirme terminar este trabajo. Que pese a que uno quiera controlarlo, he aprendido que la vida está llena de oportunidades y que uno es el que decide que hace con ellas aunque todo simplemente se ponga de cabeza.

ÍNDICE GENERAL

Derechos de propiedad intelectual.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	iv
Índice de figuras	ix
Índice de Cuadros.....	xii
Resumen.....	xiv
1. Justificación.....	1
2. Objetivos	6
2.1 Objetivo general.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3. Marco Teórico	7
3.1 Oxidación lipídica	7
3.1.1 Índice de peróxido.....	10
3.1.2 Prueba de ácido tiobarbitúrico	11
3.2 Cambios en el pH.....	13
3.3 Deterioro microbiológico de cárnicos	14
3.3.1 <i>Pseudomonas</i> spp.....	16
3.3.2 Bacterias ácido lácticas.....	17
3.3.3 <i>Escherichia coli</i>	19
3.3.4 <i>Listeria innocua</i>	20
3.4 Métodos para la determinar el potencial antimicrobiano de una sustancia.....	22
3.4.1 Método de concentración mínima inhibitoria (CMI)	22
3.5 Preservantes comunes en cárnicos.....	24
3.6 Posibles preservantes naturales para la industria cárnica	27

3.6.1	Orégano.....	27
3.6.2	Mostaza china	29
3.6.3	Oleorresinas	31
4.	Materiales y métodos	33
4.1	Localización del proyecto	33
4.2	Materiales	33
4.2.1	Materia Prima.....	33
4.2.2	Cultivos bacterianos	34
4.3	Obtención del polvo de las especias	34
4.4	Determinación del efecto antioxidante del orégano en polvo y en oleorresina y de la mostaza china en polvo en un gel cárnico	35
4.4.1	Elaboración del gel cárnico	36
4.4.2	Evaluación del pH del gel cárnico.....	38
4.4.3	Evaluación del índice de peróxidos	38
4.4.4	Evaluación del valor del número de ácido tiobarbitúrico	39
4.5	Determinación del efecto antimicrobiano del orégano en polvo y en oleorresina y de la mostaza china en polvo.....	40
4.5.1	Método <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana	41
5.	Resultados y discusión	43
5.1	Determinación del efecto antioxidante del orégano en polvo y en oleorresina y de la mostaza china en polvo en un gel cárnico	43
5.1.1	Evaluación del pH del gel cárnico.....	43
5.1.2	Evaluación del índice de peróxidos	44
5.1.3	Evaluación del valor del número de ácido tiobarbitúrico	50
5.2	Determinación del efecto antimicrobiano del orégano en polvo y en oleorresina y de la mostaza china en polvo.....	58
6.	Conclusiones.....	63

7. Recomendaciones	64
8. Bibliografía	65
9. ANEXO	78
9.1 Cuadros de resultados intermedios	78
9.2 Análisis estadísticos.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Proceso de autooxidación de las moléculas lipídicas (Kiokias *et al.*, 2010). 9
- Figura 2. Reacción de valoración para la determinación del índice de peróxidos (Kiokias *et al.*, 2010). 11
- Figura 3. Reacción de TBA con malonaldehído para la formación del pigmento rosa. 13
- Figura 4. Planta de orégano (*Origanum vulgare*)..... 28
- Figura 5. Planta de mostaza china (*Brassica rapa var. Pekinensis*)..... 30
- Figura 6. Hojas de orégano (a) y mostaza china (b) listas para ser procesadas..... 34
- Figura 7. Mezcla homogenizada para la elaboración de los geles cárnicos (a) y geles cárnicos listos (b)..... 37
- Figura 8. Sistema de destilación para la determinación del valor del número de TBA. 39
- Figura 9. Grasa extraída de cada uno de los geles cárnicos tratados en el siguiente orden: OO 0,4%, OO 0,6%, OP 0,5%, OP 1,0%, MP 0,5%, MP 1,0% y Control. 45
- Figura 10. Índice de peróxidos promedio de los geles cárnicos durante 20 días de almacenamiento a 5 °C. La línea roja indica el límite del índice de peróxidos permitido por el RTCA 67.04.40: 07. El círculo rojo indica el día seleccionado para análisis estadísticos posteriores ($n = 3$; barras de error corresponden a la desviación estándar). 45
- Figura 11. Color del destilado luego de reaccionar con el reactivo de TBA. (a) Tratamiento MP 0,5% y MP 1,0%. (b) Tratamiento OP 0,5% y OP 1,0%. 50
- Figura 12. Curva de absorbancia de 400 nm – 600 nm del gel cárnico tratado con oleoresina de orégano al 0,6%. 52
- Figura 13 Curva de absorbancia de 400 nm – 600 nm del gel cárnico tratado con oleoresina de orégano al 0,4%. 52
- Figura 14. Curva de absorbancia de 400 nm – 600 nm del gel cárnico tratado con orégano en polvo al 0,5%. 53
- Figura 15. Curva de absorbancia de 400 nm – 600 nm del gel cárnico tratado con orégano en polvo al 1,0%. 53
- Figura 16. Índice de peróxidos promedio posteriores ($n = 3$; barras de error corresponden a la desviación estándar) de los geles cárnicos tratados con los tratamientos de MP y Control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C. La línea roja indica el límite del valor del número de

TBA según Candogan & Kolsarici, 2003. El círculo rojo indica el día seleccionado para análisis estadísticos posteriores. 54

- Figura 17. Gráfico del índice de peróxidos promedio y el valor del número de TBA promedio del gel cárnico tratado con mostaza en polvo al 0,5% durante 20 días de almacenamiento a 5 °C ($n = 3$; barras de error corresponden a la desviación estándar). 56
- Figura 18. Gráfico del índice de peróxidos promedio y el valor del número de TBA promedio del gel cárnico tratado con mostaza en polvo al 1,0% durante 20 días de almacenamiento a 5 °C ($n = 3$; barras de error corresponden a la desviación estándar). 56
- Figura 19. Gráfico del índice de peróxidos promedio y el valor del número de TBA promedio del gel cárnico tratado con nitrito a 156 ppm durante 20 días de almacenamiento a 5 °C ($n = 3$; barras de error corresponden a la desviación estándar). 57
- Figura 20. Placas Petri con crecimiento de *L. innocua* con el tratamiento control (a) y tratamiento de OP 2,0% (b) 59
- Figura 21. Análisis estadístico del comportamiento del pH en los diferentes geles cárnicos con los diferentes tratamientos durante 20 días de almacenamiento a 5 °C. 81
- Figura 22. Análisis estadístico del comportamiento del IP en los diferentes geles cárnicos con los diferentes tratamientos durante 20 días de almacenamiento a 5 °C. 83
- Figura 23. Análisis estadístico del comportamiento del IP en los diferentes geles cárnicos con los diferentes tratamientos en el día 5 de almacenamiento a 5 °C. 85
- Figura 24. Análisis estadístico del comportamiento del IP en los diferentes geles cárnicos con los diferentes tratamientos sin el tratamiento MP 0,5% en el día 5 de almacenamiento a 5 °C. 86
- Figura 25. Análisis estadístico del comportamiento del valor del número de TBA en los diferentes geles cárnicos tratados con mostaza china en polvo y nitrito durante 20 días de almacenamiento a 5 °C. 87
- Figura 26. Análisis estadístico del comportamiento del valor del número de TBA en los diferentes geles cárnicos tratados con mostaza china en polvo y nitrito en el día 15 de almacenamiento a 5 °C. 89
- Figura 27. Análisis estadístico de los recuentos microbiológicos de *E. coli* tratado con orégano en polvo al 2,0% y el control. 90
- Figura 28. Análisis estadístico de los recuentos microbiológicos de *L. innocua* tratado con orégano en polvo al 2,0% y el control. 91

- Figura 29. Análisis estadístico de los recuentos microbiológicos de *L. rhamnosus* tratado con orégano en polvo al 2,0% y el control..... 92
- Figura 30. Análisis estadístico de los recuentos microbiológicos de *Pseudomonas* spp. tratado con orégano en polvo al 2,0% y el control..... 93

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro I. Aditivos de uso permitidos en la “Salchicha”, el “Salchichón”, la “Mortadela” y el “Chorizo” 26
- Cuadro II. Tratamientos utilizados en un gel cárnico para evaluar la capacidad antioxidante del polvo y oleorresina de orégano y del polvo de mostaza china..... 35
- Cuadro III. Formulación del gel cárnico control*. 36
- Cuadro IV. Tratamientos utilizados para el análisis de la capacidad antimicrobiana del polvo y oleorresina de orégano y del polvo de mostaza china. 40
- Cuadro V. Valores promedio de pH de los geles cárnicos con los diferentes tratamientos almacenados a 5 °C durante 20 días ($n = 3$; \pm intervalo de confianza)..... 43
- Cuadro VI. Valor promedio del índice de peróxidos determinado en las grasas extraídas de los geles cárnicos en el día 5 de almacenamiento a 5°C ($n = 3$; \pm intervalo de confianza). 47
- Cuadro VII. Valor del índice de peróxidos determinado en las grasas extraídas de los geles cárnicos menos la mostaza en polvo al 0,5% en el día 5 de almacenamiento a 5°C ($n = 3$; \pm intervalo de confianza)..... 48
- Cuadro VIII. Clasificación de la sensibilidad de los cuatro microorganismos analizados a los diferentes tratamientos por medio del método de CMI en tubo. 58
- Cuadro IX. Promedio del recuento total de los microorganismos tratados con OP al 2,0% y con el tratamiento control a 30 °C por 24 horas ($n = 3$; \pm intervalo de confianza). 59
- Cuadro 9.1-I. Valores de pH de la réplica 1 de los geles cárnicos tratados con orégano en polvo y oleorresina, mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C..... 78
- Cuadro 9.1-II. Valores de pH de la réplica 2 de los geles cárnicos tratados con orégano en polvo y oleorresina, mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C..... 78
- Cuadro 9.1-III. Valores de pH de la réplica 3 de los geles cárnicos tratados con orégano en polvo y oleorresina, mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C..... 78
- Cuadro 9.1-IV. Valores de IP de la réplica 1 de los geles cárnicos tratados con orégano en polvo y oleorresina, mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C..... 79
- Cuadro 9.1-V. Valores de IP de la réplica 2 de los geles cárnicos tratados con orégano en polvo y oleorresina, mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C..... 79
- Cuadro 9.1-VI. Valores de IP de la réplica 3 de los geles cárnicos tratados con orégano en polvo y oleorresina, mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C..... 79

- Cuadro 9.1-VII. Valores de número de TBA de la réplica 1 de los geles cárnicos tratados con mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C..... 80
- Cuadro 9.1-VIII. Valores de número de TBA de la réplica 2 de los geles cárnicos tratados con mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C..... 80
- Cuadro 9.1-IX. Valores de número de TBA de la réplica 3 de los geles cárnicos tratados con mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C..... 80
- Cuadro 9.1-X. Recuentos de los microorganismos analizados con los tratamientos de orégano en polvo 2,0% y control (500 ppm de NO₂ + 2,0% diacetato + 4,8% lactato)..... 80

RESUMEN

Acón Chan, Yock Mei

Evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano del orégano (*Origanum vulgare*) en polvo y en oleorresina y de la mostaza china (*Brassica rapa var. pekinensis*) en polvo, como alternativa natural en productos cárnicos.

Tesis de Licenciatura de Ingeniería de Alimentos. – San José, CR.:

Y. Acón C., 2016.

109h.: 30 fig. - 19 cuad. - 109 refs.

En la actualidad, para productos cárnicos se usan mezclas de gran variedad de preservantes sintéticos como el lactato, diacetato y los nitritos. Sin embargo, el consumidor actual está buscando productos más naturales. En el presente documento, se evalúa la capacidad antioxidante y antimicrobiana del orégano en polvo (OP) y en oleorresina (OO) y de la mostaza china en polvo (MP).

Se utilizó OP al 0,5% y al 1,0%, OO al 0,4% y al 0,6% y MP al 0,5% y al 1,0% como los tratamientos para evaluar la capacidad antioxidante contra un control de 156 ppm de nitrito adicionado en una matriz cárnica. Primero se midió el índice de peróxidos (IP) y el valor del número de TBA a los geles cárnicos cada 5 días durante 20 días y se mantuvo un control sobre su pH. En cuanto al pH, se observó que no habían diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos y que se mantiene constante a través del tiempo. Con el IP se encontró que todos los tratamientos con orégano presentan una actividad antioxidante estadísticamente igual a la del control y por lo tanto presentan una alternativa prometedora para los antioxidantes sintéticos. Con respecto a la determinación del valor del número de TBA, se encontró que el OP y OO provocaban un cambio de coloración amarillo en lugar de rosado y por ende este análisis no resulta adecuado para evaluar oxidación en productos con orégano ya que el pico de absorción máximo se presenta a los 450 nm y no a los 538 nm, por lo que no existe una manera de correlacionar los resultados. No obstante, al comparar los resultados de la MP y el control, se encontró que la MP al 1,0% no presenta diferencias significativas con el tratamiento control.

Uniendo ambos análisis (IP y TBA), se encontró que ambas especias presentan actividad antioxidante y que ambas son una potencial alternativa para los antioxidantes sintéticos.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana, se evaluó OP al 1,0% y 2,0%, OO al 0,6% y 2,0% y MP al 1,0% y 2,0% en comparación con una mezcla control de 500 ppm de nitrito con 2,0% de diacetato y 4,8% de lactato con el método de concentración mínima inhibitoria (CMI) en tubo con algunas variaciones en donde dependiendo de la densidad de crecimiento se clasifican los microorganismo en sensibles o resistentes. Se evaluó *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas spp.* y *Lactobacillus spp.* y se encontró que todos los microorganismos eran sensibles a los tratamientos de OP al 2,0% y al control. Luego, con los recuentos totales se encontró que el control y el OP al 2,0% poseían un efecto bactericida y no bacteriostático con diferencias significativas entre sí, en donde el tratamiento de OP es el que presenta la mayor reducción de microorganismos. Al unir los resultados de la actividad antioxidante y la antimicrobiana, se puede observar como los tratamientos con OP son los que presentaron los mejores resultados.

ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANO, ORÉGANO, MOSTAZA CHINA, ÍNDICE DE PERÓXIDOS, VALOR DEL NÚMERO DE TBA, CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).

Gabriela Davidovich

Escuela de Tecnología de Alimentos

1. JUSTIFICACIÓN

La calidad de la carne puede ser protegida mediante el control de la oxidación lipídica usando antioxidantes. El uso de antioxidantes es una forma efectiva de reducir al mínimo o prevenir la oxidación de lípidos en productos alimenticios, retardando la formación de productos tóxicos y de esta forma mantener la calidad nutricional y lograr prolongar la vida útil. Los antioxidantes pueden actuar como quelantes de metales y limpiadores de radicales libres de oxígeno provocando un retraso en la progresión de la oxidación de los lípidos. Varios antioxidantes sintéticos han sido utilizados con éxito para prevenir la oxidación de lípidos en las carnes tales como nitritos, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroquinona terciaria (TBHQ) (Lee *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso de estos antioxidantes sintéticos ha sido restringido debido a los posibles riesgos para la salud y su toxicidad. Junto a esto, con el paso del tiempo los consumidores han empezado a exigir cada vez más productos libres de aditivos o con aditivos naturales (Lee *et al.*, 2010).

La oxidación de lípidos es uno de los principales factores que afectan la calidad de los productos cárnicos precocidos. Inicialmente, la oxidación lipídica toma lugar en la fracción de ácidos grasos insaturados por medio de la abstracción de un átomo de hidrógeno y luego ésta se propaga como una reacción en cadena mediada por radicales. Se forman hidroperóxidos, los cuales son susceptibles a la oxidación adicional y a descomponerse para formar productos de reacción secundarios, tales como aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes. En muchos casos, estos compuestos son los responsables de los cambios en el sabor, el aroma y el valor nutricional que afecta la calidad general del producto (Radha *et al.*, 2014). Ésta se ve influenciada por la composición de los fosfolípidos, la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, la presencia de iones metálicos, oxígeno, pigmentos hemo, procesos mecánicos y la adición de sal durante el procesamiento (Biswas *et al.*, 2012).

La carne fresca tiene una vida útil que varía entre 3 y 5 días cuando se mantiene a 4 °C. *Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae* y bacterias ácido lácticas son las principales responsables del deterioro de la carne. Dependiendo de la región, de un cuarto a un tercio de la producción mundial de carne se pierde cada año a causa de este deterioro. Por otra parte, la carne y sus productos pueden estar contaminados por bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Yersinia enterocolitica*, las cuales son

responsables de enfermedades transmitidas por los alimentos que pueden causar daños a la salud de los consumidores o hasta la muerte. El control de la cantidad de bacterias de deterioro y el crecimiento de bacterias patógenas, por tanto, es un objetivo importante para los sectores de la industria de la producción de carne (Oussalah *et al.*, 2004).

Por consiguiente, en un estudio como este, es importante analizar microorganismos del grupo de las bacterias lácticas como *Lactibacillus* sp. Se seleccionó este microorganismo con el fin de observar el efecto presentado por el preservante natural seleccionado sobre el deterioro láctico de la carne. La producción de ácido láctico por las bacterias es uno de los principales motivos por el cual la carne al paso del tiempo comienza a desarrollar sabores y olores extraños y de esta forma se disminuye su vida útil. Controlar el crecimiento de bacterias ácido lácticas en las carnes procesadas es difícil debido a que estas bacterias son psicrófilas, microaerófilas y resistentes al nitrito, sal y humo (Franz & Von Holy, 1996).

La carne se conserva principalmente a bajas temperaturas, ya sea en refrigeración o en congelación, favoreciendo el deterioro causado por microorganismos resistentes a las bajas temperaturas o microorganismos psicrófilos. Por este motivo, se analizó el efecto antimicrobiano de ambas especies sobre bacterias del género *Pseudomonas* spp., el cual además de ser utilizado como microorganismo psicrófilo de referencia, es uno de los más comúnmente encontrados en las carnes y uno de los principales causantes del deterioro de estos productos (Ercolini *et al.*, 2010).

Por último, se analizó *Listeria* spp. y *Escherichia coli*. *Listeria monocytogenes* es uno de los patógenos más comúnmente encontrados en las carnes procesadas y es de los principales microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Lebert *et al.*, 2000). Una característica importante de esta bacteria es la capacidad de formar biofilms y de esta forma adherirse eficientemente a diferentes materiales. Además, estos biofilms suelen ser resistentes a la desecación, la luz UV y a tratamientos con agentes antimicrobianos (Pérez *et al.*, 2014). En consecuencia, es de suma importancia encontrar un preservante capaz de reducir al máximo la probabilidad de aparición del patógeno. Para analizar esta capacidad, se utilizó como cepa de referencia *L. innocua* para no utilizar un patógeno dentro de las instalaciones de análisis de alimentos. Se eligió trabajar con *L. innocua* ya que en varios estudios se encontró que esta es incluso más resistente a la mayoría de compuestos antimicrobianos que *L. monocytogenes* y por ende que es válido utilizarla como referencia ya que de esta manera se tiene un factor de protección (Gómez *et al.*, 2014; Silva-Angulo *et al.*, 2015 & Silva *et al.*, 2015). Es importante

recalcar que se debe validar esto para el caso específico del orégano y de la mostaza china en estudios posteriores.

En el caso de *E. coli*, ésta es una Enterobacteria que tiene muchas cepas asociadas con enfermedades crónicas severas y potencialmente fatales transmitidas por alimentos como por ejemplo colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico. Entre las cepas están la *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroagregativa y la *E. coli* de adherencia difusa (Romero, 2007). Las Enterobacterias son un buen indicador de contaminación en alimentos procesados que han experimentado un tratamiento que elimina la flora microbiana vegetativa (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2013). Aunque esta es una bacteria fácil de eliminar por el calor ya que su inactivación comienza a los 49,5°C y a los 55°C tiene un valor de D de 6,7 minutos y un z de 3.6°C (Romero *et al.*, 2011), las carnes cocinadas pueden ser fácilmente recontaminadas, por este motivo, se convierte en un gran peligro para la salud de los consumidores de los productos pre cocidos listos para consumir (Gordillo *et al.*, 2014). En este estudio *E. coli* se utilizó como indicador de patógenos Gram negativos y Enterobacterias como se ha utilizado en diferentes estudios a través del tiempo (Wang *et al.*, 2013; Holvoet *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015 & Belluco *et al.*, 2016).

Los compuestos fenólicos son una clase importante de antioxidantes y antimicrobianos naturales (Lee *et al.*, 2010). Las hierbas y especias se han utilizado durante miles de años para mejorar el sabor, color y aroma de los alimentos y en la medicina tradicional. Además, de aumentar el sabor, las hierbas y las especias también son conocidas por ser preservantes, antioxidantes y por tener funciones antimicrobianas. Numerosos estudios han sido publicados sobre la capacidad antioxidante y sobre los componentes fenólicos de especias (Lee & Shibamoto, 2002; Agbor *et al.*, 2005; Banerjee *et al.*, 2012).

En diversos estudios, se ha encontrado una alta concentración de compuestos fenólicos dentro de las oleorresinas de diversas especias como lo son el orégano, el tomillo y la albahaca. Por lo explicado anteriormente acerca de la capacidad antioxidante de estos compuestos, se cree que estas oleorresinas presentan potencial antioxidante y que podrían llegar a sustituir los antioxidantes sintéticos (Padín *et al.*, 2007; Del Ré & Jorge, 2011).

Las oleorresinas son extractos líquidos o semisólidos obtenidos a partir de plantas por extracción con disolventes, seguido de la eliminación de los disolventes. Las oleorresinas

usualmente contienen compuestos aromáticos volátiles y no volátiles, así como otros ingredientes no volátiles que incluyen aceites, antioxidantes, pigmentos y otros extractos solubles en el disolvente utilizado. El rendimiento y la composición de la oleorresina preparada, depende en gran medida del disolvente utilizado y de las condiciones de extracción (Kalemba & Wajs, 2011). Éstos difieren de los aceites esenciales en que poseen todos los ingredientes aromatizantes de una especia particular. Además, son los sustitutos más convenientes para las especias en la industria de procesamiento de alimentos, ya que están libres de bacterias y pueden ser normalizadas a una intensidad de sabor deseada (Ponce *et al.*, 2010).

El orégano u *Origanum vulgare* por su nombre científico, pertenece a la familia *Labiatae* la cual incluye a muchas plantas encontradas fácilmente entre la fauna silvestre del área del Mediterráneo (Almeida *et al.*, 2013). Estas plantas poseen una composición especial en sus aceites esenciales, por lo cual las hojas se utilizan tradicionalmente como una especia para cocinar o como un preservante natural de alimentos, especialmente en carnes. Timol y carvacrol son los dos componentes más activos del aceite esencial de orégano los cuales poseen un amplio espectro de propiedades antimicrobianas contra bacterias y hongos. La actividad antimicrobiana y antioxidante del orégano se ha estudiado ampliamente a lo largo de los años y se han comprobado con análisis *in vitro* dentro de varios modelos alimenticios (Khanjari *et al.*, 2013). Sin embargo, no se encuentran estudios sobre geles cárnicos que demuestren la aplicabilidad del extracto de orégano como preservante natural en productos cárnicos.

La mostaza china o *Brassica rapa* var. *pekinensis* por su nombre científico, pertenece a la familia *Crucifereae*. Esta planta tiene como principal centro de origen a China, sin embargo con el paso de los años se ha comenzado a cultivar por toda Asia y en diferentes partes del mundo (Wan *et al.*, 2014). En Costa Rica, la mostaza china ha comenzado a presentar un papel importante dentro de las huertas, haciendo que sea de fácil acceso (García, 1998). Sus hojas se caracterizan por ser ricas en nutrientes y por contener polifenoles y glucosinolatos, los cuales son compuestos beneficiosos para la salud (Turgis *et al.*, 2009). La actividad antioxidante de la hoja de mostaza china cruda se le atribuye a la presencia de clorofila y carotenoides y se ha demostrado que esta planta posee un efecto contra la auto-oxidación de ácido linoleico mucho mayor en comparación con el α -tocoferol. Además, se ha estudiado de que la hoja de mostaza tiene un efecto antiaterogénico, lo cual permite reducir el nivel de colesterol en plasma y aumentar el nivel de lipoproteína de alta densidad-colesterol (Lee *et al.*, 2010).

El fin de este estudio fue evaluar el uso del orégano en polvo y su oleorresina, así como de la mostaza china en polvo, como preservantes naturales en productos cárnicos, y analizar si el tipo de presentación, oleorresina o polvo en el caso del orégano, tiene algún efecto antioxidante y antimicrobiano sobre el producto. Esto con el fin de extender la vida útil de los alimentos, en este caso embutidos, y así obtener una alternativa a los preservantes sintéticos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antioxidante y antimicrobiano del orégano (*Origanum vulgare*) en polvo y su oleorresina y de la mostaza china (*Brassica rapa var. pekinensis*) en polvo, como alternativa natural en productos cárnicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto antioxidante del orégano en polvo y su oleorresina y de la mostaza china en polvo sobre la estabilidad de un gel cárnico, durante su almacenamiento en refrigeración.
- Evaluar el efecto antimicrobiano del orégano en polvo y su oleorresina y de la mostaza china en polvo sobre la inhibición de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria innocua* ATCC 33091, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 11443 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

3. MARCO TEÓRICO

Como se explicó anteriormente en la Sección 1, la vida útil de los productos cárnicos se ve determinada tanto por la parte de oxidación lipídica como por el deterioro microbiológico de las formas en que se va a explicar a lo largo del documento. Por ende, son estos dos ámbitos los que se deben evaluar para determinar si alguna especie o compuesto natural representa una alternativa a los preservantes sintéticos actuales. A continuación se explicará el proceso de oxidación lipídica junto con los métodos de análisis más comunes, el deterioro microbiológico en productos cárnicos junto con los microorganismos más frecuentes y el uso del orégano y mostaza china como agentes antioxidantes y antimicrobianos.

3.1 OXIDACIÓN LIPÍDICA

El daño oxidativo es el mayor factor no microbiano responsable del deterioro en la calidad de los productos cárnicos (Kiokias *et al.*, 2010). Estos procesos oxidativos inducen modificaciones en los lípidos y proteínas del músculo, afectando las propiedades sensoriales y nutricionales de la carne y sus subproductos. La oxidación lipídica en el músculo comienza en los fosfolípidos altamente insaturados de la membrana subcelular. El proceso de oxidación es una reacción importante que ocurre entre los lípidos insaturados y el oxígeno atmosférico y por lo general se acelera por la presencia de metales, luz, calor y varios iniciadores (Kiokias *et al.*, 2010).

Los potenciadores más importantes de la oxidación son las especies reactivas al oxígeno, que son productos metabólicos secundarios normales generados continuamente en la mitocondria de la mayoría de las células. Incluyen radicales libres ($R\bullet$, especies de electrones impares) como el radical hidroxilo ($OH\bullet$), el radical anión superóxido ($O_2\bullet$), los radicales peroxilo ($ROO\bullet$) y el alcoxilo ($RO\bullet$) y los peróxidos como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los hidroperóxidos ($ROOH$) (Terevinto, 2010). Los radicales libres al poseer uno o más electrones desapareados tienen gran reactividad biológica y sustraen un hidrógeno de un ácido graso, generalmente vecino a una insaturación o doble enlace, para estabilizarse y como consecuencia el ácido graso se convierte en un radical lipídico. Si se está en presencia de O_2 , este se une al radical lipídico y se forma un radical lipoperoxi. Este último radical busca estabilizarse y sustrae un hidrógeno a un ácido graso vecino y forma un lipohidroperóxido ($LOOH$) y un nuevo radical lipídico (Carballo, 2013).

Lo anterior genera una reacción en cadena, que provoca una oxidación progresiva de las grasas presentes en la carne. Finalmente los LOOH producidos son rápidamente descompuestos en aldehídos y otras sustancias de descomposición de las grasas lo que puede producir la aparición de aromas y sabores poco deseables a lo largo de la maduración (Carballo, 2013). 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 (Terevinto, 2010).

Los productos secundarios de la oxidación incluyen tanto compuestos de bajo peso molecular como compuestos volátiles y compuestos no volátiles con un peso molecular relativamente alto. Estos productos secundarios pueden continuar reaccionando formando una amplia variedad de productos de degradación, lo que hace que sea difícil encontrar donde se originaron los componentes y su grado de oxidación. Los ácidos grasos y los productos de oxidación lipídica también pueden reaccionar con otros componentes de los alimentos, tales como proteínas, hidratos de carbono y agua, lo que hace aún más difícil de determinar el grado de rancidez de un producto (Rustad, 2010).

El proceso de peroxidación autocatalítica comienza inmediatamente después del sacrificio. Los cambios bioquímicos que acompañan el metabolismo después del sacrificio y la maduración post mortem en la transformación del músculo a carne dan lugar a condiciones donde el balance entre los factores prooxidantes/capacidad antioxidante favorece la oxidación. La magnitud y duración del proceso de oxidación es también afectado por eventos ocurridos previos al sacrificio e inmediatamente luego del mismo, como el estrés, pH, temperatura de la carcasa y técnicas de estimulación, ya que comprometen las defensas antioxidantes del músculo y por ende, favorecen los procesos oxidativos. Sumado a esto, la ruptura de la integridad de las membranas musculares a través del deshuesado, procesado y reestructuración facilitan la interacción de los prooxidantes con los ácidos grasos insaturados, resultando en la generación de radicales libres y propagación de la reacción oxidativa (Carballo, 2013).

La autooxidación es el deterioro oxidativo de los ácidos grasos insaturados a través de un proceso autocatalítico que consiste en un mecanismo de radicales libres. Esto indica que los compuestos intermedios son radicales y que la reacción implica una etapa de iniciación y una secuencia de propagación, que continúa hasta la operación de uno o más pasos de terminación. La

auto-oxidación de moléculas lipídicas se describe brevemente en las siguientes reacciones (Kiokia *et al.*, 2010):

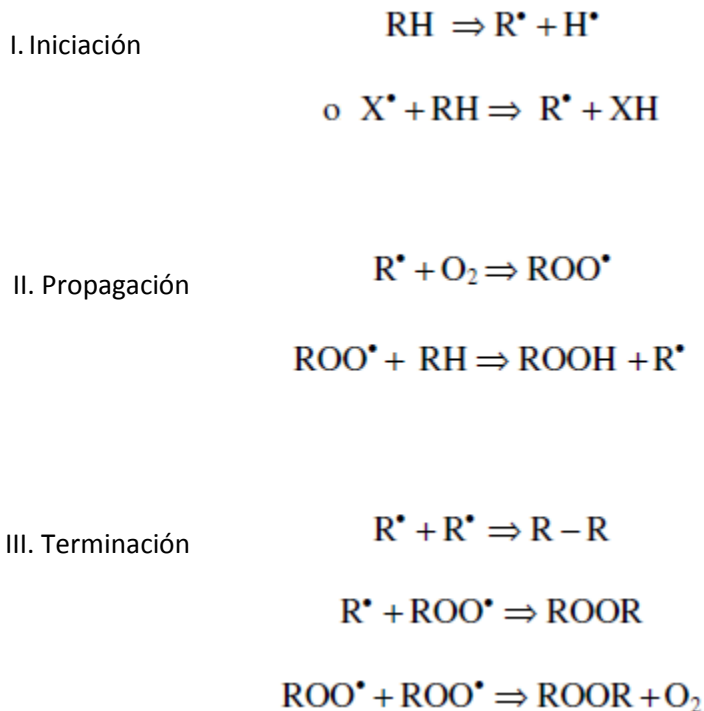


Figura 1. Proceso de autooxidación de las moléculas lipídicas (Kiokias *et al.*, 2010).

En la etapa de iniciación, el hidrógeno se abstrae de una molécula de ácido olefínico (RH) para formar radicales alquilo (R^{\bullet}), generalmente en presencia de un catalizador, tales como iones metálicos, luz, calor o irradiación, a un ritmo relativamente lento. La duración de la etapa de iniciación varía para los diferentes lípidos y depende del grado de insaturación y de la presencia de antioxidantes naturales. En la secuencia de propagación, con un adecuado suministro de oxígeno, la reacción entre los radicales alquilo y el oxígeno molecular es muy rápido y radicales peroxilo se forman (ROO^{\bullet}). Estos reaccionan con otra molécula de los ácidos grasos para formar hidroperóxidos (ROOH) y nuevos radicales libres, los cuales al reaccionar con otra molécula de oxígeno contribuyen a la reacción en cadena. Moléculas de hidroperóxido pueden descomponerse en presencia de metales para producir radicales alcoxi (RO^{\bullet}), que se pueden separar en una mezcla compleja de aldehídos y otros productos, es decir, productos de oxidación secundarios. La aniquilación mutua de los radicales libres se conoce como la etapa de terminación, cuando los

radicales libres $\bullet R$ y $ROO\bullet$ interactúan para formar productos estables, no radicales. Es importante recalcar que la tasa de oxidación de los ácidos grasos aumenta con su grado de insaturación (Kiokia *et al.*, 2010).

Es necesario mencionar que en el proceso de oxidación lipídica actúan de forma conjunta dos vías de alteración, la oxidación enzimática y la oxidación no enzimática. Dado que la oxidación lipídica es un proceso favorable termodinámicamente, pero no cinéticamente, es necesaria la participación de un catalizador. Este papel puede ser desempeñado por una enzima endógena (lipoxigenasas, peroxidasas y oxidasas), o bien puede ser llevado a cabo por agentes del tipo metales (especialmente de transición), luz, calor, etc. En el primer caso nos encontraríamos con la oxidación de tipo enzimática, mientras que en el segundo se trataría de una oxidación no enzimática. El desarrollo de ambas se superpone durante la alteración de un producto, llevando a productos de oxidación muy similares (Sanjuás, 2012).

Muchos métodos diferentes se han implementado, tanto en la industria como en la investigación, para determinar el grado de oxidación lipídica en alimentos. Los métodos para determinar el grado de oxidación lipídica se pueden dividir en dos grupos principales, los métodos que determinan los productos de oxidación primarios y métodos que miden los productos de oxidación secundarios. A continuación se explicarán dos métodos, índice de peróxidos el cual determina los productos de oxidación primarios y el valor del número de ácido tiobarbitúrico el cual mide los productos de oxidación secundaria.

3.1.1 Índice de peróxido

Uno de los métodos más comúnmente utilizados para la medición de la rancidez y determinar productos primarios de la oxidación es el índice de peróxido (IP). Este es un método de titulación simple donde se disuelve la muestra en ácido acético-cloroformo (o iso-octano-ácido acético) y luego se añade yoduro de potasio (KI). El ión yoduro (I^-) se oxida por los hidroperóxidos ($ROOH$) u otros componentes presentes en la muestra y el yodo (I_2) liberado se valora con tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) y con almidón como indicador (Kiokias *et al.*, 2010 & Rustad, 2010).

El IP se expresa en miliequivalentes de yodo por kilogramo de lípidos o como milimolar de peróxido por kilogramo de lípidos. Este método requiere una muestra de 5 g si el IP está por debajo de 10 y alrededor de 1 g si el IP es mayor. La sensibilidad es de aproximadamente 0,5

mEq/kg, pero esto se puede mejorar mediante la determinación del punto final colorimétricamente o mediante la determinación del yodo liberado electrométricamente usando un electrodo de platino (Kiokias *et al.*, 2010 & Rustad, 2010). El oxígeno en el aire, la luz, y la absorción de yodo por los ácidos grasos insaturados en el aceite puede interferir y causar variaciones en los resultados. Por lo tanto, se debe tener cuidado en la estandarización de cómo se realiza el procedimiento (Rustad, 2010).

Este método es rápido y aplicable a todas las grasas y aceites. Sin embargo, los resultados pueden verse afectados por la estructura y reactividad de los peróxidos, la temperatura y el tiempo de reacción. Las grasas y aceites refinados considerados “frescos” deben tener un valor de IP menor a 1 y para ser considerados aceptables, deben poseer un valor absoluto máximo menor a 3. Sin embargo, el valor puede llegar a ser tan alto como 10 antes de que cualquier sabor extraño pueda ser detectado sensorialmente (Kiokias *et al.*, 2010). Según el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.40:07), en el análisis de grasas y aceites se permite un máximo del índice de peróxido de hasta 5 meq de peróxido/kg.

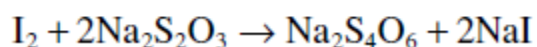
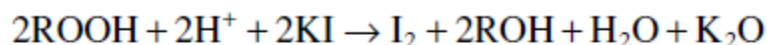


Figura 2. Reacción de valoración para la determinación del índice de peróxidos (Kiokias *et al.*, 2010).

3.1.2 Prueba de ácido tiobarbitúrico

Debido a que los peróxidos son inestables y se transforman rápidamente en productos de oxidación secundaria, determinaciones de compuestos primarios como la determinación del IP se deben combinar con la determinación de productos secundarios tales como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) para tener resultados más concretos. Hay muchos métodos publicados para determinar TBARS, pero al igual que la determinación de IP, diferentes métodos dan resultados distintos. No obstante, todos los métodos se basan en la absorbancia del color rosado formado por la reacción entre el TBA y productos de oxidación de lípidos poliinsaturados (Rustad, 2010).

A través de los años y por medio de diversos estudios, se ha llegado a la conclusión de que la intensidad del pigmento rosa aumenta a medida que avanza la rancidez oxidativa y por tanto, se ha aplicado como un indicador fiable oxidativo a una amplia variedad de alimentos. Además, se han realizado varios intentos para establecer una relación entre los valores de TBA y el desarrollo de sabores indeseables en grasas y aceites. Conjunto a esto, se ha demostrado que los valores de umbral de sabor se correlacionan bien con los resultados de TBA de aceites vegetales tales como los de soya y maíz. Sin embargo, la complejidad química de los alimentos y muestras biológicas impone ciertas limitaciones en el uso de la prueba TBA para la evaluación de su estado oxidativo (Kiokias *et al.*, 2010).

Originalmente, el complejo coloreado se atribuyó a la condensación de dos moles de TBA y un mol de malonaldehído (MDA), que se forma como un producto de descomposición de hidroperóxidos de lípidos en las condiciones de prueba ácidas que posee un color rosa y tiene absorbancia máxima alrededor de los 530 - 540 nm (Figura 3). No obstante, la reacción no es específica, y el color se forma por muchos productos de oxidación secundarios diferentes, de ahí el nombre TBARS. Muchos factores influyen en el color en la prueba TBA, tales como temperatura, tiempo de calentamiento, pH, iones metálicos, y antioxidantes (Rustad, 2010).

Sin embargo, alcanos, alquenos y 2,4 - dienos también reaccionan con TBA, formando un pigmento amarillo que absorbe luz a 450 nm. Los dienos también dan un pigmento rosa que absorbe a 530 nm. Además, muchos otros componentes en los alimentos pueden reaccionar con TBA o interferir con las mediciones como por ejemplo: proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, nitrito, sacarosa y otros azúcares, productos de reacciones de pardeamiento, antioxidantes y metales traza. Los valores TBARS para diferentes alimentos con el mismo nivel de oxidación (basado en las puntuaciones sensoriales) pueden variar significativamente. Sin embargo, se han encontrado valores de TBARS para correlacionar con las puntuaciones sensoriales dentro de los mismos materiales (Rustad, 2010). Usando los métodos tradicionales, se deben obtener valores para la prueba de TBARS menores a 2 mg de malonaldehído/kg de carne para considerarse que la carne se encuentra en niveles aceptables de oxidación (Banerjee *et al.*, 2012). Sin embargo, algunos autores consideran que se debe obtener valores menores a 1 mg de malonaldehído/kg de carne para considerarse que la carne se encuentra en niveles aceptables de oxidación (Candogan & Kolsarici, 2003).

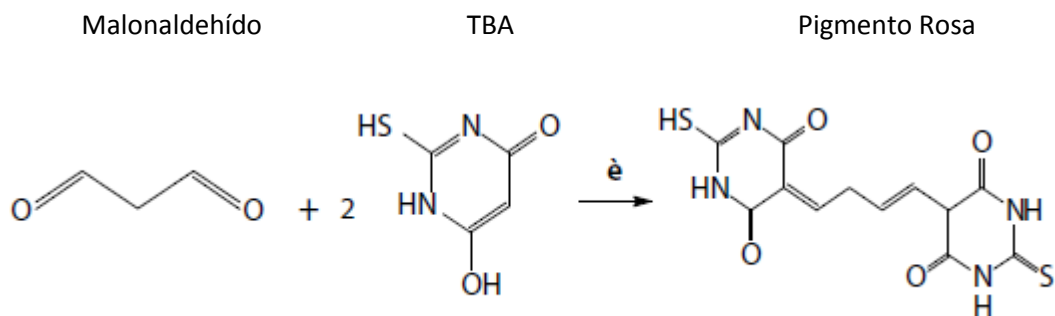


Figura 3. Reacción de TBA con malonaldehído para la formación del pigmento rosa.

3.2 CAMBIOS EN EL pH

La susceptibilidad del tejido muscular a la oxidación lipídica se encuentra relacionada al grado de insaturación lipídica presente, tipo de músculo, dieta del animal, aditivos en el producto como la sal, método de cocción utilizado, sistema de almacenamiento y el pH del músculo (Banerjee *et al.*, 2012). Análisis *in vitro* han sido desarrollados con el fin de evaluar la actividad antioxidante. Desafortunadamente, estos métodos *in vitro* usualmente no se asocian con la habilidad de los compuestos de inhibir el deterioro oxidativo en los alimentos. Esto se debe a que la actividad de los antioxidantes en los sistemas alimenticios depende no solo de su actividad química como antioxidante, sino que también depende de factores físicos como la ubicación del estudio, la interacción con otros componentes en el alimento y condiciones de su ambiente como el pH del producto completo. Por tanto, para evaluar realmente el potencial antioxidante en alimentos, los modelos utilizados deben de ser desarrollados con las condiciones químicas, físicas y de ambiente esperadas en el producto alimenticio por analizar. Debido a que estos factores no son consistentes en todos los sistemas alimenticios, se deben desarrollar modelos individuales para cada uno (Decker *et al.*, 2005).

El pH puede afectar las reacciones oxidativas al influenciar la actividad prooxidante, por ejemplo la solubilidad del hierro aumenta al disminuir el pH. Además, cambios en el pH afectan la carga de los antioxidantes y de esta forma, afectan su solubilidad y capacidad de quelación del sistema. Es por esto que es de suma importancia que el pH en los modelos de oxidación sea similar al pH del alimento de interés. En el caso de modelos para evaluar la oxidación en músculo cárnico, el pH del sistema debe de encontrarse en el rango normal para el tejido muscular post-mortem el cual va de 5,5 - 7,0 (Decker *et al.*, 2005).

Los cambios en el pH de los productos cárnicos se podrían atribuir al crecimiento de bacterias aerobias (Biswas *et al.*, 2012). Por ejemplo Viuda-Martos *et al* (2010), encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de pH inicial y final del experimento de los diferentes tratamientos que estudiaron. La caída en el pH coincidió con el crecimiento gradual de bacterias lácticas, las cuales generan ácido láctico y llegaron a la conclusión de que es muy probable que estos dos factores estén directamente relacionados. Otros estudios han tenido la misma conclusión y corroboran la teoría de que una disminución en el pH puede ser debido a los ácidos producidos por las bacterias ácido lácticas (Candogan & Kolsarici, 2003; Modi *et al.*, 2008).

Aunque la reactividad específica de TBA con MDA no se ve afectada por el pH o el tipo de ácido utilizado, la reactividad con los lípidos peroxidados presentes en la carne se produce a un pH de 3 - 4 y sí se ve afectada por el tipo de ácido presente durante la incubación. Las soluciones acuosas o soluciones muy diluidas de ácido con un pH inferior a 1,60 (pH de la solución de TBA 0,8% en agua destilada) son los más adecuados para reducir la interferencia producida por pigmentos amarillos durante la cuantificación de TBARS en los productos cárnicos frescos cuando las temperaturas de 100 °C y los tiempos de menos de 1 h se utilizan para la incubación (Díaz *et al.*, 2014).

3.3 DETERIORO MICROBIOLÓGICO DE CÁRNICOS

Debido al alto contenido de agua y la gran cantidad de nutrientes disponibles en su superficie, los productos cárnicos son conocidos como uno de los alimentos más perecederos. Además de daños físicos, oxidación y cambios en su color, otro factor importante de deterioro es el crecimiento indeseado de microorganismos. Este deterioro bacteriano conlleva al desarrollo de olores desagradables y a la aparición de sustancias viscosas en su superficie, lo que provoca que el producto no sea aceptado por los consumidores (Mateauda, 2013).

El deterioro en cárnicos puede ser causado por una amplia variedad de factores, tales como manipulación incorrecta, exposición al aire y temperaturas inadecuadas de almacenamiento las cuales desencadenan reacciones químicas o el crecimiento microbiano. Sin embargo, la causa más común es la presencia de microorganismos. Se considera que un producto cárnico se encuentra deteriorado principalmente cuando se presentan sabores y olores extraños, pero el rechazo de los consumidores también se puede deber a cambios en el color, empaques dañados, acidificación,

viscosidad en la superficie y otras alteraciones de la calidad de la carne. No obstante, la carne también puede contener patógenos sin mostrar signos de deterioro (Gram, 2005).

Diferentes factores tanto internos como externos determinan la microflora que es capaz de crecer en una matriz cárnica. La manipulación pre y post cosecha son los principales factores que afectan el tipo de microorganismos presentes y sus niveles. La temperatura, la humedad y el tiempo de almacenamiento son también factores determinantes para el crecimiento microbiano selectivo. Los microorganismos que intervienen en la descomposición de la carne se originan principalmente en el rumen, los intestinos, la piel, los ganglios, las plumas y en ocasiones la cara del animal, lo cual contamina las superficies de la canal. Además, el manejo por parte de los trabajadores y el contacto con la vestimenta de los trabajadores, los pisos, las paredes y los instrumentos también son fuentes de contaminación (Russell, 2001).

Debido a las diferentes condiciones de procesamiento y almacenamiento, se presenta una microflora distinta en las carnes procesadas en comparación con la presente en carnes frescas y por lo tanto, el deterioro de las carnes procesadas toma diferentes caminos. Las poblaciones microbianas que podrían ser beneficiosas en ciertos productos, tales como bacterias ácido lácticas que promueven la acidificación en embutidos fermentados, pueden ser altamente indeseable en otros productos, tales como jamón o salchichas cocidas, donde causan acidificación. Por lo tanto, el término deterioro depende del producto cárnico (Marshall & Bal'a, 2001).

Los principales factores que determinan el tiempo para la proliferación microbiana en carne y productos cárnicos son la disponibilidad de sustrato, los recuentos microbiológicos iniciales y la temperatura de almacenamiento. Los microorganismos crecen primero en la superficie de la carne ya que ahí se encuentran en abundancia todos los nutrientes necesarios para su crecimiento. Primero utilizan los nutrientes de bajo peso molecular tales como glucosa, glucosa - 6 - fosfato, ribosa, glicerol, aminoácidos y lactato, alterando principalmente sabor, olor y aspecto general. Sólo cuando la tasa de utilización de glucosa es superior a su difusión desde la parte interna se utilizan los aminoácidos (Guerrero-Legarreta, 2009).

La microflora bacteriana habitual de la carne fresca es muy heterogénea y se encuentra principalmente conformada por *Pseudomonas*, géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* sp., *Brochotrix thermosphacta* y *Lactobacillus* sp., que dependiendo de su número y especie pueden causar diferentes alteraciones. Dentro de las bacterias patógenas más comunes se

puede encontrar *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersenia enterocolítica*, *E. coli*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum* (Mateauda, 2013). A continuación se van a describir brevemente algunos de los principales microorganismos promotores del deterioro en productos cárnicos lo cuales se utilizaron en esta investigación.

3.3.1 *Pseudomonas* spp.

Los miembros del género *Pseudomonas* son bacterias que exhiben características metabólicas y nutricionales extremadamente versátiles, lo que les permite utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Gracias a esta versatilidad, estas se encuentran en nichos ecológicos muy diversificados y están ampliamente distribuidas en la naturaleza, en el agua y en los alimentos (Da Silva *et al.*, 2013). Es de conocimiento común que la carne se descompone rápidamente bajo condiciones aeróbicas. Esto es causado por el rápido crecimiento de *Pseudomonas* spp. (Kamenik, 2013).

Pseudomonas spp. está frecuentemente involucrada en el deterioro de los alimentos cárnicos y lácteos refrigerados. *Pseudomonas* spp. tiene las siguientes características principales: son aerobias, Gram negativas, con forma de bastones, móviles, tienen reacciones positivas a la oxidasa y catalasa y producen la deaminación de la arginina. Son principalmente psicrófilas, con temperaturas óptimas de crecimiento entre 20 °C y 25 °C, pero crecen significativamente a las temperaturas de refrigeración (0 °C - 10 °C). Algunas especies atacan los carbohidratos oxidándolos, algunas reducen los nitratos y el óxido de trimetilamina a trimetilamina, otras son frecuentemente lipolíticas. Algunas son pigmentadas y producen colores amarillos, verdes y azulados. Son muy comunes en el suelo y el agua y son poco resistentes al calor. Producen malos olores y sabores en los alimentos cuando se encuentran poblaciones del orden de 1×10^7 UFC/g y 1×10^8 UFC/g por la presencia de sustancias viscosas (Barreiro & Sandoval, 2006).

Varias especies de *Pseudomonas* spp. resultan patógenas para las plantas y varias son patógenas oportunistas para los seres humanos, siendo estas asociadas con infecciones en personas con sistemas inmunológicos debilitados. La especie de *Pseudomonas* más común encontrada en seres humanos es la *Pseudomonas aeruginosa*, pero *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas balearica*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas mosselii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas*

stutzeri y *Pseudomonas seudoalcaligenes* también son especies que han sido aisladas en clínicas (Da Silva *et al.*, 2013).

A pesar del alto número de microorganismos, solamente pocas especies de deterioro dominan debido a la temperatura, el tiempo de almacenamiento y el envasado en atmósferas modificadas, ya que estas las diferentes condiciones de almacenamiento de los productos cárnicos pueden afectar tanto el crecimiento microbiano como la selección de especies. En carne refrigerada y almacenada aeróbicamente, miembros de los géneros *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Psychrobacter* spp. y *Moraxella* spp. son las que presentan las tasas de crecimiento más rápidas (Casaburi *et al.*, 2015). En donde, *Pseudomonas* spp. son las que predominan y ninguno de los otros géneros descritos anteriormente son capaces de competir eficazmente contra ellas. *P. fragi* se considera la principal especie asociada con el deterioro microbiológico en cárnicos, con una incidencia entre 56,7% y 79,0%. Debido a la importancia que *Pseudomonas* spp. tiene en el deterioro microbiológico de los productos cárnicos, diversos estudios se han enfocado en determinar su forma de acción y capacidad de sobrevivir a diversas condiciones de almacenamiento (Mohareb *et al.*, 2015).

3.3.2 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas son un grupo cuya principal característica es la capacidad de fermentar hidratos de carbono y producir ácido láctico. Originalmente, este grupo incluyó cuatro géneros de gran importancia en la producción de alimentos: *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp. y *Streptococcus* sp.. Con el tiempo, estos géneros se subdividieron en nuevos géneros los cuales son: *Carnobacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Fructobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Oenococcus* sp., *Tetragenococcus* sp. y *Weissella* sp. (Axelson, 2004).

En general, las bacterias ácido lácticas son no formadoras de esporas, Gram positivas, anaerobias facultativas y catalasa y oxidasa negativas. El metabolismo de los carbohidratos puede ser homofermentativo, en donde se obtiene principalmente ácido láctico; o heterofermentativo, en donde se obtiene ácido láctico, CO₂ y otros productos de fermentación. Los requerimientos nutricionales de estas bacterias son complejos ya que dependen de la presencia de vitaminas, carbohidratos y otros factores de crecimiento. La temperatura de crecimiento oscila entre 2 °C y 53 °C en donde la temperatura óptima es entre 30 °C y 40 °C (Da Silva *et al.*, 2013).

Lactobacillus sp. es uno de los géneros originales de las bacterias ácido lácticas. Estas bacterias son muy utilizadas en la industria alimentaria y se han reconocido varias cepas como probióticos, incluyendo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* y *L. casei*. En la industria alimentaria se pueden usar como auxiliares en los procesos de fabricación de numerosos productos fermentados como el yogur, leche fermentada, queso, chucrut, pepinillos y los productos cárnicos fermentados o curados. Por el contrario, también actúan como agentes de deterioro en otros productos, incluyendo mayonesa y otros aderezos para ensaladas, vegetales, frutas y jugos de frutas, bebidas gaseosas, cerveza, vino, cárnicos no fermentados y otros alimentos. Estos microorganismos no son patógenos e incluso se encuentran naturalmente en el cuerpo humano (Fontana *et al.*, 2011).

Las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo que ha sido fuertemente asociado con el deterioro de productos cárnicos frescos y cocidos. Por ende, estos siguen siendo un buen indicador del deterioro en productos cárnicos ya que se ha demostrado la aparición de sabores y olores característicos de los productos fermentados que resultan en rechazo por parte del consumidor cuando esta característica no es esperada en el producto final (Nychas & Drosinos, 2014 & Casaburi *et al.*, 2015). Bacterias ácido lácticas tales como *Lactobacillus* sp., *Carnobacterium* sp. y *Leuconostoc* sp. están implicadas en el deterioro de la carne almacenada en atmósferas modificadas, envasadas al vacío e incluso en algunas ocasiones en condiciones aeróbicas. Las especies comúnmente encontradas son *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc* spp. y *Lactobacillus sakei* (Casaburi *et al.*, 2015).

En diferentes estudios se ha encontrado que las bacterias ácido lácticas son las principales bacterias asociadas con el deterioro de productos cárnicos con tratamientos térmicos, volviéndolas una de las bacterias principales por analizar en estudios de vida útil y preservantes para la industria cárnica (Dusková *et al.*, 2016). Sin embargo, en la actualidad se mantiene la discusión de si estos microorganismos contribuyen con la generación de metabolitos ofensivos y la degradación sensorial del producto o si más bien, estos fungen como agentes bioprotectores (Pothekos *et al.*, 2015).

3.3.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertenece a la familia de *Enterobacteriaceae* y es la bacteria más comúnmente encontrada en la materia fecal del hombre y de muchos otros animales de sangre caliente. Su nicho ecológico natural es el intestino delgado y grueso ya que forma parte de la flora nativa intestinal y se encuentra internamente sin causar ningún daño (Donnenberg, 2002). Muchas de sus cepas producen sustancias que son útiles para el hospedero como las colicinas que tienen efecto inhibitorio sobre otras cepas potencialmente patógenas. No obstante también varias cepas son enteropatógenas, aunque no todas son igualmente virulentas. Las cepas patógenas producen infección en las vías urinarias, sepsis, meningitis y enfermedades diarreicas. Los mecanismos patogénicos de *E.coli* son: enteropatógeno, enterotoxigénico, enteroinvasivo, enterocitotóxico, enteroagregativo y difusamente adherente (Romero, 2007).

E. coli es un bacilo Gram negativo, con una sola espiral de ADN, móvil, aerobio o anaerobio facultativo, con flagelos peritricos, la mayoría forma fimbrias y pilis, muchas cepas son capaces de producir micro cápsulas, muy pocas son capaces de producir macro cápsulas y no producen esporas. Además, es positiva al indol, descarboxilasa de lisina, a la fermentación de manitol y produce gas a partir de la glucosa. El genoma de *E. coli* contiene un total de 5000 genes (Romero, 2007).

Por su especificidad, *E. coli* está considerado como un buen índice de contaminación con materia fecal. Además éste puede vivir poco tiempo en el ambiente extraentérico por lo que su presencia en alimentos indica contaminación reciente (Pascual & Calderón, 2000). Añadido a esto, tiene poca resistencia a temperaturas de pasteurización en donde a los 55°C tiene un valor de D de 6,7 minutos y un z de 3.6 °C (Romero *et al.*, 2011).

E. coli O157:H7 es una de las cepas capaces de provocar daños en el cuerpo humano. Esta bacteria fue descubierta por primera vez en 1982 por científicos del “Centers for Disease Control and Prevention” de los Estados Unidos o CDC por sus siglas en inglés. Desde entonces, este microorganismo se ha convertido en una causa mundial de episodios de diarreas y en ciertos casos enfermedades de largo plazo e incluso muertes en humanos (Hayhurst, 2004). Esta bacteria posee la capacidad de sobrevivir en condiciones ácidas (pH 2,5 - 3,0), crecer a muy bajas temperaturas (hasta 7 °C) y permanecer viable durante varios meses en productos congelados. Las características anteriores podrían explicar su baja dosis infectante en el hombre y su persistencia

en el tubo digestivo en los rumiantes, así como en los alimentos con una acidez suficiente para inactivar la mayoría de los microorganismos patógenos (Sánchez *et al.*, 2009 & Fegan *et al.*, 2014).

En la actualidad se ha establecido en el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.40:07), que se deben realizar recuentos de *E. coli* como control de contaminación fecal y para evitar posibles intoxicaciones por alimentos. Además, se ha observado en varios estudios que se utiliza *E. coli* no patógena como la ATCC 25922 como un indicador del comportamiento que podrían tener las cepas patógenas de *E. coli* como *E. coli* O157:H7 (Wang *et al.*, 2013; Holvet *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015 & Belluco *et al.*, 2016). *E. coli* es considerado el indicador de contaminación fecal en alimentos por excelencia (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2013) y es por esto que se utilizó en este estudio como indicador de bacterias Gram negativas y otras Enterobacterias.

3.3.4 *Listeria innocua*

Existen seis especies de listeria: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi* y *Listeria ivanovii*. Las diferentes especies de *Listeria* se pueden diferenciar entre ellas por su capacidad de fermentar los carbohidratos y por su capacidad β -hemolítica. Las especies *L. innocua* y *L. grayi* se consideran no patógenas, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* y *L. welshimeri* rara vez causan infección humana y *L. monocytogenes* se considera la especie más importante desde el punto de vista humano y en relación con los alimentos ya que puede causar una enfermedad conocida como listeriosis (Holley & Cordeiro, 2014). Hoy en día, se sabe que este microorganismo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Dado que *L. monocytogenes* está muy difundida en el medio ambiente, su presencia en los alimentos es inevitable. En la industria alimentaria, *Listeria* spp. se puede encontrar en zonas húmedas, suelos, lavamanos, residuos alimentarios, superficies en contacto con los alimentos, etc. En general, se encuentra en lugares húmedos donde se puedan adherir y formar biofilms (Da Silva, 2013).

L. monocytogenes es un bacilo corto y con extremos redondeados que a veces toma forma de cocabacilo. Mide entre 0,5 μm – 2,0 μm de largo por 0,2 μm - 0,5 μm de grosor. Se presentan aislados, en parejas, en cadenas cortas o en grupos en forma de “V”. Además, es un microorganismo no esporulado, móvil, Gram positivo, anaerobio facultativo, catalasa positivo y tiene la capacidad de crecer bien a temperaturas de refrigeración. La movilidad es gracias a que posee flagelos peritricos, esta movilidad es mejor a temperaturas entre 20 °C - 25 °C. A 37 °C llega

a ser imperceptible o nula ya que se reducen la cantidad de flagelos a uno o dos situados en la región polar. Con respecto a la temperatura de crecimiento, este microorganismo puede crecer a temperaturas de 1 °C - 45 °C, teniendo una temperatura óptima de 30 °C - 37 °C. Es un microorganismo psicrófilo, aunque a temperaturas de 4 °C - 5 °C su crecimiento es más lento. Para poder destruirlo es necesario utilizar temperaturas de al menos 70 °C en la parte más interna del alimento por 2 - 3 minutos. Además, *L. monocytogenes* se puede desarrollar entre valores de pH de 5,0 - 9,0 y con un pH de crecimiento óptimo de 7,5 (Pascual & Calderón, 2000). En productos cárnicos, un tratamiento térmico estándar (temperaturas superiores a 65 °C) es eficaz para eliminar a la *L. monocytogenes*. Sin embargo, estos productos se pueden recontaminar durante el rebanado y su posterior manipulación, lo que hace que la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo sea de especial preocupación (Awaiwanont *et al.*, 2015).

Los síntomas iniciales de las enfermedades transmitidas por los alimentos causadas en los seres humanos por *L. monocytogenes* simulan la gripe con una fiebre persistente. La manifestación de una infección puede limitarse a síntomas gastrointestinales leves como náuseas, vómitos y diarrea o puede avanzar a las infecciones sistémicas más graves y potencialmente mortales tales como septicemia, meningitis, encefalitis e infecciones cervicales o intrauterinas en mujeres embarazadas que pueden resultar en aborto espontáneo o incluso en la muerte (Da Silva, 2013).

El envasado al vacío, el envasado en atmósferas modificadas y los tratamientos por alta presión hidrostática no influyen significativamente en su crecimiento. Por otro lado, el proceso de fermentación impide su multiplicación y consigue su inactivación. Sin embargo, la fermentación no parece ser un método lo suficientemente eficaz como para garantizar por sí solo la eliminación completa de *Listeria spp.* y por tanto para conseguir un producto libre de este microorganismo. El lactato de sodio incrementa la resistencia de *L. monocytogenes* al calor, así la adición del 4,8% de lactato de sodio a muslos de pollo y carne de pato aumenta la resistencia al calor de 55 °C a 70 °C. En cambio, la combinación de 1,8% de lactato de sodio con 0,25% de diacetato de sodio produce una reducción de este microorganismo en comidas listas para llevar durante el almacenamiento de estos productos a 4 °C (Sánchez *et al.*, 2009).

Las sales de cura como el nitrito de sodio aceleran la inactivación de *L. monocytogenes* cuando se tienen valores de pH superiores o iguales a 6,5. Aparte de esto, se ha visto que una gran variedad de desinfectantes como el hipoclorito de sodio, el yodo, los peróxidos y el amonio cuaternario son eficaces contra este microorganismo de forma *in vitro* y en ausencia de materia

orgánica. Sin embargo, en la práctica se ha demostrado que la bacteria posee resistencia a las combinaciones de amonio cuaternario y alcoholes en concentraciones de uso al 100% y de amonio cuaternario con glutaraldehído en concentraciones de uso del 0,3%. Esta resistencia se puede extender a una gran variedad de desinfectantes una vez que este microorganismo forma una biopelícula (Sánchez *et al.*, 2009).

Comúnmente en estudios de *Listeria spp.*, se suele trabajar con *L. innocua* ya que es una cepa que se ha visto que en algunos casos puede llegar a ser incluso más resistente a la mayoría de compuestos antimicrobianos que *L. monocytógenes* y al esta no ser patógena, no representa una amenaza microbiológica en el lugar del estudio (Gómez *et al.*, 2014; Silva-Angulo *et al.*, 2015 & Silva *et al.*, 2015).

3.4 MÉTODOS PARA LA DETERMINAR EL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE UNA SUSTANCIA

En la actualidad, ni los mecanismos de acción ni los métodos para la determinación de la actividad antimicrobiana que tienen los compuestos están completamente definidos. La mayoría de los métodos *in vitro* consisten en añadir un volumen conocido de la sustancia en estudio en forma diluida o no directamente en un tubo o caja Petri que contenga el medio adecuado para el microorganismo en prueba o bien tener el medio estéril y después inocular el microorganismo de interés. Existen diferentes métodos que incluyen las determinaciones de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), la eficacia antimicrobiana y la evaluación del espectro antimicrobiano, entre otros (Reyes-Jurado *et al.*, 2014).

A continuación se describe el método de CMI, el cual es uno de los mayormente utilizados actualmente para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de diferentes compuestos.

3.4.1 Método de concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI de un agente antimicrobiano es la concentración más baja (es decir, concentración mínima) del agente antimicrobiano que logra evitar que un aislado bacteriano se multiplique y produzca un crecimiento detectable a simple vista por el ojo humano en los tubos o pocillos de microdilución (Cockerill *et al.*, 2012). Esta concentración se determina en el laboratorio mediante la incubación de una cantidad conocida de bacterias con diluciones específicas del agente

antimicrobiano. Los resultados luego se interpretan y se categoriza que el microorganismo analizado es sensible, tiene sensibilidad intermedia o es resistente al agente antimicrobiano analizado. Se clasifica como sensible cuando el microorganismo es inhibido por concentraciones bajas y habituales del componente antimicrobiano, de sensibilidad intermedia cuando el microorganismo es inhibido por concentraciones muy altas y difíciles de obtener del componente antimicrobiano y se considera resistente cuando en los niveles posibles de alcanzar del componente antimicrobiano el microorganismo no se ve afectado (Blasetti *et al.*, 2000).

Esta prueba se puede realizar usando caldo o agar, en donde las microdiluciones en caldo son el método más utilizado en los laboratorios clínicos. En la actualidad, varias compañías fabrican paneles CMI que contienen diluciones de uno o varios agentes antimicrobianos en un formato de microdilución en caldo los cuales la FDA prueba y determina si son aptos para la comercialización. La visualización de dispositivos destinados a facilitar la lectura de las pruebas de microdilución y registro de los resultados se pueden usar siempre y cuando no haya compromiso en la capacidad de discernir el crecimiento en los pocillos (Cockerill *et al.*, 2012).

El caldo Mueller-Hinton es el que se recomienda como el medio de elección para las pruebas de un aislado común, en bacterias con un rápido crecimiento en medio aeróbico o para los microorganismos facultativos. El caldo debe tener el contenido de catión divalente adecuado proporcionado por el fabricante (Ca^{++} y Mg^{++}). Una vez preparado el medio, cada lote debe ser probado con un medidor de pH el cual debe estar entre 7,2 - 7,4 a temperatura ambiente (25 °C). Para organismos fastidiosos, el caldo Mueller-Hinton puede ser suplementado con 2% - 5% de sangre lisada de caballo. El rendimiento de cada lote de caldo se evalúa mediante el uso de un conjunto estándar de los organismos de control de calidad (Cavalieri *et al.*, 2005).

Para el método de dilución, se preparan una serie de placas (dilución en agar) o tubos (dilución en caldo) inoculados con un determinado volumen del medio de cultivo que contiene concentraciones progresivas y crecientes del compuesto antimicrobiano que se quiere probar, al cual se le adiciona luego el inóculo bacteriano. Tras un período de incubación establecido, se considera la primera placa o tubo de la serie donde no existe crecimiento del microorganismo como la concentración del antimicrobiano que inhibe el microorganismo, es decir la CMI (Cavalieri *et al.*, 2005).

El método de dilución en caldo es más apropiado cuando se quieren analizar varios compuestos antimicrobianos frente al mismo microorganismo simultáneamente. En donde las diluciones del antimicrobiano se realizan en el mismo caldo el cual se dispone en tubos o en los pocillos de una placa de microtitulación hasta un volumen final de 1 mL por tubo o 0,05 mL por pocillo, teniendo en cuenta que al añadir posteriormente la misma porción de inóculo, las concentraciones del antimicrobiano quedarán a la mitad de las iniciales. Paralelamente se preparan tubos y pocillos control, es decir sin el compuesto antimicrobiano. En el método clínico clásico, el inóculo se ajusta para que este contenga entre 10^5 - 10^6 UFC/mL, lo cual se consigue con un inóculo similar al estándar 0,5 de McFarland diluido al 1/200 en el medio de cultivo. Una vez adicionado el inóculo a los tubos o pocillos, se homogenizan y se incuban a 35 °C - 37 °C durante 18 - 24 horas, preferiblemente en una cámara de humedad y sin CO₂ para proteger que no se produzca evaporación y desecación. La menor concentración de antimicrobiano que produce inhibición total del crecimiento visible representa la CIM, en donde un crecimiento muy tenue no se toma en cuenta (García *et al.*, 1994).

3.5 PRESERVANTES COMUNES EN CÁRNICOS

En la actualidad, muchos productos cárnicos no se podrían fabricar sin agregar aditivos. Según el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.54:10), un aditivo alimentario se define como:

“Cualquier sustancia que no se consume normalmente como alimento por sí misma ni se usa normalmente como ingrediente típico del alimento, tenga o no valor nutritivo, cuya adición intencional al alimento para un fin tecnológico (inclusive organoléptico) en la fabricación, elaboración, tratamiento, envasado, empaque, transporte o almacenamiento provoque, o pueda esperarse razonablemente que provoque directa o indirectamente, el que ella misma o sus subproductos lleguen a ser un complemento del alimento o afecten sus características. Esta definición no incluye los contaminantes, ni las sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales.”

Además, define la dosis máxima de uso de un aditivo como:

“La concentración más alta de éste respecto de la cual la Comisión del Codex Alimentarius ha determinado que es funcionalmente eficaz en un alimento o categoría de alimentos y ha acordado

que es inocua. Por lo general se expresa como mg de aditivo por kg de alimento. La dosis de uso máxima no suele corresponder a la dosis de uso óptima, recomendada o normal. De conformidad con las buenas prácticas de manufactura la dosis de uso óptima, recomendada o normal, difiere para cada aplicación de un aditivo y depende del efecto técnico previsto y del alimento específico en el cual se utilizaría dicho aditivo, teniendo en cuenta el tipo de materia prima, la elaboración de los alimentos y su almacenamiento, transporte y manipulación posteriores por los distribuidores, los vendedores al por menor y los consumidores.”

Una de las categorías más importantes dentro de los aditivos para alimentos son los preservantes o conservantes. Los cuales son compuestos que se utilizan generalmente para reducir o eliminar el crecimiento de hongos, bacterias, levaduras y/o moho o para ligar el oxígeno en los alimentos y atrasar los procesos oxidativos. Algunos beneficios de utilizar preservantes en alimentos son que aumentan la vida útil, ayudan a conservar las características naturales y la apariencia de los productos y previenen el deterioro durante la distribución y/o el almacenamiento (Constantinos & Paraskevas, 2015).

Los preservantes más utilizados en la industria cárnica son los nitratos y nitritos (dosis máxima para cárnicos en el Cuadro I.), los cuales se utilizan con el fin de evitar principalmente la proliferación del *Clostridium botulinum*. Conjunto a esto, los nitritos son los responsables de otorgarles tanto el color como el sabor característico a los productos cárnicos curados. Los nitritos producen óxido nítrico (N_2O) el cual reacciona con la mioglobina del músculo para producir nitrosomioglobina la cual fija o mantiene el color rojo deseado de carne (Constantinos & Paraskevas, 2015). Aunque los nitritos se añaden principalmente para curar carne, estos actúan como un aditivo multifuncional. Aparte de otorgar el color y poseer actividades antimicrobianas como se explicó anteriormente, los nitritos también estabilizan el sabor y retrasan el proceso de oxidación de los lípidos debido a su naturaleza antioxidante (Subramanian *et al.*, 2014). El efecto antioxidante del nitrito se debe a los mismos mecanismos responsables por el desarrollo del color a curado ya que en estas reacciones se quelatan los radicales libres por el óxido nítrico y se forman compuestos nitroso- y nitrosil los cuales poseen capacidades antioxidantes (Sindelar & Milkowski, 2011).

Los lactatos de sodio y potasio (dosis máxima para cárnicos en el Cuadro I.) son sales del ácido láctico presentes de forma natural en el tejido animal. Estas poseen propiedades antibacterianas tanto contra microflora no patógena como patógena debido a que este incrementa la fase de

latencia de los microorganismos. En donde se ha demostrado que el lactato de sodio logra inhibir el crecimiento de un amplio rango de bacterias Gram positivas, Gram negativas, microorganismos putrefactores y bacterias patógenas entre ellos *Salmonella sp.*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *C. botulinum*. Unido a esto, los lactatos reducen los valores de a_w y la formación de exudados en productos cárnicos lo cual provoca un aumento en su vida útil. Además, el ion lactato promueve la estabilidad del color y por ende, este aditivo puede dirigirse tanto a la seguridad como la calidad del producto final (Begoña, 2007 & Bernal, 2009).

El diacetato de sodio (dosis máxima para cárnicos en el Cuadro I.) es una mezcla de acetato de sodio y ácido acético, el cual es utilizado como agente antimicrobiano, intensificador del sabor y estabilizador de pH en alimentos. En productos cárnicos, se ha determinado que el diacetato de sodio puede retrasar el crecimiento de microorganismos de deterioro en productos procesados, curados y frescos. Aun en cantidades pequeñas de diacetato de sodio puede significar la extensión de la vida de anaquel de los productos cárnicos (Bernal, 2009). Comúnmente, se suelen utilizar en productos cárnicos mezclas de preservantes siendo la mezcla de lactato con diacetato una de las más comunes. Esto se debe, a que se ha encontrado que presentan un efecto sinérgico en donde aumentan su capacidad inhibitoria a la proliferación de *L. monocytogenes* y presentan un buen balance de sabor (Begoña, 2007).

En el decreto N° 35079-MEIC-MAG-S se pueden encontrar todos los aditivos alimentarios permitidos para productos cárnicos junto con su función y su dosis máxima de uso. En la clasificación de productos cárnicos se incluyen todos los tipos de productos cárnicos, de aves de corral y caza, en piezas y cortados o picados, frescos elaborados. En el siguiente cuadro se enlistan los aditivos permitidos como antioxidantes y/o preservantes:

Cuadro I. Aditivos de uso permitidos en la “Salchicha”, el “Salchichón”, la “Mortadela” y el “Chorizo”.

Sustancia	Funciones tecnológicas	Dosis máxima admisible y restricción de uso
Ácido ascórbico y sus sales	Antioxidantes, aceleradores de curación.	2000 mg/kg
Ácido eritórbico y sus sales	Antioxidantes, aceleradores de curación.	1000 mg/kg
Ácido cítrico y citrato de sodio	Anticoagulante, acidificante, antioxidante.	3000 mg/kg

*MEIC-MAG-S, 2009.

Continuación del Cuadro I.

Sustancia	Funciones tecnológicas	Dosis máxima admisible y restricción de uso
BHA (Butilhidroxianisol) y BHT (Butrilhidroxitolueno) TBHQ (Terbutilhidroxiquinona) PG (Propilgalato)	Antioxidantes	100 mg/kg referido al contenido de grasa en uso individual y hasta un máximo de 200 mg/kg en mezclas, en productos frescos. 30 mg/kg en productos deshidratados.
Diacetato de sodio	Conservante natural.	2500 mg/kg
Nitrato de sodio y nitrato de potasio	Fijador de color y preservante.	Únicamente en productos madurados. 365 mg/kg residuales como nitrito.
Nitrito de sodio y nitrito de potasio	Fijadores de color y preservante.	125 mg/kg
Sorbato de potasio	Antioxidante, preservante y estabilizante	En soluciones de 20000 mg/kg para ser aplicadas por inmersión o aspersion, solo en forma externa.
Lactato de sodio y lactato de potasio	Regulador de acidez, emulsificante, estabilizante y conservante natural.	48000 mg/kg

*MEIC-MAG-S, 2009.

Aunque estos preservantes se han utilizado durante años en la industria alimentaria y han sido aprobados para el consumo humano, el consumidor actual ha empezado a buscar alternativas más naturales y por ende en el campo se ha comenzado a investigar diversas plantas y extractos naturales para utilizarlos en lugar de los aditivos comúnmente usados como se explicó al inicio del documento.

3.6 POSIBLES PRESERVANTES NATURALES PARA LA INDUSTRIA CÁRNICA

3.6.1 Orégano

El nombre de orégano (Figura 4.) se deriva del griego en donde oros significa "montaña" y ganos "alegría". La planta crece en forma silvestre en las montañas de Grecia y es comúnmente llamada mejorana silvestre. Los griegos lo utilizaron como un medicamento para las heridas y se solía recomendar para picaduras de escorpión y mordeduras de araña. Los colonos lo trajeron a

América, donde se incorporó en el medio natural. En la literatura, investigadores han encontrado al menos 61 especies de 17 géneros pertenecientes a seis familias bajo el nombre de orégano. La familia *Lamiaceae* es considerada como el grupo más importante que contiene el género *Origanum* que proporciona la fuente de las especias de orégano conocidas. Dos géneros de la familia *Verbenaceae* se utilizan para la producción de hierbas orégano. Las otras familias (*Rubiaceae*, *Scrophulariaceae*, *Apiaceae* y *Asreraceae*) tienen una importancia limitada. Sin embargo, en el mercado se puede encontrar con frecuencia las hierbas de las familias mencionadas anteriormente bajo el nombre de orégano (Mikri, 1998).



Figura 4. Planta de orégano (*Origanum vulgare*).

El orégano (familia *Lamiaceae*) tiene tallos cuadrados con hojas aromáticas opuestas. Las flores se disponen en grupos en la base de las hojas más altas o en espigas terminales. Las flores individuales tienen dos labios, los superiores de dos lóbulos y los inferiores de tres lóbulos. Cada flor produce, cuando madura, cuatro pequeñas semillas. El follaje está lleno de pequeñas glándulas que contienen el aceite volátil o esencial que le da a la planta su aroma y sabor. El orégano es una especie perenne que crece espontáneamente en las zonas en toda la región mediterránea, especialmente en lugares altos. En estas áreas el orégano se cosecha principalmente de las poblaciones silvestres, una o dos veces al año, en la etapa de floración (Mikri, 1998).

Hoy en día, las partes de plantas de orégano y extractos bioquímicos de esta se utilizan comúnmente en la industria alimentaria como especia. El orégano puede ser considerado una de las especias más importantes en todo el mundo, en donde su popularidad es cada vez más creciente como resultado de los avances científicos alcanzados en el ámbito de su cultivo y utilización. Además, está en aumento su producción y nuevas variedades interesantes se han

desarrollado, lo que contribuye a ampliar el horizonte de su aplicación real (Mikri, 1998; Almeida *et al.*, 2013; De Falco *et al.*, 2014).

El aceite esencial del orégano es reconocido como un agente antimicrobiano natural el cual incluso en la Unión Europea ya se encuentra clasificado como un aditivo alimenticio. La composición química del aceite esencial puede variar dependiendo de la temporada, el clima y la locación geográfica (Muriel-Galet *et al.*, 2015). Los principales compuestos del aceite esencial del *O. vulgare* son carvacrol y timol, los cuales se encuentran en concentraciones aproximadas de 15% - 20% (vol/vol) respectivamente dependiendo del quimiotipo. Estos dos compuestos son algunos de los componentes principales de productos antimicrobianos los cuales se encargan de dañar la membrana externa de varios tipos de bacterias (Kulisic *et al.*, 2004 & Pesavento *et al.*, 2015).

Varios estudios describen el amplio rango de efecto antimicrobiano que posee este aceite esencial contra patógenos encontrados en alimentos (De Falco *et al.*, 2014; Boskovic *et al.*, 2015; Martucci *et al.*, 2015 & Muriel-Galet *et al.*, 2015). Por ejemplo, De Falco *et al.* (2014) encontraron que la actividad antimicrobiana del orégano se encontraba directamente relacionada con la cantidad de compuestos fenólicos presentes como el carvacrol. Conjunto a esto, Hulankona *et al.* (2013) encontraron que al utilizar aceite esencial de orégano en carne fresca empacada al vacío inoculada con *L. monocytogenes*, se logra reducir hasta 2,5 log de *L. monocytogenes* y bacterias psicrófilas y hasta 1,5 log de bacterias ácido lácticas. Además, en un estudio sobre la actividad antioxidante de varias plantas aromáticas reportaron que el aceite esencial del orégano posee un considerable efecto antioxidante en el proceso de oxidación de manteca (Kulisic *et al.*, 2004). Sin embargo, el uso de orégano como un aditivo alimenticio es limitado debido a su intenso aroma y sabor que podría provocar que propiedades sensoriales de algunos productos se consideren inaceptables por los consumidores (Muriel-Galet *et al.*, 2015).

3.6.2 Mostaza china

El género *Brassica* se compone de muchas especies que son de gran importancia económica para la humanidad, proporcionando una gran variedad de verduras, aceites, condimentos de mostaza y cultivos forrajeros. Éstos incluyen *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. nigra*, *B. carinata*, *B. juncea*, y *B. napus*. *B. rapa* exhibe la diversidad genética más próxima a *B. oleracea*, con características morfológicas distintas y subespecies que incluyen mostaza china, pak choi, col china con florcilla,

nabo y brócoli, así como las semillas oleaginosas que incluyen semillas de mostaza amarilla y marrón (Ge *et al.*, 2012) .

La mostaza china o col china (*Brassica rapa var. Pekinensis*, Figura 5.), es una especie que pertenece al género *Brassica* de la familia *Cruciferae*. Esta planta es ampliamente cultivada en Asia y en Europa lo cual posee importancia económica para estos continentes. Esta planta tiene más parecido a la mostaza que a las coles en sí, en donde su sabor es algo más suave que la col común cuando se cocina o se come cruda y se ha utilizado tradicionalmente en sopas, rollos de huevo, salteados y encurtidos. La cabeza de una mostaza china no es redonda como la cabeza de repollo regular, sino más bien, alta como una cabeza de lechuga romana con una amplia nervadura central. La cabeza cónica de la mostaza china es firme y mide entre 15 a 20 pulgadas de largo y de 3 a 5 pulgadas de diámetro. El follaje y envoltorio de hojas exteriores son de color verde, mientras que las hojas internas se escaldan a un color blanco cremoso. Además, tiene el hábito de crecer verticalmente y de llegar a pesar de 2 a 5 libras, con una vida útil de 72 a 80 días teniendo cierta tolerancia a la floración y la mancha bacteriana (Terry, 1999).



Figura 5. Planta de mostaza china (*Brassica rapa var. Pekinensis*)

El aceite esencial de la mostaza china es generalmente reconocido como seguro para la aplicación en alimentos. El componente principal del aceite esencial de la mostaza china es isotiocianato de alilo, el cual es un compuesto volátil no fenólico encontrado en plantas pertenecientes a la familia *Cruciferae*. Muchos estudios han informado que el isotiocianato de alilo inhibe eficazmente una variedad de microorganismos patógenos, incluso cuando se usa a bajas concentraciones (hasta 9,4 ppm) (Turgis *et al.*, 2009).

Además, la mostaza china contiene glucosinolatos, estos son metabolitos secundarios de las plantas. Este compuesto es parte de un importante grupo de fitoquímicos presentes

exclusivamente en 16 familias botánicas del orden *Capparales* y son particularmente abundantes en el género *Brassicaceae*. Estos compuestos y/o sus productos de degradación, son conocidos por sus propiedades como fungicida, bactericida, nematocida y alelopáticos y recientemente ha atraído el interés de diversos investigadores por sus atributos quimioprotectores en cáncer (Kim *et al.*, 2010). Samec *et al.*(2011), en su investigación determinaron que la mostaza china posee una capacidad antioxidante incluso mayor a la actividad del col blanco, el cual es conocido mundialmente como una planta con capacidad antioxidante y antiinflamatoria debido los compuestos fenólicos y flavonoides que posee, dando así un indicio de la posibilidad de usar extractos de esta planta como un antioxidante y antimicrobiano en productos alimenticios.

3.6.3 Oleorresinas

Los aspectos que hacen a las especias valiosas son sus aceites volátiles y oleorresinas. Mediante el uso de diferentes tipos de extractos aromatizantes y especias, la industria alimentaria muestra el valor y la versatilidad de muchas maneras. Por sí mismas, las especias no son muy convenientes para usar en los alimentos debido a que no transmiten sus sabores fácilmente. Las especias finamente molidas tienen muchas desventajas, tales como la variabilidad de sabor y calidad, pérdida de sabor durante el almacenamiento, la decoloración de los alimentos y la dificultad de manejo en tamaños a granel. Debido a estas desventajas, muchas especias naturales han sido sustituidas por aceites esenciales, oleorresinas, especias encapsuladas, emulsiones y esencias (Coggins, 2001).

Las oleorresinas preparadas contienen componentes aromatizantes volátiles y no volátiles de especias, así como otros ingredientes no volátiles que incluyen aceites, antioxidantes, pigmentos, y otros extractos solubles en el disolvente particular utilizado. Estas presentan el aroma y sabor de la especia y proporcionan el color (Kalemba & Wajs, 2011). Las oleorresinas son generalmente muy viscosas y a menudo tienen que ser diluidas con glicol de propileno para obtener una mayor fluidez y estabilidad. Muchas compañías ofrecen sabores de oleorresinas que están estandarizados con mono-, di-, y triglicéridos, lecitina y ácido láctico y que son fáciles de dispersar. Estas oleorresinas pueden añadirse directamente a la mezcla formulada y no tienen que ser dispersadas en un vehículo comestible (Coggins, 2001).

Hay tres métodos diferentes que se utilizan en la industria comúnmente para capturar el sabor y las características de las especias para preparar todos los extractos, oleorresinas, y aceites

esenciales. El primer método es la infusión o maceración, en donde las especias se colocan directamente en un disolvente y se dejan reposar hasta que el sabor se ha extraído. Todo el proceso puede tomar tan poco como un día o hasta un mes. La longitud de tiempo depende del tamaño de partículas de especias, la extracción de disolvente, la temperatura y la agitación mecánica. El segundo método es la percolación, en este caso un sistema de disolvente se coloca en el fondo del tanque y las especias se ponen en un recipiente en la parte superior del tanque en bolsas de tela. El disolvente en la base es forzado hacia arriba dentro del recipiente que contiene la especia molida. El disolvente se rocía sobre las especias y se deja gotear a la base y se repite una y otra vez, hasta que se han extraído todos los sabores acumulados. El último método es la destilación. Para este método, las hojas, semillas y cáscaras se colocan en un destilador y se cubren con un disolvente. La destilación se produce ya sea atmosféricamente o bajo presión reducida. El sabor puede ser soluble o insoluble en el destilado, dependiendo del disolvente que se utilice. Los destilados que resultan son incoloros, en comparación con los producidos por maceración o percolación, que conservan el color de las especias de las que se obtuvieron (Coggins, 2011).

En comparación con los aceites esenciales, en general las oleorresinas contienen menos componentes ya que solo se extraen los compuestos solubles en el disolvente utilizado para la extracción. Sin embargo, se han realizado múltiples estudios comparando oleorresinas y aceites esenciales de diferentes especias en cuanto a su capacidad antioxidante y antimicrobiana y se han encontrado que las oleorresinas suelen también tener ambas capacidades (Singh *et al.*, 2013 & Bellik, 2014). Incluso, Bellik (2014) en su estudio de la capacidad total antioxidante y antimicrobiana de la oleorresina y el aceite esencial de jengibre encontró que para ambas propiedades, la oleorresina utilizada presentó mejores resultados que el aceite esencial. Por ende, el uso de oleorresinas en la industria como aditivo alimentario resulta prometedor ya que usualmente estas suelen tener un menor precio que los aceites esenciales comerciales, son más fáciles de obtener y presentan una buena estabilidad y vida útil.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO

El secado de las hierbas para la producción del polvo y la elaboración del gel cárnico se realizó en la Planta Piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica. Los análisis químicos se realizaron en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica (UCR) y los análisis microbiológicos en el Laboratorio de Microbiología del CITA.

4.2 MATERIALES

4.2.1 Materia Prima

4.2.1.1 Hojas frescas

Las hojas frescas de orégano y mostaza china se obtuvieron en Procesados Frescos S.A, en donde se solicitaron tres lotes diferentes, los cuales se recolectaron y transportaron en igualdad de condiciones hasta la Escuela de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica. Éstos se mezclaron y procesaron tal como se describe en la Sección 4.3.

4.2.1.2 Oleorresina de orégano

Se utilizó un solo lote de una oleorresina de orégano comercial marca Trilogy Essential Ingredients®, el cual contiene un mínimo de 15 mL de aceite por cada 100 g de oleorresina. Esta oleorresina se almacenó en un recipiente de vidrio color ámbar a temperatura ambiente en un lugar fresco y lejos de la luz solar. La vida útil de esta oleorresina almacenada de la forma anteriormente descrita, es de 12 meses.

4.2.1.3 Carne

Se compró carne de pollo y tocino de cerdo de una casa comercial. Para ambos casos se adquirió un solo lote con el fin de disminuir al máximo la variabilidad de las materias primas de la

investigación. Durante el estudio estas materias primas se almacenaron dentro de una cámara de congelación a -18°C .

4.2.2 Cultivos bacterianos

Para las pruebas microbiológicas se utilizaron los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 11443 adquiridas en el CITA. Por último, se utilizó *Listeria innocua* ATCC 33091 adquirida en la Escuela de Tecnología de Alimentos de la UCR.

4.3 OBTENCIÓN DEL POLVO DE LAS ESPECIAS

Las hojas de orégano y mostaza china frescas, se lavaron bien bajo el chorro de agua del grifo. Luego se desinfectaron en una disolución de hipoclorito de sodio a 100 ppm durante dos minutos. Se escurrió el exceso de agua de las hojas con una centrífuga manual y luego éstas se colocaron en bandejas con un espesor de 3 cm dentro de un secador de cabina marca The National Drying Machinery Co. modelo Tray Dryer TY2 48397 a una temperatura de $70 \pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta obtener un producto con una humedad final de 10% - 12% (Ringuelet *et al.*, 2008; Binda *et al.*, 2010; Santillán *et al.*, 2011; Tonguino, 2011). Una vez secado el producto se realizó una molienda en un molino de martillos marca Homoloid Machine® modelo Fitzmill con una malla con agujeros de 0,33 plg.



(a)

(b)

Figura 6. Hojas de orégano (a) y mostaza china (b) listas para ser procesadas.

4.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ORÉGANO EN POLVO Y EN OLEORRESINA Y DE LA MOSTAZA CHINA EN POLVO EN UN GEL CÁRNICO

Se utilizó un diseño irrestricto al azar con un arreglo factorial 7 x 5, en donde el primer factor corresponde a las diferentes especias y presentaciones a utilizar (Cuadro II). El segundo factor es el tiempo de almacenamiento en los que se llevó a cabo el análisis (0, 5, 10, 15 y 20 días), éste se utilizó como factor nominal para los análisis del IP y el valor de número de TBA y como continuo para análisis del pH.

Cuadro II. Tratamientos utilizados en un gel cárnico para evaluar la capacidad antioxidante del polvo y oleorresina de orégano y del polvo de mostaza china.

Tratamiento	Concentración
Orégano en polvo 1 (OP 1,0%)	1,0%*
Orégano en polvo 2 (OP 0,5%)	0,5%*
Mostaza china en polvo 1 (MP 1,0%)	1,0%*
Mostaza china en polvo 2 (MP 0,5%)	0,5%*
Oleorresina de orégano 1 (OO 0,4%)	0,4%*
Oleorresina de orégano 2 (OO 0,6%)	0,6%*
Control con nitrito	156 ppm**

*La concentración fue determinada mediante pruebas sensoriales de tortas de carne en donde el sabor obtenido no fuera rechazado por el consumidor. La concentración se encuentra en % m/m.

** La concentración de NaNO_2 de 156 ppm se seleccionó de tal forma que se obtuviera una concentración residual igual a 125 ppm en el gel cárnico, la cual es la concentración definida como el límite máximo permitido para embutidos (MEIC, 2010).

Se realizaron tres repeticiones independientes del experimento. En el caso del orégano en polvo y de la mostaza china en polvo, el adquirir tres lotes diferentes de las hojas frescas y luego generar una única mezcla, sirvió para incorporar la variabilidad de la materia prima. Las variables respuesta que se analizaron son pH, TBA e índice de peróxidos, en donde cada una de las mediciones se realizó por duplicado.

Una vez obtenidos los resultados de cada una de las pruebas se realizó un ANDEVA para determinar si había un efecto significativo del tiempo o del tratamiento utilizado y si había interacción entre ellos. En los casos en donde se encontraron diferencias significativas, se empleó la prueba de comparación de medias de Tukey para determinar cuál o cuáles tratamientos (Cuadro II) o tiempos eran diferentes. En los casos en donde no se encontró un efecto significativo, se reportó la potencia de la prueba. Se utilizó un $\alpha = 0.05$.

4.4.1 Elaboración del gel cárnico

Para la elaboración de la emulsión cárnica se siguió el procedimiento descrito por Morales, 2013. La composición del gel fue de agua destilada, carne de pechuga de pollo, tocino, cloruro de sodio y tripolifosfato de sodio.

Se separó con un cuchillo de acero inoxidable la piel, los huesos y la grasa superficial de las pechugas de pollo previamente refrigeradas, con el fin de que estas porciones no interfirieran en la cantidad de grasa y en la medición de textura de los geles cárnicos formulados. Luego se realizó una reducción de tamaño de la carne de pollo deshuesada y desgrasada y del tocino pasándolos por un molino para cárnicos marca Alfa-Laval modelo Krämer Grebe Wetter con un tamiz con aberturas de 3 mm de diámetro.

Por último, se mezcló la carne de pollo y el tocino molidos en un procesador de alimentos con el resto de los ingredientes que se detallan en el Cuadro III durante 1 minuto a 4 °C.

Cuadro III. Formulación del gel cárnico control*.

Ingredientes	Porcentaje (g/100 g de gel cárnico)
Agua	22,7
Carne de pechuga de pollo molida	50,0
Tocino	25,0
Sal	2,0
Tripolifosfato de sodio	0,3

*Se utilizó carne de pollo por ser una materia prima de bajo costo y se utilizó el tocino como fuente de grasa animal. La proporción 2:1 de carne: tocino se estableció para lograr obtener una emulsión estable (Choi *et al.* 2011 & Morales, 2013).

Posteriormente, la pasta obtenida se colocó dentro de tubos de centrifuga de 50 mL y se centrifugaron a 1 251 G durante 1 minuto para eliminar las burbujas de aire en una centrífuga marca Eppendorf modelo Centrifuge 5810 R (15 amp version). Los geles se llevaron a una temperatura de 20 °C durante 10 minutos en un baño de agua para estabilizar la mezcla. Una vez que se alcanzó la temperatura de 20 °C la pasta se llevó a una temperatura interna de 90°C, aumentando el calor a una velocidad de 2 °C/min y se mantuvo a esta temperatura durante 20 minutos según la recomendación de Choi *et al.* 2011. Terminado el tiempo de cocción, los tubos de centrifuga con la emulsión cárnica, se sumergieron en un baño de agua con hielo durante 20 minutos y se refrigeraron a 5 °C durante 24 horas.

El gel cárnico se preparó con cada tipo de especia (Cuadro II) y para cada tiempo de almacenamiento (0, 5, 10, 15 y 20 días) por duplicado. Se estableció el tiempo máximo de 20 días ya que según el estudio realizado por Lee *et al.* (2010) en 14 días se podía observar las curvas de oxidación en productos cárnicos usando un extracto de mostaza china en carne molida de cerdo refrigerada y se decidió aumentar los días de almacenamiento para observar resultados en mayor tiempo.

Para obtener la concentración de 156 ppm de NaNO_2 se utilizó una sal de cura con 6,5 % (m/m) NaNO_2 . Por lo tanto, por cada 100 g de gel cárnico se agregaron 240 mg de sal de cura 6,5 %. En cuanto estuvieron listas las muestras, éstas se empacaron en bolsas de polietileno de alta densidad (HDPE) selladas y se almacenaron a 5 ± 1 °C durante el tiempo correspondiente para los análisis. Se llevaron a cabo 3 repeticiones.



(a)

(b)

Figura 7. Mezcla homogenizada para la elaboración de los geles cárnicos (a) y geles cárnicos listos (b).

4.4.2 Evaluación del pH del gel cárnico

Para la evaluación del pH, se siguió el procedimiento explicado por Biswas *et al.* (2012), el cual se explica a continuación.

El pH de la muestra de gel cárnico se midió con un pHmetro digital marca Metrohm modelo 827 pH lab equipado con un electrodo de vidrio combinado el cual debe estar calibrado con un máximo de 24 horas antes del análisis y debe presentar una curva de calibración entre 95% - 105%. La mezcla se preparó tomando una fracción de 10 g del gel cárnico y homogeneizándolo con 50 mL de agua destilada utilizando un homogeneizador de alta velocidad. Luego se colocó el electrodo del pHmetro dentro de la mezcla y se esperó hasta que este se estabilizara para tomar la medición. La medición se realizó a un temperatura de 23 °C - 25°C.

4.4.3 Evaluación del índice de peróxidos

Para la evaluación del índice de peróxidos se utilizó el procedimiento de la AOAC 965.33 (AOAC, 2005), detallado a continuación, con un pretratamiento de la muestra referente a la extracción de la grasa con hexano.

Para la extracción se utilizó una relación de 3:1 de disolvente - muestra y se colocó un agitador magnético durante 1 hora. Posterior a esto, se dejó la mezcla en reposo para favorecer la separación de fases y una vez separadas se procedió a decantar. Seguidamente, se filtró haciendo uso de un embudo Buchner y papel Whatman No. 4. El filtrado se colocó en el rotavapor marca BÜCHI modelo Rotavapor R-124 para eliminar el disolvente y recuperar la grasa, la cual se utilizó para el análisis.

Se pesó $5,00 \pm 0,05$ g de la grasa extraída en un Erlenmeyer de 250 mL seco y con tapón de vidrio. Luego se agregaron 30 mL de $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{COOH}$, y se agitó para disolver. Se añadió 0,5 mL de disolución saturada de KI con una micropipeta, se dejó reposar con agitación ocasional 1 min, y se agregó 20 mL de H_2O . Se valoró lentamente con 0,01 M de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ con agitación vigorosa hasta que el amarillo casi hubiera desaparecido. Por último, se añadieron 0,5 mL de disolución de almidón al 1 % y se continuó la titulación, agitando vigorosamente para liberar todo el I_2 de la capa de CHCl_3 , hasta que el azul casi desapareciera.

Se realizó la determinación en un blanco (debe ser $\leq 0,1$ mL de 0,1 M de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Se restó a la titulación de la porción de la prueba.

El índice de peróxido se calculó según la ecuación 1.

$$\text{índice de peróxido } \left(\frac{\text{mEq}}{\text{kg}} \right) = \frac{S \times M \times 1000}{g \text{ porción de prueba}} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde S son los mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (corregido con el blanco) y M es la molaridad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

4.4.4 Evaluación del valor del número de ácido tiobarbitúrico

Para el análisis del valor de número de TBA se siguió el procedimiento descrito por Kirk *et al.* (2011), el cual se explica a continuación:

Se tomó una muestra de 10 g de cada uno de los geles cárnicos modelo y se maceró con 50 mL de agua durante dos minutos. Posteriormente, se “lavó” en un matraz de destilación con 47,5 mL de agua, y luego se adicionó ácido clorhídrico 4 mol/L para alcanzar el pH 1,5, seguido por una preparación antiespumante y algunas perlas de vidrio. El matraz se calentó con una plantilla eléctrica hasta que se recolectaron 50 mL de destilado en 10 minutos, a partir del comienzo de la ebullición. Luego, se pipetearon 5 mL del destilado a un tubo de vidrio con tapón y se agregaron 5 mL de reactivo TBA (0,2883 g TBA/100 mL de ácido acético glacial al 90%). La mezcla anterior se tapó, agitó y calentó en un baño a ebullición durante 35 minutos. Simultáneamente, se preparó de forma similar un blanco con 5 mL de agua y 5 mL de reactivo. Los tubos posteriormente fueron enfriados en agua durante 10 minutos y se determinó la absorbancia (D) comparada con el blanco a 538 nm en celda de 1 cm en un espectrofotómetro marca Jasco modelo V-630 Spectrophotometer (ecuación 2).

$$N^{\circ} \text{ de TBA (como mg de aldehído malónico por kg de muestra)} = 7,8 \times D \quad \text{(Ecuación 2)}$$



Figura 8. Sistema de destilación para la determinación del valor del número de TBA.

4.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ORÉGANO EN POLVO Y EN OLEORRESINA Y DE LA MOSTAZA CHINA EN POLVO

Se analizó cada microorganismo (Sección 4.2.2) tratado con cada uno de los diferentes tratamientos (Cuadro IV) según la turbidez presentada en el tubo y se clasificaron en microorganismos sensibles, con sensibilidad intermedia o resistentes.

Cuadro IV. Tratamientos utilizados para el análisis de la capacidad antimicrobiana del polvo y oleorresina de orégano y del polvo de mostaza china.

Tratamiento	Concentración
Orégano en polvo 1 (OP 2,0%)	2,0%*
Orégano en polvo 2 (OP 1,0%)	1,0%*
Mostaza china en polvo 1 (MP 2,0%)	2,0%*
Mostaza china en polvo 2 (MP 1,0%)	1,0%*
Oleorresina de orégano 1 (OO 2,0%)	2,0%*
Oleorresina de orégano 2 (OO 0,6%)	0,6%*
Control**	500 ppm de NO ₂ + 2,0% diacetato de sodio + 4,8% lactato de sodio

*La concentración se encuentra en % m/m. Estas concentraciones se determinaron por medio de pruebas preliminares para determinar la cantidad máxima de especia que se podía manipular por pipeta volumétrica o micropipeta para poder dispensar el volumen necesario.

**La concentración del control se determinó por medio de pruebas preliminares en donde se probaron diferentes mezclas hasta encontrar la concentración de aditivos que permitiera que el resultado fuera catalogado como sensible (sin turbidez visible en el tubo).

Se probaron las mismas concentraciones utilizadas para el análisis de la capacidad antioxidante (Cuadro II) y se encontró que para todos los tratamientos los microorganismos eran resistentes. Se hicieron pruebas preliminares con concentraciones más altas y se encontró que no se puede aumentar la concentración de los tratamientos a más del 2,0% ya que la consistencia espesa de estos no permite que puedan dosificarse con micropipeta ni con pipeta volumétrica. Se realizaron tres repeticiones independientes del experimento en donde se realizó una única réplica para cada tratamiento en tubo y por duplicado los recuentos en placa como método confirmatorio. En el caso

del orégano en polvo y la mostaza china en polvo, al adquirir tres lotes diferentes de las hojas frescas y luego generar una única mezcla, se incorporó para considerar la variabilidad de la materia prima.

Con los tubos que no presentaron turbidez visualmente, es decir en los cuales se presentó sensibilidad al tratamiento por parte del microorganismo, se realizó un recuento total en agar estándar a 35 °C por 48 horas. En este caso, la variable respuesta fue el recuento bacteriano final promedio por cada tratamiento que presentó sensibilidad. Una vez obtenidos los resultados de cada una de las pruebas se realizó un ANDEVA para determinar si existen diferencias significativas entre alguno de los tratamientos para cada microorganismo que mostraron sensibilidad y se sacaron conclusiones con base en estos resultados. Este análisis se realizó con un $\alpha = 0,05$.

4.5.1 Método *in vitro* de la actividad antimicrobiana

En esta parte se utilizó la prueba de concentración mínima inhibitoria o CMI de acuerdo con la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) y los lineamientos descritos en el M07-A9 (NCCLS, 2012) con modificaciones que se describen a continuación.

Primero se procedió a acondicionar los microorganismos en agar tripticasa soya. Una vez obtenido un crecimiento considerable se rayó una placa con agar estándar y se incubó por 18 horas a 35 °C para realizar la prueba con colonias frescas. Con las colonias listas se preparó un McFarland 0,5 para cada microorganismo el cual posee entre $1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL. Este McFarland se diluyó en Caldo Mueller Hinton (MHB, por sus siglas en inglés) hasta obtener aproximadamente 1×10^3 UFC/mL.

Los tratamientos descritos en el Cuadro IV se prepararon con el doble de la concentración en MHB. Para el caso de la oleoresina de orégano se agregaron 2 gotas de Tween 80 con el fin de que ésta se lograra dispersar bien en la disolución (Weerakkody *et al.*, 2010). Una vez listos los tratamientos se colocaron en una plantilla eléctrica hasta que se alcanzara una temperatura de 80 °C y se mantuvo durante 10 minutos para eliminar la carga microbiológica inicial que los polvos o la oleoresina poseen naturalmente (lo cual se corroboró tomando una asada de los tratamientos y rayando placas por duplicado en agar tripticasa de soya las cuales se incubaron a 35 °C por 48 horas y se observó crecimiento microbiológico solamente en las especias sin tratar térmicamente) y de esta forma evitar crecimiento de microorganismos diferentes a los inoculados que podrían provocar resultados falsos (Stanojevic *et al.*, 2010).

A un tubo de ensayo se agregaron 2 mL del tratamiento previamente tratado térmicamente y 2 mL de la dilución del microorganismo con una concentración de 1×10^3 UFC/mL. Esto permitió que el tratamiento se diluyera a la mitad concordando con las concentraciones del Cuadro III y que la

concentración de microorganismos se diluyera a la mitad, es decir aproximadamente una concentración de 5×10^2 UCF/mL. Los tubos se incubaron a 30 °C por 24 horas. Una vez terminado el tiempo de incubación se procedió a clasificar los tubos en sensibles o resistentes comparándolos con la turbidez del tubo control. Además como método confirmatorio se montaron placas por duplicado de cada tubo usando el método de vaciado usado por Jeyaseelan y Jahothan (2012) en donde se tomó 1 mL de la disolución y se colocó en las placas, las cuales posteriormente se chorrearon con aproximadamente 20 mL de agar estándar y se incubaron a 35 °C por 48 horas. Esto se hizo con el fin de corroborar que la turbidez no se debía a la adición de la especia y que efectivamente había un crecimiento abundante de microorganismos.

Posteriormente, los tubos clasificados como sensibles se analizaron por medio de un recuento total aerobio mesófilo con el fin de poder comparar el cambio en la concentración de microorganismos y poder tener una mejor comparación entre estos tratamientos. Se realizó el recuento en agar estándar ya que al haberse previamente esterilizado los tratamientos y solamente inocular un tipo de microorganismo no se espera que haya crecimiento de algún microorganismo diferente al inoculado. Este recuento se realizó nuevamente por el método de vaciado que se explicó anteriormente para el método confirmatorio.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ORÉGANO EN POLVO Y EN OLEORRESINA Y DE LA MOSTAZA CHINA EN POLVO EN UN GEL CÁRNICO

5.1.1 Evaluación del pH del gel cárnico

Para la determinación del efecto antioxidante se analizó tanto el índice de peróxidos para determinar el momento de aparición de los compuestos primarios de la oxidación lipídica, como el valor de TBA para determinar el momento de aparición de compuestos de oxidación secundarios. Como se mencionó en el marco teórico, es de suma importancia verificar que el pH del producto no varíe significativamente durante la realización del estudio, para asegurar que la muestra no se haya deteriorado y que no se vean afectados los demás análisis. En el Cuadro V, a continuación, se muestran los valores promedio de pH en cada uno de los tratamientos durante los 20 días de almacenamiento.

Cuadro V. Valores promedio de pH de los geles cárnicos con los diferentes tratamientos almacenados a 5 °C durante 20 días ($n=3$; \pm intervalo de confianza).

Tratamiento	Día				
	0	5	10	15	20
OO 0,4%	6,32 \pm 0,16	6,41 \pm 0,12	6,33 \pm 0,14	6,32 \pm 0,18	6,37 \pm 0,09
OO 0,6%	6,30 \pm 0,21	6,48 \pm 0,11	6,44 \pm 0,10	6,37 \pm 0,23	6,43 \pm 0,15
OP 0,5%	6,34 \pm 0,13	6,37 \pm 0,11	6,23 \pm 0,03	6,33 \pm 0,14	6,40 \pm 0,10
OP 1,0%	6,40 \pm 0,14	6,47 \pm 0,04	6,34 \pm 0,16	6,37 \pm 0,13	6,59 \pm 0,11
MP 0,5%	6,34 \pm 0,13	6,38 \pm 0,07	6,34 \pm 0,07	6,40 \pm 0,15	6,32 \pm 0,05
MP 1,0%	6,32 \pm 0,19	6,42 \pm 0,05	6,29 \pm 0,08	6,36 \pm 0,15	6,43 \pm 0,17
Control	6,35 \pm 0,09	6,42 \pm 0,01	6,34 \pm 0,06	6,34 \pm 0,13	6,24 \pm 0,48

Según el análisis de varianza realizado no se encuentran diferencias significativas entre los valores de pH obtenidos a lo largo del tiempo ($p = 0,5533$) para ninguno de los tratamientos. Además, se encontró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0,3279$). En ambos casos se obtiene una potencia de prueba de 1,0000. Por lo tanto, se evidencia que el pH del gel cárnico en todos los tratamientos analizados se mantiene constante durante el tiempo.

Este análisis es de suma importancia ya que diversos estudios han demostrado que la disminución del pH de productos cárnicos durante el almacenamiento y su variación entre diversos tratamientos usando extractos con compuestos antioxidantes, se debe al crecimiento en la carga microbiana o a la adición de dichos extractos, tal y como se observó en los estudios de Lee *et al* (2010) con el extracto de *kimchi* y en el estudio de Banerjee *et al* (2012) con el extracto de brócoli. Ambos factores pueden afectar los resultados de los análisis definidos para evaluar la oxidación de la muestra (Biswas *et al.*, 2012). Los autores anteriores recomiendan realizar la medición de pH para verificar la estabilidad del producto ya que es una medición sencilla y se correlaciona con la carga microbiana presente en la matriz. Sin embargo, en este caso como se pudo observar en el Cuadro V, el pH se mantiene sin diferencias significativas a través del tiempo y no hay diferencias significativas entre los tratamientos analizados. Esto se pudo deber a que el tratamiento térmico empleado (90 °C por 2 minutos) eliminó toda la flora existente y a que se tuvieron buenas prácticas de manufactura y de laboratorio que evitaron la contaminación posterior al tratamiento térmico. Una vez corroborado que el valor de pH de los geles cárnicos no se veía afectado por el tiempo de almacenamiento o los diferentes tratamientos, se prosiguió a analizar el índice de peróxidos y el valor de TBA de cada uno de los casos.

5.1.2 Evaluación del índice de peróxidos

Durante la evaluación del índice de peróxidos se pudo observar como luego de la extracción de la grasa de los geles cárnicos, todos los aceites obtenidos presentaban una coloración visiblemente diferente, la cual iba de amarillo-blancuzco hasta un amarillo-verdoso fuerte (Figura 10). Estas diferencias físicas se podrían deber a que durante la extracción de la grasa del gel cárnico, ésta se mezclaba con extractos de los aceites esenciales de las plantas, provocando un cambio en la coloración de la grasa obtenida. Sin embargo, el cambio de color no parece afectar los resultados obtenidos y no parece haber una relación entre el color de la grasa y los índices de oxidación analizados.

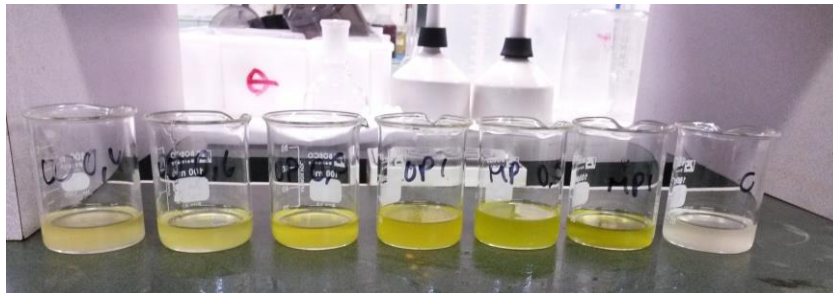
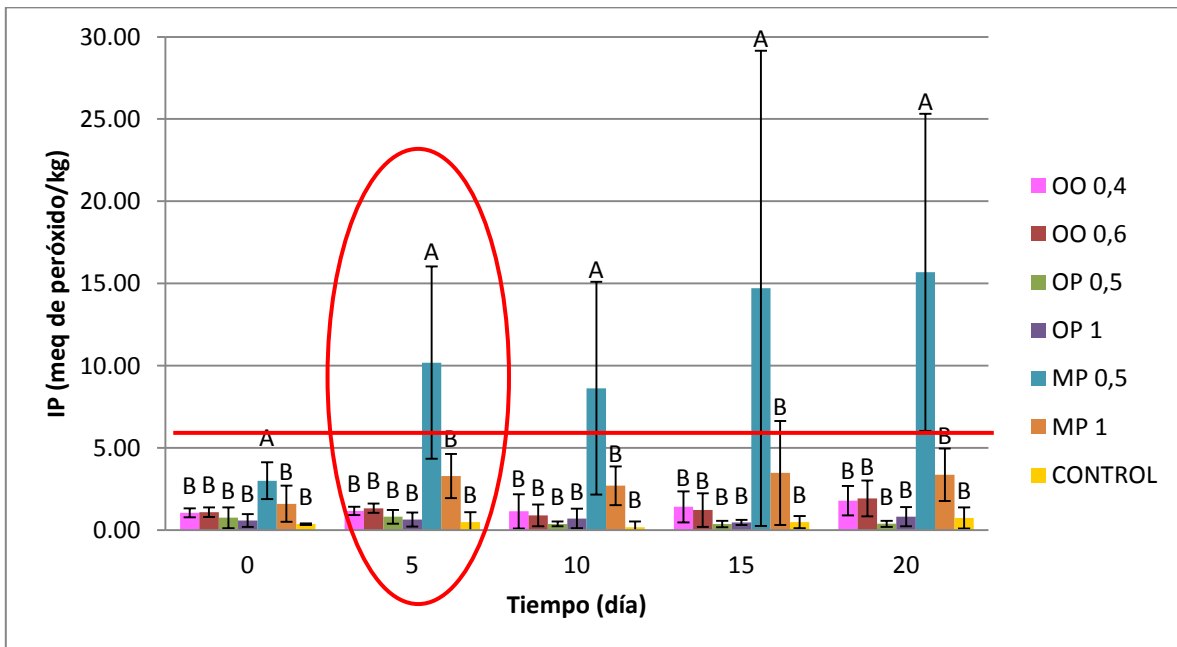


Figura 9. Grasa extraída de cada uno de los geles cárnicos tratados en el siguiente orden: OO 0,4%, OO 0,6%, OP 0,5%, OP 1,0%, MP 0,5%, MP 1,0% y Control.

Luego de extraer las grasas, se valoró y calculó el índice de peróxido de cada una, y se obtuvo los resultados presentados en la Figura 10.



* Valores con diferente letra presentan diferencias significativas entre los tratamientos a un mismo tiempo de muestreo con un 95% de confianza.

Figura 10. Índice de peróxidos promedio de los geles cárnicos durante 20 días de almacenamiento a 5 °C. La línea roja indica el límite del índice de peróxidos permitido por el RTCA 67.04.40: 07. El círculo rojo indica el día seleccionado para análisis estadísticos posteriores ($n = 3$; barras de error corresponden a la desviación estándar).

Según el análisis de varianza realizado, no existen diferencias significativas en el valor del IP a través del tiempo en ninguno de los tratamientos ($p = 0,2066$), esto con una potencia de prueba de 0,6342. No obstante, si se presentan diferencias significativas ($p < 0,0001$) del valor del IP entre el tratamiento mostaza en polvo al 0,5% y el resto de los tratamientos analizados, tal y como se observa en la Figura 10.

Luego se analizó si se presentaba algún efecto en la interacción del tiempo y el tratamiento, donde se encontró que en este caso no existe tal efecto ($p = 0,5807$). Esto indica que el efecto observado por el tratamiento no se ve afectado por el tiempo o viceversa. Por lo tanto, analizando los índices de peróxido obtenidos se puede observar como todos los tratamientos, menos la mostaza en polvo al 0,5 %, tienen estadísticamente el mismo efecto antioxidante que el tratamiento control con nitrito de sodio a 156 ppm adicionado.

Pese a que se encontró que estadísticamente no hay diferencias significativas en el IP a través del tiempo para ningún tratamiento, en la Figura 10 se puede apreciar como todos los tratamientos tienen un primer pico de su índice de peróxidos para el día 5 y que para el día 10 este disminuye levemente para nuevamente comenzar a subir. De acuerdo con Lee *et al.* (2010) en su estudio con mostaza china al 0,05 %, 0,1 % y 0,2 % en una matriz cárnica de cerdo con tocino en con una proporción 2,3:1 durante 14 días y con un pH cercano a 6 (factores similares a los utilizados en este estudio), se esperaba observar un crecimiento del índice de peróxidos hasta llegar a un punto máximo y luego ver como este comenzaba a decrecer. Además, como los hidroperóxidos presentan una baja estabilidad y rápidamente se convierten en gran variedad de compuestos (compuestos carbonílicos, hidrocarburos, furanos sustituidos y alcoholes) (Navarro-García *et al.*, 2004), se esperaba que durante un almacenamiento de 20 días se iba a lograr ver cómo los hidroperóxidos se formaban y luego se degradaban al convertirse en otros compuestos, entre ellos el malonaldehído que fue analizado posteriormente con el valor de TBA y así observar una curva en forma de campana. Sin embargo, como se puede ver claramente en la Figura 10 este no fue el caso, lo cual indica que la grasa del gel cárnico para el día 20 todavía no se encontraba totalmente oxidada.

Esto se puede deber a que dentro de una matriz cárnica se encuentran una gran variedad de lípidos con diferentes niveles de saturación y es difícil lograr asegurar la completa homogeneidad del producto, provocando que se comiencen a oxidar primero los lípidos más insaturados y propensos a oxidarse, y así continuamente hasta oxidarse por completo todos los

lípidos dentro del producto. Esto provoca que se vean altos y bajos dentro del índice de peróxidos dependiendo de la porción que representen los ácidos grasos que se están oxidando (Decker *et al.*, 2005). En este caso, la principal fuente de grasa dentro del gel cárnico es el tocino el cual está compuesto aproximadamente de 45 g de grasa por cada 100 g, de los cuales 20 g son grasas mono-insaturadas, 5 g son grasas poli-insaturadas y 15 g son grasas saturadas (INCAP, 2012). En este caso se puede observar como en el tocino, una gran porción de grasas son saturadas y mono-insaturadas, las cuales son las que se van a oxidar más lentamente, lo cual puede provocar que se observe un primer aumento en el índice de peróxidos debido a la descomposición de las grasas poli-insaturadas y luego se observe un nuevo aumento en los peróxidos formados a partir de las grasas más saturadas, lo que explicaría el comportamiento encontrado. Además, el hecho de no observar reducciones al final del gráfico indica que no se habían terminado de oxidar todas las grasas a los 20 días de almacenamiento.

Otro factor importante a tomar en consideración, es que solamente el tratamiento con mostaza china en polvo al 0,5% sobrepasa el límite del índice de peróxidos permitido por el RTCA 67.04.40: 07 desde el quinto día de almacenamiento. Además, es importante destacar que todos los tratamientos con orégano, ya sea en polvo o en oleorresina, y el tratamiento control con nitrito todavía se encuentran por debajo de 3 mEq de peróxido/kg de muestra y por ende dentro del rango de oxidación aceptable según Kiokias *et al.* (2010). Para poder evaluar mejor las diferencias entre tratamientos, se decidió analizar más de cerca el día 5, ya que éste presenta el primer pico de crecimiento de los peróxidos y en donde sería más clara la comparación entre los tratamientos y además serían los peróxidos que se observan luego en el análisis del valor del número de TBA.

Cuadro VI. Valor promedio del índice de peróxidos determinado en las grasas extraídas de los geles cárnicos en el día 5 de almacenamiento a 5°C ($n = 3$; \pm intervalo de confianza).

Tratamiento	IP (meq peróxido/kg)
OO 0,4%	1,17 \pm 0,29 ^B
OO 0,6%	1,33 \pm 0,32 ^B
OP 0,5%	0,81 \pm 0,48 ^B
OP 1,0%	0,65 \pm 0,48 ^B
MP 0,5%	10,18 \pm 6,61 ^A
MP 1,0%	3,30 \pm 1,52 ^B
CONTROL	0,48 \pm 0,69 ^B

* Valores con diferente letra presentan diferencias significativas con un 95% de confianza.

Como se observa en el cuadro anterior nuevamente se encuentra solamente la mostaza en polvo al 0,5% categorizada como estadísticamente distinta a los demás tratamientos ($p = 0,0015$). No obstante, es importante notar que el índice de peróxidos del gel cárnico tratado con mostaza en polvo al 0,5% posee un valor mucho mayor que los demás y un intervalo de confianza más amplio que los demás. Esto podría provocar que la mostaza en polvo al 1,0% sea agrupada estadísticamente con los demás tratamientos aunque esta sea realmente diferente. Por lo tanto se realizó el análisis nuevamente eliminando la mostaza en polvo al 0,5% y se obtuvieron los siguientes resultados.

Cuadro VII. Valor del índice de peróxidos determinado en las grasas extraídas de los geles cárnicos menos la mostaza en polvo al 0,5% en el día 5 de almacenamiento a 5°C ($n = 3$; \pm intervalo de confianza).

Tratamiento	IP (meq peróxido/kg)
OO 0,4%	1,17 \pm 0,29 ^B
OO 0,6%	1,33 \pm 0,32 ^B
OP 0,5%	0,81 \pm 0,48 ^B
OP 1,0%	0,65 \pm 0,48 ^B
MP 1,0%	3,30 \pm 1,52 ^A
CONTROL	0,48 \pm 0,69 ^B

* Valores con diferente letra presentan diferencias significativas con un 95% de confianza.

Como se observa en el Cuadro VII, al eliminar el tratamiento mostaza en polvo al 0,5% efectivamente se separa la mostaza en polvo al 1,0% del resto de los tratamientos y es categorizada como estadísticamente diferente ($p = 0,0034$). Por lo tanto, aunque la mostaza en polvo al 1,0% no sobrepasa el límite del índice de peróxidos permitido por el RTCA 67.04.40: 07 durante los 20 días de almacenamiento y se demostrara que a esta concentración esta especie si presenta cierta actividad antioxidante, esta no representa una alternativa que logre equiparar estadísticamente el efecto antioxidante que se obtiene con los tratamientos con 156 ppm de nitrito. Por ende, en cuanto a este índice, se presume que los tratamientos con orégano, ya sea en polvo o en oleoresina, son los que presentan un mayor potencial como alternativa de los antioxidantes sintéticos comúnmente utilizados en la industria cárnica. Lo encontrado, en cuanto a la actividad antioxidante del orégano, concuerda con el estudio realizado por Karre *et al.* (2005) en donde se determinó que el orégano tiene la capacidad de inhibir la oxidación lipídica en matrices cárnicas. En este estudio ellos explican que la capacidad antioxidante del orégano en este caso se debe a la gran cantidad de compuestos fenólicos presentes naturalmente dentro del orégano

como se explicó en la Sección 3.7.0. Sin embargo es importante evaluar el valor de TBA para corroborar este efecto.

Pese a que no se presentan diferencias significativas entre los valores del IP entre los tratamientos de orégano en polvo y los tratamientos con oleoresina de orégano, se puede observar como el orégano en polvo presenta valores de índice de peróxidos más bajos y más cercanos al tratamiento control. Esto se puede deber a posibles diferencias en la concentración de compuestos fenólicos de ambos. Sin embargo para poder corroborar esto, se debe usar un polvo y una oleoresina que provengan de la misma variedad de orégano y que incluso sean del mismo cultivo y lote para eliminar estas posibles fuentes de variación.

Los aceites esenciales naturales son mezclas de varios componentes en donde los diferentes tipos de antioxidantes o componentes de terpenoides oxidables coexisten. Cuando se utiliza un extracto de aceite esencial, se espera que los componentes antioxidantes más eficaces dominen y sean los que se encuentren en mayor concentración y que la protección general se deba a tales componentes. Esto es cierto en algunos casos, pero muchas excepciones han sido observadas en donde el rendimiento global como antioxidante se debe al resultado de la compleja interacción entre los componentes y el material oxidable a proteger y no tanto por la concentración general de un compuesto específico. Por lo tanto, de forma general se observa que dependiendo de la composición exacta del extracto del aceite esencial y las condiciones experimentales se puede esperar un comportamiento sinérgico o antagónico entre todos los compuestos presentes y por ende resultados variables (Amorati *et al*, 2013). Por ende, el uso de una oleoresina con cantidad de componentes fenólicos reducida podría provocar que se obtengan valores de índice de peróxidos superiores a los resultados obtenidos con la planta en polvo. Sin embargo al no realizarse una cuantificación de los compuestos fenólicos presentes dentro de cada tratamiento no se puede determinar si las diferencias son por el tratamiento o la proporción de los compuestos presentes.

Al final, con este análisis se puede observar que los tratamientos que lograron inhibir mejor la oxidación lipídica son los tratamientos con orégano ya sea en polvo o en oleoresina y que entre estos tratamientos, resulta más efectivo el tratamiento con orégano en polvo.

5.1.3 Evaluación del valor del número de ácido tiobarbitúrico

El análisis de TBA se utiliza para determinar la cantidad presente de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico las cuales son productos secundarios de la oxidación lipídica tal y como se explicó en la Sección 3.2.1. En este caso, este índice se evaluó como mg de malonaldehído por kg de producto. Durante la evaluación del número de TBA, se presentó una coloración amarilla en lugar de rosada (Figura 11), como es el color esperado en este análisis, cuando el destilado acidificado de los tratamientos con orégano (tanto en polvo como en forma de oleoresina) reaccionaba con el reactivo de TBA.

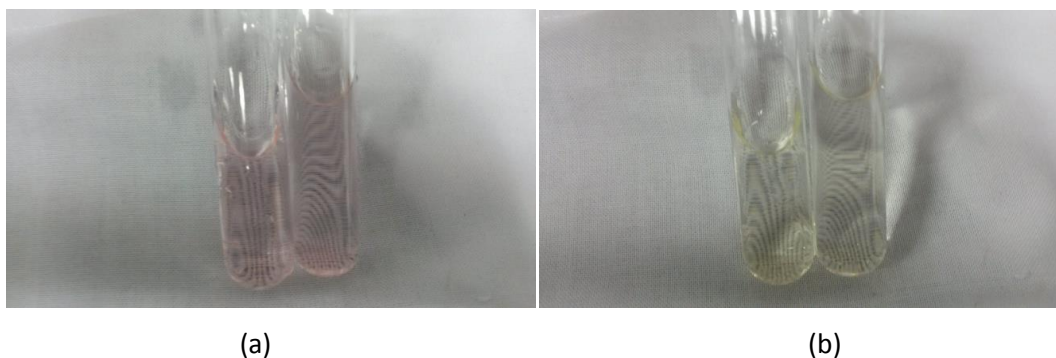


Figura 11. Color del destilado luego de reaccionar con el reactivo de TBA. (a) Tratamiento MP 0,5% y MP 1,0%. (b) Tratamiento OP 0,5% y OP 1,0%.

En la teoría se explica como el MDA reacciona con reactivo de TBA para formar un pigmento rosa en una relación molar 2:1 que tiene un máximo de absorción cercana a los 530 nm. Sin embargo, se ha observado como ciertos compuestos (como las antocianinas y algunos carbohidratos) pueden interferir con las mediciones en esta longitud de onda ya que se producen compuestos de diferentes coloraciones. No existe ningún método para correlacionar la medición en la longitud de onda de absorción máxima obtenida con el nuevo color con la cantidad de MDA presente, si no que se debe analizar exactamente cuál es el compuesto responsable de la interferencia y eliminarlo y así determinar la correlación (Navarro-García, 2004., Wang *et al.*, 2013).

Se ha observado que muchos compuestos son capaces de reaccionar con el TBA y producir productos de color amarillo o naranja, los cuales tienen absorción máxima a los 440 nm – 460 nm. Al traslaparse estas curvas, se podría obtener una estimación mayor o menor a la real de las mediciones a 530 nm. Por ejemplo, se ha observado que ciertos compuestos comúnmente

encontrados en productos cárnicos producen estos complejos amarillos o naranja, tales como proteínas y péptidos solubles en agua, azúcares, aldehídos, nitritos y nitratos, quelantes de metales, antioxidantes polifenólicos, pigmentos, aminoácidos, aditivos y ácidos grasos, los cuales pueden influenciar el resultado y por lo tanto los valores TBARS para diferentes alimentos con el mismo nivel de oxidación (basado en las puntuaciones de sabor) pueden variar significativamente (Rustad, 2010., Díaz *et al.*, 2014).

En el estudio realizado por Wang *et al.* (2013), descubrieron que diversas plantas causan interferencias durante las mediciones de MDA y que se producen diferentes colores durante la reacción. Indican que para poder analizar TBA con estas plantas se debe conocer exactamente cuál es el compuesto presente que provoca la interferencia y separarlo a través de métodos como la cromatografía de gases. En el estudio, se encontró una planta llamada “lingustro dorado” que también provoca una coloración amarilla y que induce que a la hora de medir MDA se obtenga un resultado negativo, como fue lo que ocurrió en este estudio con el orégano. Según sus resultados, ellos indicaron que las sustancias que interfirieron eran altamente solubles en lípidos y que estuvieron presentes en niveles altos en las hojas. Sin embargo, en este caso no se presentaban estudios que explicaran los compuestos del orégano que ocasionaban la interferencia y por ende no fue factible realizar la separación.

Para tratar de disminuir al máximo la posibilidad de aparición de este color amarillo se prosiguió con la recomendación de Díaz *et al.* (2014), los cuales probaron diferentes métodos para reducir las posibles interferencias durante el análisis de TBA y encontraron que las disoluciones acuosas o disoluciones muy diluidas de ácido con un pH inferior a 1,60 son las más adecuadas para reducir la interferencia producida por pigmentos amarillos durante la cuantificación de TBARS en los productos cárnicos frescos cuando la temperatura es de 100 °C y los tiempos de menos de 1 h se utilizan para la incubación. Incluso utilizando este método para el análisis de TBA los problemas de la aparición de color amarillo con el orégano tanto en polvo como en oleoresina todavía se presentaban, tal y como se puede observar en las Figuras 13, 14, 15 y 16 en donde el pico de absorción máxima se encuentra a los 450 nm.

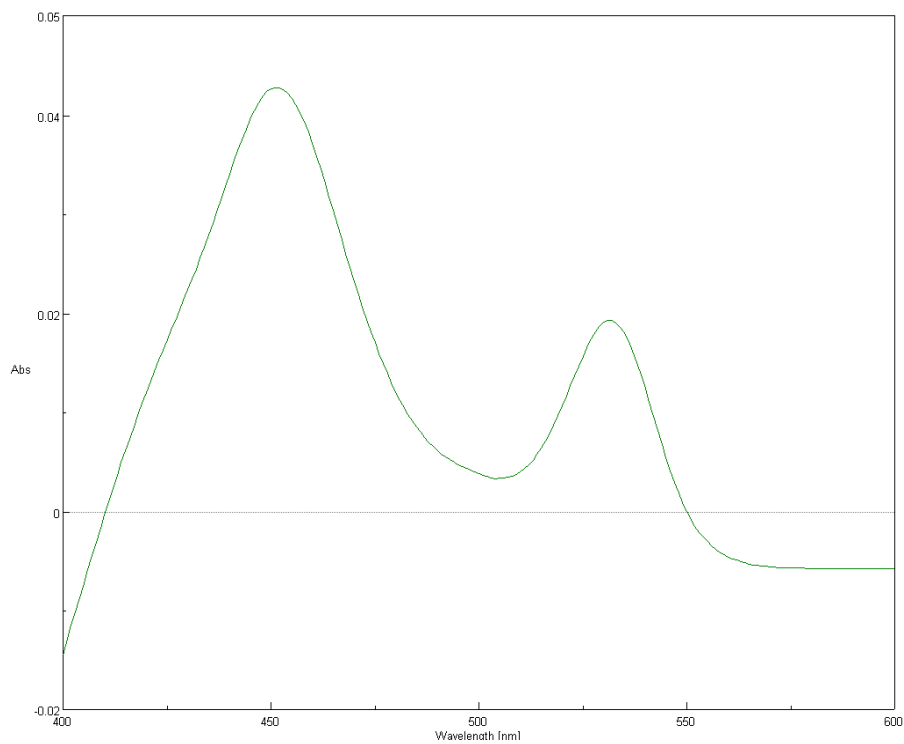


Figura 12. Curva de absorbancia de 400 nm – 600 nm del gel cárnico tratado con oleorresina de orégano al 0,6%.

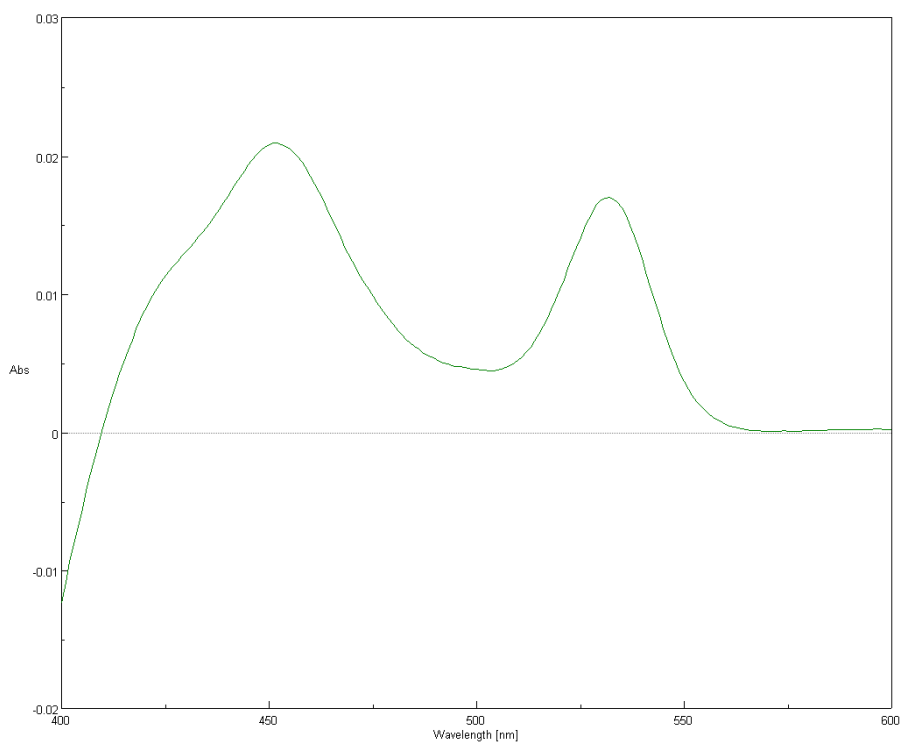


Figura 13 Curva de absorbancia de 400 nm – 600 nm del gel cárnico tratado con oleorresina de orégano al 0,4%.

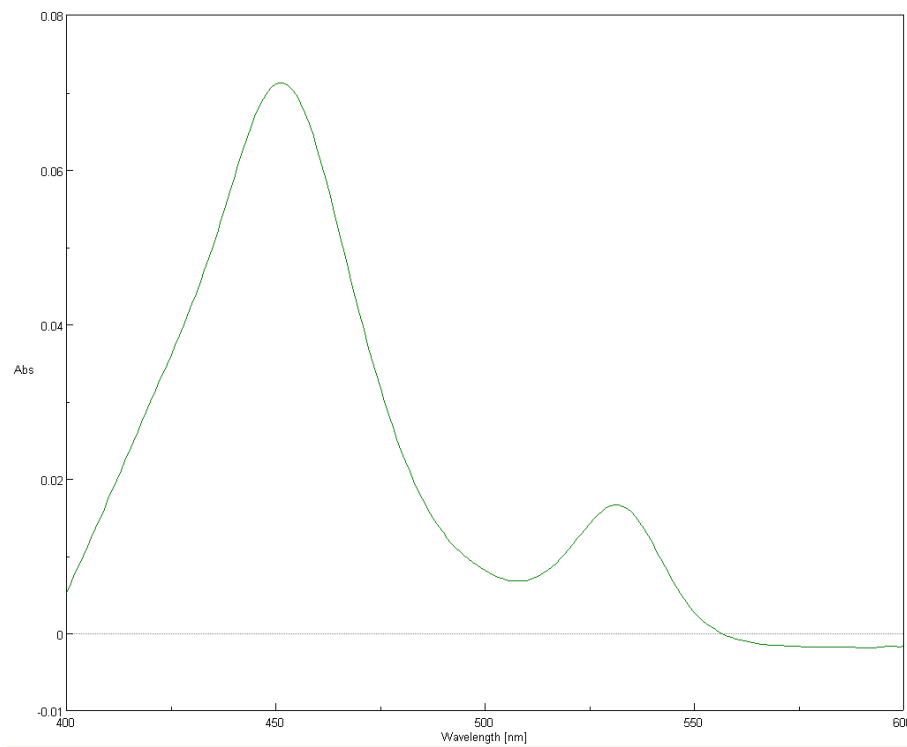


Figura 14. Curva de absorbancia de 400 nm – 600 nm del gel cárnico tratado con orégano en polvo al 0,5%.

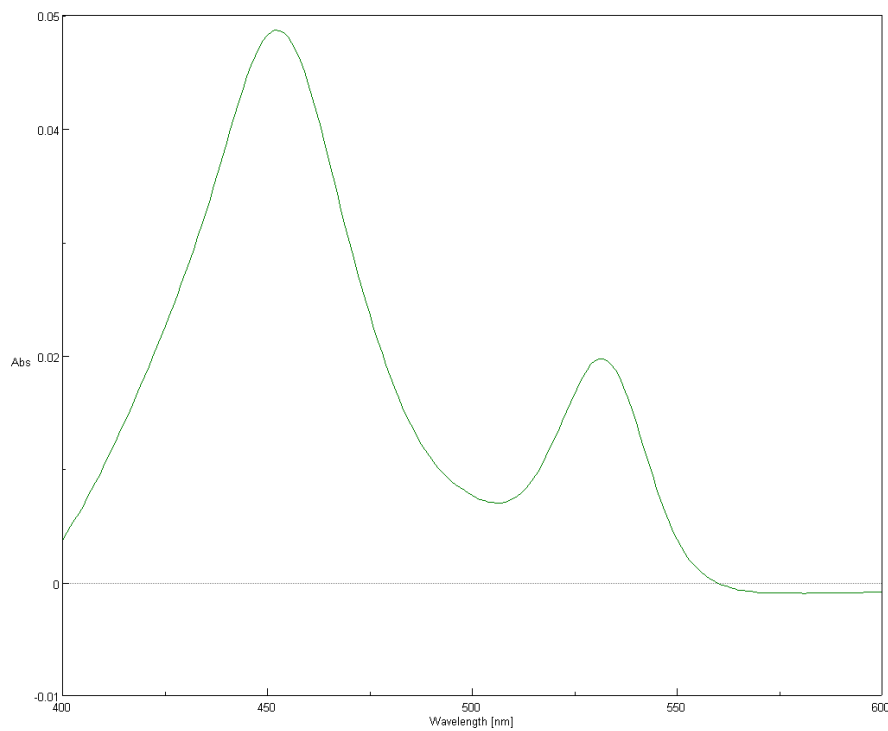


Figura 15. Curva de absorbancia de 400 nm – 600 nm del gel cárnico tratado con orégano en polvo al 1,0%.

Por ende, se decidió analizar TBA solamente en los tratamientos con mostaza china y compararlo con el control.

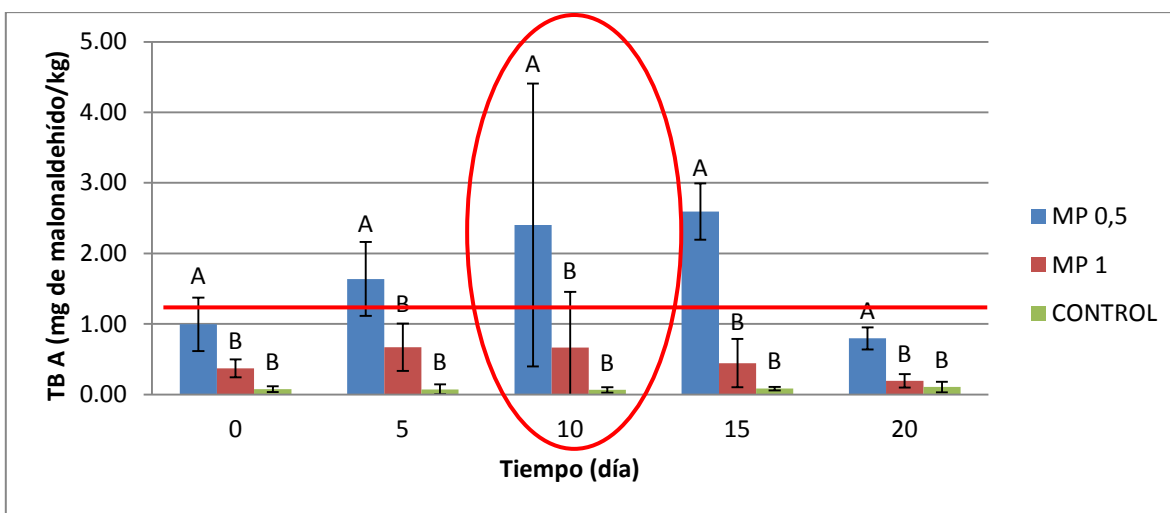


Figura 16. Índice de peróxidos promedio posteriores ($n = 3$; barras de error corresponden a la desviación estándar) de los geles cárnicos tratados con los tratamientos de MP y Control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C. La línea roja indica el límite del valor del número de TBA según Candogan & Kolsarici, 2003. El círculo rojo indica el día seleccionado para análisis estadísticos posteriores.

Según el análisis de varianza realizado, en ninguno de los tratamientos se encontró diferencias significativas en los valores del número de TBA obtenidos a través del tiempo ($p = 0,0708$) con una potencia de prueba de 0,9917. Además, el tratamiento de mostaza china en polvo al 0,5% nuevamente es el que es categorizado como significativamente diferente ($p < 0,0001$), al igual que se observó con el índice de peróxidos. Otro dato importante de tomar en consideración es que en este caso nuevamente no se encontró interacción entre el tiempo de almacenamiento y el tratamiento utilizado ($p = 0,1595$).

Como se observa claramente en la Figura 16, el pico máximo presentado se da en el día 15. Este pico sería el que posiblemente correspondería a la formación de compuestos secundarios de los hidroperóxidos formados para el día 5 que fue el día analizado en el índice de peróxidos. En este caso, se observa que incluso desde el día 0 la mostaza en polvo al 0,5% presentó valores altos de MDA llegando al límite establecido por Candogan & Kolsarici (2003) ($TBA = 1 \text{ mg de MDA / kg}$), mientras que para el caso del control y la mostaza en polvo al 1,0% nunca llegan a este límite.

Esto podría indicar que en bajas concentraciones la mostaza china en polvo podría no poseer actividad antioxidante o incluso, se estaría comportando como un prooxidante. Sin

embargo, al no tener un control negativo entre los tratamientos no es posible asegurar ninguna de las dos opciones. Este efecto se debe estudiar más a fondo ya que según la gran cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides encontrados en la mostaza china por Samec *et al.* (2011), se esperaba que se presentara una actividad antioxidante más marcada. Además, Lee *et al.* (2010) en su estudio de la actividad antioxidante del *kimchi* de mostaza china encontraron que incluso extractos de mostaza china con etanol en bajas concentraciones, de hasta un 0,1%, presentan propiedades antioxidantes por lo que se esperaba poder observar esta capacidad antioxidante de la mostaza en el tratamiento al 0,5%. Sin embargo, es importante notar que una diferencia importante entre los estudios es que el *kimchi* como tal es un producto fermentado y por ende posee ácidos grasos que a su vez son agentes antimicrobianos que podrían beneficiar los resultados. Otra posible explicación a las diferencias observadas, es que al ser elaborados los extractos con etanol los compuestos fenólicos están más expuestos a la matriz cárnica y por ende presentan mayor actividad antioxidante.

Para poder analizar mejor la diferencia entre los tratamientos se analizó por separado el pico del día 15 (Figura 16). En este caso, se observa como nuevamente se presentan diferencias significativas entre el tratamiento de mostaza en polvo al 0,5% y los demás tratamientos, los cuales no presentan diferencias entre sí ($p < 0,0001$). Con estos resultados se puede concluir que de acuerdo al valor del número de TBA estudiado, la mostaza china en polvo a una concentración de 1,0% presenta una capacidad antioxidante no significativamente diferente al tratamiento con nitrito a 156 ppm y por tanto se presume que de acuerdo a este índice, este tratamiento presenta una posibilidad de sustituir los antioxidantes artificiales utilizados comercialmente. Sin embargo, como se observó en el análisis de índice de peróxidos, la mostaza en polvo al 1,0% resultaba menos efectiva que cualquier tratamiento con orégano y por ende, es posible que estos tratamientos sean más efectivos para evitar la oxidación lipídica. No obstante, se requiere de un índice alternativo para determinar compuestos secundarios en donde no se den problemas de interferencia como los que se presentaron en este estudio y así, poder corroborar que el orégano ayuda a retardar la oxidación secundaria también. Ejemplos de otros análisis que podrían utilizarse con este fin son el valor de *p*-anisidina o la cromatografía de gases (Kiokias *et al.*, 2010).

Además de esto, es importante tomar en cuenta la relación entre el índice de peróxidos y el valor del número de TBA y de esta forma poder entender mejor cómo estos dos índices se complementan. En este caso, como no se pudo analizar el número de TBA con los tratamientos

con orégano, se va a analizar la relación de ambos índices en los tratamientos con mostaza china y el control.

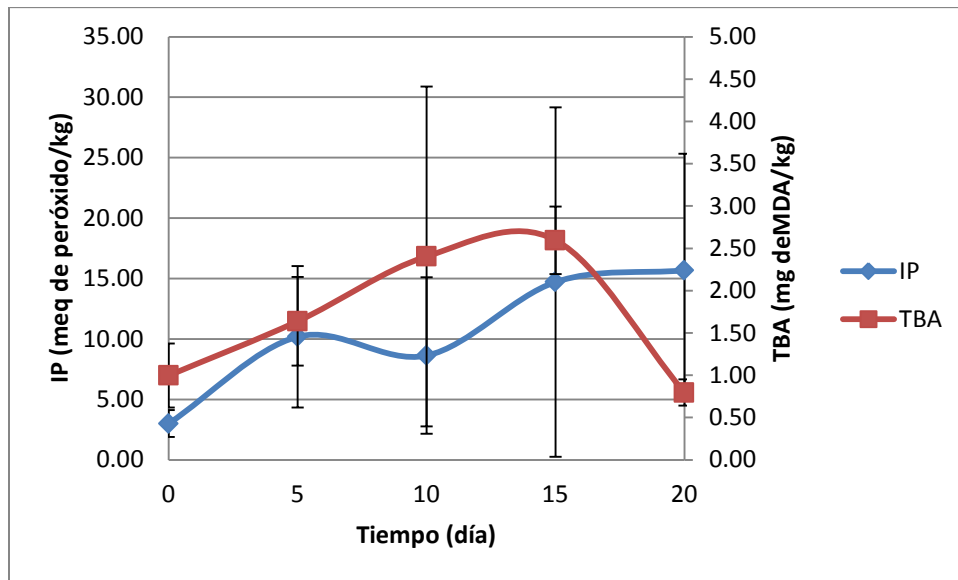


Figura 17. Gráfico del índice de peróxidos promedio y el valor del número de TBA promedio del gel cárnico tratado con mostaza en polvo al 0,5% durante 20 días de almacenamiento a 5 °C ($n=3$; barras de error corresponden a la desviación estándar).

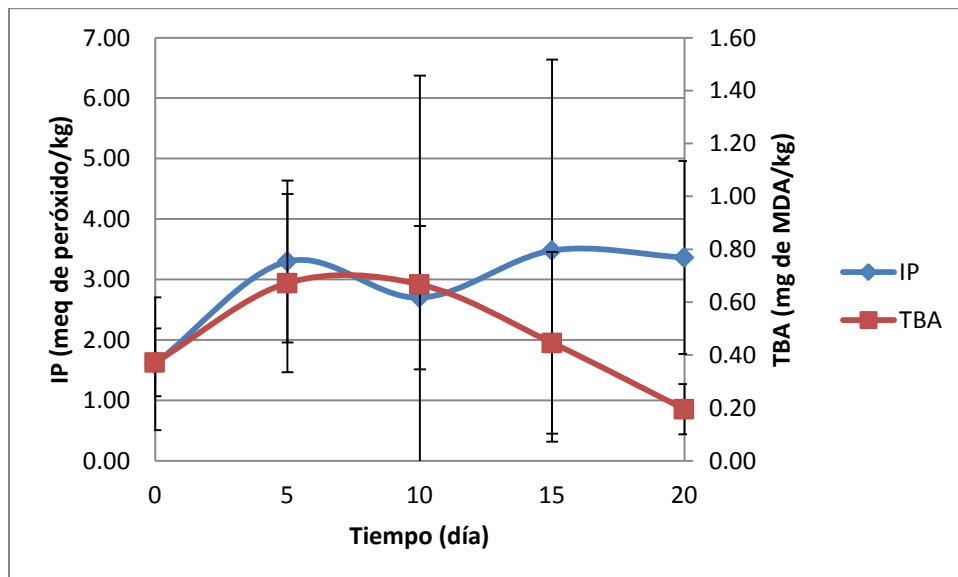


Figura 18. Gráfico del índice de peróxidos promedio y el valor del número de TBA promedio del gel cárnico tratado con mostaza en polvo al 1,0% durante 20 días de almacenamiento a 5 °C ($n=3$; barras de error corresponden a la desviación estándar).

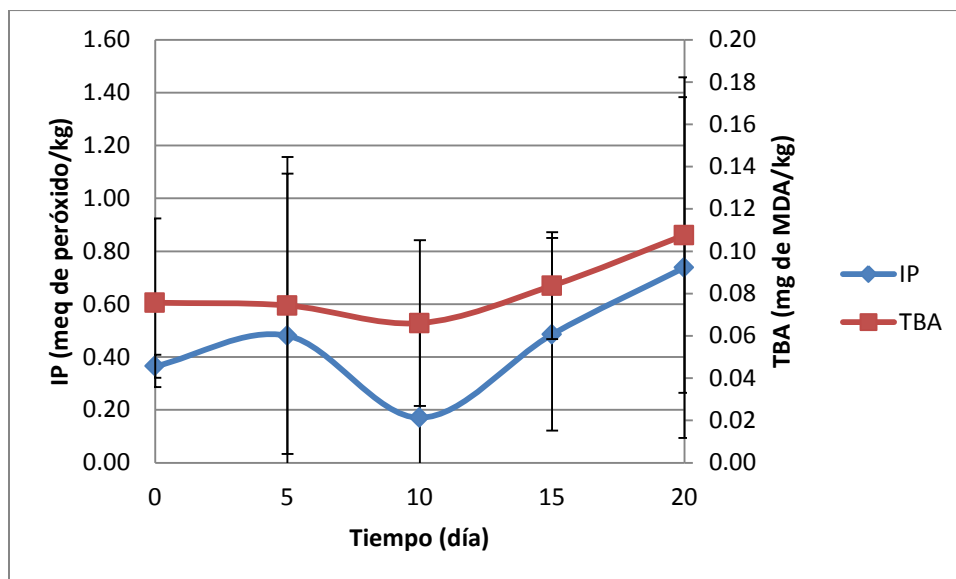


Figura 19. Gráfico del índice de peróxidos promedio y el valor del número de TBA promedio del gel cárnico tratado con nitrito a 156 ppm durante 20 días de almacenamiento a 5 °C ($n = 3$; barras de error corresponden a la desviación estándar).

Si se observan las Figura 17, 18 y 19, se puede ver como las líneas de los gráficos se unen en el día 5 y en el día 10, se observa como las curvas se separan y la curva de TBA se encuentra por encima de la curva de IP. Esto demuestra, tal y como explica la teoría, que el índice de peróxidos detecta los compuestos primarios formados durante la oxidación lipídica (hidroperóxidos) y que el valor de TBA detecta los compuestos secundarios (malonaldehído) formados a partir de estos. Es importante notar que los valores de IP y de TBA para el tratamiento control son mucho menores que para los tratamientos con mostaza en polvo al 0,5% e incluso al 1,0%. Sin embargo, como en ambos análisis estadísticos realizados (Figura 10 y Figura 16) no se encontraron diferencias significativas entre la mostaza en polvo 1,0% y el tratamiento control es que se concluye que la mostaza en polvo al 1,0% se podría utilizar para sustituir antioxidantes artificiales comercialmente utilizados. Sin embargo, se deben hacer análisis de consumidor para ver si los cambios en el sabor y el aroma al utilizar estos productos como antioxidantes en productos cárnicos, son aceptados y evaluar la vida útil obtenida en estos productos. De esta forma se puede corroborar que la oxidación lipídica en un producto comercial se logra retardar al utilizar la mostaza china. Además, como se explicó anteriormente, según los resultados de IP es muy posible que el orégano en cualquiera de sus presentaciones sea un mejor antioxidante que la mostaza china, pero esto se debe verificar con otro análisis de compuestos secundarios que no se vea afectado por la interferencia que esta especia presenta al analizar TBA.

Es importante recalcar que el nitrito de sodio, por presentar funciones tan específicas dentro de los productos cárnicos curados como, por ejemplo, otorgar el sabor y color característico a curado y proteger de la proliferación del *C. botulinum*, no se puede eliminar por completo de las formulaciones (Sindelar & Milkowski, 2011; Subramanian *et al.*, 2014 & Constantinos & Parskevas, 2015). Sin embargo, utilizando como ayudante al orégano o a la mostaza china se podrían bajar las concentraciones utilizadas de los nitritos, lo cual disminuiría el riesgo de la formación de las nitrosaminas. Además, sería interesante evaluar si existen mezclas entre especias con propiedades antioxidantes que presenten un efecto sinérgico y mejores resultados con concentraciones menores para que sean más fácilmente aceptadas por los consumidores.

5.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ORÉGANO EN POLVO Y EN OLEORRESINA Y DE LA MOSTAZA CHINA EN POLVO

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las especias se analizaron cuatro microorganismos distintos (*E. coli*, *L. rhamnosus*, *L. innocua* y *Pseudomonas spp.*) con siete diferentes tratamientos descritos en el Cuadro IV por medio del método de CMI en tubo. Se clasificaron los microorganismos como sensibles o resistentes obteniendo así los resultados presentados en el cuadro a continuación.

Cuadro VIII. Clasificación de la sensibilidad de los cuatro microorganismos analizados a los diferentes tratamientos por medio del método de CMI en tubo.

Tratamiento	Microorganismo			
	<i>E.coli</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>Pseudonomas spp.</i>
OP 2,0%	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
OP 1,0%	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
MP 2,0%	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
MP 1,0%	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
OO 2,0%	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
OO 0,6%	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
CONTROL	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

Como se observa en el cuadro anterior, el tratamiento con orégano en polvo al 2,0% y el tratamiento control fueron los únicos tratamientos para los cuales los microorganismos presentaron sensibilidad. Para obtener una comparación más clara entre el efecto del tratamiento control contra el tratamiento de orégano en polvo 2,0% se realizaron los recuentos microbiológicos de estos tratamientos y se realizó un análisis estadístico para cada microorganismo analizado.

Cuadro IX. Promedio del recuento total de los microorganismos tratados con OP al 2,0% y con el tratamiento control a 30 °C por 24 horas ($n=3$; \pm intervalo de confianza).

Microorganismo	Tratamiento	
	OP 2,0%	Control
<i>L. innocua</i>	1,5 \pm 0,6 log ^B	3,6 \pm 0,6 log ^A
<i>Pseudomonas</i> spp.	1,3 \pm 0,5 log ^B	1,9 \pm 0,2 log ^A
<i>L. rhamnosus</i>	0,8 \pm 0,2 log ^B	2,4 \pm 0,5 log ^A
<i>E. coli</i>	0,4 \pm 0,3 log ^B	2,7 \pm 0,4 log ^A

* Valores con diferente letra presentan diferencias significativas con un 95% de confianza.

Como se observa en el cuadro anterior, se tienen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con los cuatro microorganismos analizados con una $p = 0,0007$ para la *L.innocua*, $p = 0,0389$ para *Pseudomonas* spp., $p = 0,0001$ para *L. rhamnosus* y $p < 0,0001$ para *E. coli*. Además, observando la Figura 20, se observa como ambos tratamientos presentaron muy poco crecimiento. Esto indica que es posible que un tratamiento de orégano al 2,0% presente una alternativa prometedora para sustituir a los preservantes sintéticos utilizados comercialmente como antimicrobianos.

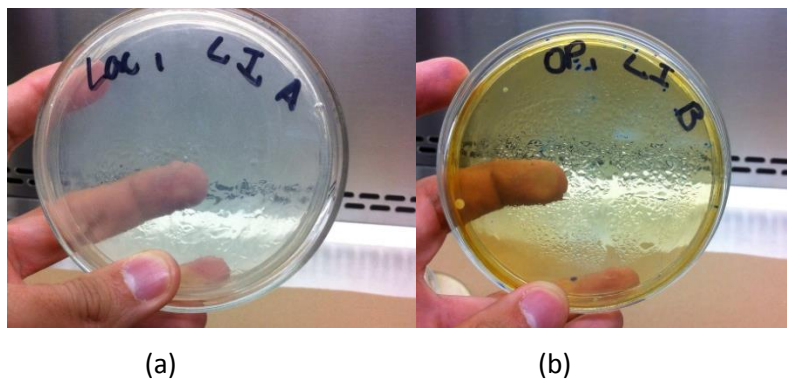


Figura 20. Placas Petri con crecimiento de *L. innocua* con el tratamiento control (a) y tratamiento de OP 2,0% (b)

Al realizar el análisis de éste índice, se observa que para todos los casos los recuentos del tratamiento con el orégano al 2,0% son los más bajos. Añadido a esto, si se compara con los 3,7 log de UFC (5×10^2 UFC/mL) aproximados de cada microorganismo que se inoculó inicialmente se observa que ambos tratamientos, orégano 2,0% y el control, presentan un efecto bactericida y no bacteriostático ya que los recuentos finales son menores. Un compuesto se considera bacteriostático cuando este detiene el crecimiento microbiano. Es decir, los microorganismos no crecen en la presencia del compuesto, pero no mueren de forma inmediata. Si se elimina el compuesto, los microorganismos pueden recuperarse y volver a crecer. Un compuesto es bactericida cuando su presencia produce la muerte del microorganismo afectado rápidamente y de forma irreversible. Esta muerte puede ir acompañada de la lisis de las células o no (Cordiés *et al.*, 1998).

Es importante destacar que este efecto se observa mucho más pronunciado en el tratamiento con orégano al 2,0% que en el tratamiento control. Es decir, el orégano en polvo al 2,0% presenta un efecto bactericida más fuerte que una mezcla de preservantes químicos comunes. Esto podría indicar que el usar orégano en polvo en una concentración de 2,0% podría ayudar a aumentar la vida útil de los productos comerciales ya existentes.

Además, el control contenía cantidades mucho mayores de nitrito (500 ppm) y diacetato (20000 ppm) a lo permitido por el RTCA 67.04.54:10 (125 ppm y 2500 ppm respectivamente) y por lo tanto se puede observar que el orégano 2,0% podría presentarse como una gran alternativa para los compuestos antimicrobianos utilizados comercialmente. Estas concentraciones se tuvieron que alcanzar para poder tener un tratamiento sin turbidez con el cual comparar los otros tratamientos para poder ser clasificados como sensibles o resistentes. En esta investigación se necesitó de un control tan fuerte y no la mezcla con los límites aceptados debido a que las condiciones de incubación usadas son las óptimas para propiciar el crecimiento bacteriano y en pruebas preliminares se comprobó que estos compuestos en concentraciones más bajas no lograron inhibir el crecimiento microbiano y se obtiene turbidez visible en los tubos. Sin embargo, para fines de comparación de capacidad antimicrobiana resulta muy valioso encontrar que el orégano en polvo a una concentración del 2,0% es incluso más efectivo que la mezcla de diferentes antimicrobianos comerciales en altas concentraciones. Es importante recalcar nuevamente que a los nitritos no se les puede sustituir hasta hacer análisis posteriores, ya que

éste se utiliza para evitar la proliferación de *Clostridium botulinum*, el cual no fue analizado en este caso, y para fijar el color característico de los productos cárnicos curados.

Estos resultados no fueron los esperados ya que según investigaciones anteriores, se esperaba que todos los tratamientos tuvieran una mayor capacidad antimicrobiana. Por ejemplo, Weerakkody *et al.* (2010), determinaron que se requiere un extracto de orégano a una concentración de 2,5 mg/mL para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*. Martucci *et al.* (2015) lograron observar el efecto antimicrobiano desde concentraciones de 2 mg/mL de extracto de orégano. Todo lo anterior permitía esperar resultados con ambos tratamientos de orégano en polvo e incluso con la oleoresina de orégano ya que se estaban utilizando concentraciones considerablemente más altas que las encontradas en las bibliografías con resultados de estudios pasados. Estas diferencias se pueden deber a que en los estudios mencionados anteriormente los extractos se realizaron a nivel de laboratorio, lo que podría provocar que estos presentaran cantidades de los compuestos fenólicos mucho mayores a las que podrían encontrarse tanto en el polvo como en la oleoresina utilizados en este estudio.

En cuanto a la mostaza china, varios estudios realizados demostraban que esta tenía un gran potencial antimicrobiano, como por ejemplo Turgis *et al.* (2009) encontraron que para *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* el CMI utilizando un extracto del aceite esencial de la mostaza china era de 0,2% (v/v) y Kwang *et al.* (2010), encontraron que la mostaza china posee gran cantidad de glucosinolatos los cuales se han comprobado que tienen función bactericida y fungicida. Sin embargo, en los resultados obtenidos se observa como incluso usando una concentración al 2,0% de mostaza china en polvo no fue posible observar la inhibición de ninguno de los microorganismos analizados. Esto se pudo deber a que al usar la mostaza china en polvo gran parte de los compuestos se perdieron durante el secado o no se encuentran tan disponibles o concentrados como en los aceites esenciales o en los extractos usando etanol el cual por sí mismo ya tiene capacidad antimicrobiana.

Por lo tanto, se puede concluir que en cuanto a la actividad antimicrobiana solamente el tratamiento con orégano en polvo al 2,0% posee un efecto antimicrobiano. Este efecto es incluso mejor a la mezcla de diferentes aditivos comerciales en concentraciones muy altas. Lo anterior indica que esta especia podría presentarse como una alternativa para estos compuestos químicos en los productos cárnicos y por lo cual sería importante realizar un análisis de consumidores para

determinar si el sabor de esta especia es aceptable en el producto final y posteriormente analizar la vida útil del producto resultante.

Si se unen estos resultados junto con los obtenidos en el análisis de capacidad antioxidante de todos los tratamientos, se encuentra que en general el tratamiento que presenta mayor promesa para la utilización en productos cárnicos comerciales es el tratamiento con orégano en polvo. Este tratamiento presentó una capacidad antioxidante no estadísticamente diferente al tratamiento control según su IP y además presentó mejores resultados en la capacidad antimicrobiana según la prueba de CMI en comparación con una mezcla de diferentes preservantes comerciales utilizados en concentraciones muy altas.

6. CONCLUSIONES

1. De acuerdo con los resultados del análisis de IP, solamente los tratamientos con orégano tanto en polvo como en oleorresina son potenciales antioxidantes naturales para matrices cárnicas.
2. El análisis del valor del número de TBA no es una prueba apropiada para evaluar productos cárnicos con tratamientos de orégano.
3. Según el análisis del valor del número de TBA, solamente el tratamiento con mostaza china en polvo al 1,0% es un potencial antioxidante para ser utilizado en matrices cárnicas.
4. De todos los tratamientos analizados, solamente el orégano en polvo al 2,0% muestra cualidades antimicrobianas.
5. De acuerdo con lo anterior, el tratamiento de orégano en polvo resulta el más prometedor como preservante natural debido a que este presenta una actividad tanto antioxidante como antimicrobiana.

7. RECOMENDACIONES

1. Sería valioso hacer la extracción de los aceites esenciales o realizar extractos concentrados con cantidad de compuestos fenólicos conocidos de orégano y de mostaza china para evaluar si éstos presentan una mayor actividad antioxidante y/o antimicrobiana.
2. Evaluar la composición química de diferentes tipos de extractos de orégano y mostaza china para poder identificar los compuestos presentes y determinar cuáles serían los extractos con mayor cantidad de compuestos fenólicos los cuales representarían las mejores opciones por evaluar dentro de matrices alimentarias.
3. Evaluar otro método diferente al análisis de TBA para la evaluación de los compuestos secundarios de la oxidación lipídica en donde el orégano no provoque una interferencia, como por ejemplo índice de p-anisidina y cromatografía de gases para poder evaluar tratamientos con orégano y corroborar su actividad antioxidante.
4. Realizar el estudio utilizando un mayor número de días de almacenamiento para poder observar más claramente las curvas de oxidación de las grasas en la evaluación del índice de peróxido.
5. Evaluar la actividad antimicrobiana de los tratamientos con métodos más sensibles y cuantitativos como la difusión en agar para poder definir con mayor exactitud la concentración con la cual los tratamientos presentan una capacidad inhibitoria.
6. Probar mezclas de carnes y formulaciones de productos comerciales para evaluar nuevamente la actividad antioxidante y antimicrobiana de los tratamientos con orégano para corroborar su efectividad.
7. Realizar análisis con consumidores para corroborar la aceptación de éstos frente a los cambios de sabor y color que los diferentes tratamientos crean y de esta manera determinar la factibilidad y posible éxito de incluir un producto como estos en el mercado.
8. Realizar pruebas de vida útil para corroborar que el tratamiento con orégano en polvo es efectivo y capaz de ser utilizado en productos comerciales y que retarda la oxidación y el deterioro microbiológico.
9. Evaluar investigaciones con mezclas de especias con capacidades antioxidantes y/o antimicrobianas para evaluar la posible presencia de un efecto sinérgico entre estas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- AGBOR, G., OBEN, J., NGOGANG, J., XINXING, C. & VINSON, J. 2005. Antioxidant capacity of some herbs/spices from Cameroon: a comparative study of two methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 6819-6824.
- AGENCIA CATALANA DE SALUD ALIMENTARIA (<http://www.gencat.cat>). 2013. Microorganismos indicadores de la higiene de los procesos. Generalitat de Catalunya, España. INTERNET: http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir3226/acsabrief_2013_04_microbiologicos.pdf. Buscado el 15 de Marzo del 2014.
- ALMEIDA, A., RODRÍGUEZ, S., TERESA, A., VILA-REAL, H., SIMPLICIO, A., DELGADIHO, I., BEIRAO DA COSTA, S., BEIRAO DA COSTA, L., NOGUEIRA, I. & DUARTE, C. 2013. Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 20: 140-145.
- AMORATI, R., FOTI, M. & VALGINIGLI, L. 2013. Antioxidant activity of essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*. 61(46): 10845-10847.
- AOAC. 2005. AOAC Official Method 965.33. Peroxide Value of Oils and Fats.
- AXELSON, L. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. En SALMINEN, S., WRIGHT, A. & OUWEHAND, A, ed. En *Lactic Acid Bacteria: microbiological and functional aspects*, 3 ed. CRC Press. Boca Ratón.
- AWAIWANONT, N., SMULDERS, F. & PAULSEN, P. 2015. Growth potential of *Listeria monocytogenes* in traditional Austrian cooked-cured meat products. *Food Control*. 50: 150-156.
- BANERJEE, R., VERMA, A., DAS, A., RAJKUMAR, V., SHEWALKAR, A. & NARKHEDE, H. 2012. Antioxidant effects of broccoli powder extract in goat meat Nuggets. *Meat Science*. 91: 179-184.

- BARREIRO, J & SANDOVAL, A. 2006. Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Equinoccio. Venezuela.
- BEGOÑA, M. 2007. Mejora de la seguridad alimentaria en productos cárnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías de conservación emergentes. Tesis Dr. en Ciencias experimentales y de la salud, Facultad de Microbiología Alimentaria. Universidad de Girona.
- BELIK, Y. 2014. Total antioxidant activity and antimicrobial potency of the essential oil and oleoresin of *Zingiber officinale* Roscoe. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4(1): 40-44.
- BELLUCO, S., BARCO, L., ROCCATO, A. & RICCI, A. 2016. *Escherichia coli* and Enterobacteriaceae counts on poultry carcasses along the slaughterline: A systematic review and meta-analysis. *Food Control*. 60: 269-280.
- BERNAL, G. 2009. Efecto de la adición de lactato y diacetato de sodio y almacenaje sobre las características físicas y apariencia de la carne de res para asar (M. Biceps y Triceps Brachii). Tesis Lic. en Ingeniería en agroindustria alimentaria, Facultad de Agroindustria Alimentaria. Universidad Zamorano.
- BINDA, S., CASTIÑEIRAS, J., WEAVER, S. & GABRIEL, L. 2010. Experiencias del cultivo de orégano en El Maitén. INTA. Argentina.
- BISWAS, A., CHATLI, M. & SAHOO, J. 2012. Antioxidant potential of curry (*Murraya koenigii* L.) and mint (*Mentha spicata*) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. *Food Chemistry*. 133: 467-472.
- BLASETTI, A., DVORKIN, M., DUBIN, A., FRYDMAN, J., KLAJN, D., MEEROF, N. & PATRONE, U. 2000. Tratado de medicina crítica y terapia intensiva. 4ed. Medica Panamericana. España.
- BOSKOVIC, M., ZDRAVKOVIC, N., IVANOVIC, J., JANJIC, J., DJORDJEVIC, J., STARCEVI, M. & BALTIC, M. 2015. Antimicrobial activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum*

- vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. *Procedia Food Science*. 5: 18-21.
- CANDOGAN, K. & KOLSARICI, N. 2003. Storage stability of low-fat beef frankfurters formulated with carrageenan or carrageenan with pectin. *Meat Science*. 64(2): 207-214.
- CARBALLO, C. 2013. Oxidación lipídica y proteica de carne de cerdo pampa rocha producidos sobre pasturas. Tesis Magister en ciencias agrarias. Universidad de la República, Facultad de Agronomía. Uruguay.
- CASABURI, A., PIOMBINO, P., NYCHAS, G. & VILLANI, F. 2015. Bacterial populations and the volatile associated to meat spoilage. *Food Microbiology*. 45: 83-102.
- CAVALIERI, S., HARBECK, R., MCCARTER, Y., ORTEZ, J., RANKIN, I., SAUTTER, R., SHARP, S. & SPIEGEL, C. 2005. Manual of antimicrobial susceptibility testing. American Society for Microbiology. Estados Unidos.
- CHOI, Y., CHOI, J., HAN, D., KIM, H., LEE, M., KIM, H., JEONG, J & KIM, C. 2011. Effects of wheat fiber on the quality of meat batter. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 27(1): 22-28.
- COCKERILL, F., WIKLER, M., ALDER, J., DUDLEY, M., ELIOPOULOS, G., FERRARO, M., HARDY, D., HECHT, D., HINDLER, J., PATEL, J., POWEL, M., SWENSON, J., THOMSON, R., TRACZEWSKI, M., TURNIDGE, J., WEINSTEIN, M. & ZIMMER, B. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 9 ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Estados Unidos.
- COGGINS, P. 2001. Spices and flavorings for meat and meat products. In *Meat science and applications*. In YOUNG, O., ROGERS, R., HUI, Y. & NIP, W. CRC Press. Estados Unidos.
- CONSTANTINOS, Z. & PARASKEVAS, T. 2015. Preservatives. In *Handbook of food analysis*. 3 ed, vol 2. In NOLLET, L. & TOLDRA, F. CRC PRESS. Estados Unidos.

- CORDIÉS, L., MACHADO, L. & HAMILTON, M. 1998. Principios generales de la terapia antimicrobiana. *Acta Médica*. 8 (1): 13-27.
- DA SILVA, N., HIROMI, M., AMSTALDEN, V., FERRAZ, N., DA SILVA, M. & ROMEIRO, R. 2013. Microbiological examinations methods of food and wáter. CRC Press. Boca Ratón.
- DE FALCO, E., ROSCIGNO, G., LANDOLFI ,S., SCANDOLERA, E. & SENATORA,F. 2014. Growth, essential oil characterization, and antimicrobial activity of three wild biotypes of oregano under cultivation condition in Southern Italy. *Industrial Crops and Products*. 62: 242 - 249.
- DECKER, E., WARNER, K., RICHARDS, M. & SHAHIDI, F. 2005. Measuring antioxidant effectiveness in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4303 – 4310.
- DEL RÉ, P. & JORGE, N. 2011. Antioxidant potential of oregano (*Origanum vulgare* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.): application of oleoresins and vegetable oil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 31(4): 955-959.
- DIAZ, P., LINARES, M., EGEA,M., AUQUI, S. & GARRIDO, M. 2014. TBARs distillation method: revision to minimize the interference from yellow pigments in meat products. *Meat Science*. 98: 569-573.
- DONNENBERG, M. 2002. *Escherichia coli*: Virulence mechanisms of a versatile pathogen. Academic Press. Reino Unido.
- DUSKOVÁ, M., KAMENÍK, J., LACANIN, I., SEDO, O. & ZDRÁHAL, Z. 2016. Lactic acid bacteria in cooked hams e Sources of contamination and chances of survival in the product. *Food Control*. 61: 1-5.
- ERCOLINI, D., CASABURI, A., NASI, A., FERROCINO, I., DI MONACO, R., FERRANTI, P., MAURIELLO, G. & VILLANI, F. 2010. Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behavior as meat spoilers. *International Journal of Food Microbiology*. 142 (1): 120-131.

- FEGAN, N., GOBIUS, K. & DYKES, G. 2014. Pathogenic *Escherichia coli*. En DIKEMAN, M & DEVINE, C ed. En Enciclopedia of meat sciences. 2 ed. Academic Press. Reino Unido.
- FONTANA, C., FADDA, S., COCCONCELLI, P. & VIGNOLO, G. Lactic acid bacteria in meat fermentation. 2011. En WRIGHT, A, ed. En Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects, 4 ed. CRC Press. Boca Ratón.
- FRANZ, C. & VON HOLY, A. 1996. Thermotolerance of meat spoilage lactic acid bacteria and their inactivation in vacuum-packaged Vienna sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 29 (1): 59-73.
- GARCÍA, P., FERNÁNDEZ, M. & PAREDES, F. 1994. *Microbiología Clínica Práctica*. 2ed. Universidad de Cádiz. España.
- GE, Y., WANG, T., WANG, N., WANG, Z., LIANG, C., RAMCHIARY, N., CHOI, S., LIM, Y. & PIAO, Z. 2012. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci for chlorophyll content in Chinese cabbage (*Brassica rapa ssp.pekinensis*). *Scientia Horticulturae*. 147: 42-48.
- GÓMEZ, D., AZÓN, E., MARCO, N., CARRAMIÑANA, J., ROTA, C., ARIÑO, A. & YANGÜELA, J. 2014. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiology*. 42: 61-65.
- GORDILLO, R., RODRÍGUEZ, A., WERNING, E., BERMÚDEZ, E. & RODRÍGUEZ, M. 2014. Quantification of viable *Escherichia coli* O157: H7 in meat products by dúplex real-time PCR assay. *Meat Science*. 96 (2): 964-970.
- GRAM, L. 2005. Microbial food spoilage. In *Handbook of food science, technology and engineering*. 4 volume set. En HUI, Y. ed. CRC Press. Estados Unidos.
- GUERRERO-LEGARRETA. 2008. Spoilage detection. In *Handbook of processed meats and poultry analysis*. In NOLLET, L. & TOLDRA. ed. CRC Press. Estados Unidos.

- HAN, N., YEW-HOONG, K. & HAO, H., 2015. Fecal pollution source tracking toolbox for identification, evaluation and characterization of fecal contamination in receiving urban surface waters and groundwater. *Science of the total environment*. 538: 38-57.
- HAYHURST, C. 2004. Epidemics, deadly diseases throughout history: *E. coli*. 4ed. The Rosen Publishing Group. New York.
- HOLLEY, R. & CORDEIRO, R. 2014. *Listeria monocytogenes*. En DIKEMAN, M & DEVINE, C ed. En Enciclopedia of meat sciences. 2 ed. Academic Press. Reino Unido.
- HOLVOET, K., DE KEUCKELAERE, A., SAMPERS, I., VAN HAUTE, S., STALS, A. & UYTENDAELE. 2014. Quantitative study of cross-contamination with *Escherichia coli*, *E. coli* O157, MS2 phage and murine norovirus in a simulated fresh-cut lettuce wash process. *Food Control*. 37: 218-227.
- HULANKOVA, R., BORILOVA, G. & STEINHAUSEROVA, I. 2013. Combined antimicrobial effect of oregano essential oil and caprylic acid in minced beef. *Meat Science*. 95: 190-194.
- INCAP. 2012. Tabla de composición de alimentos de Centroamérica. 2 ed. INCAP. Guatemala.
- JEYASEELAN, E. & JASHOTHAN, P. 2012. *In vitro* control of *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) by *Ricinus communis* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Bionedecine*. 2(9): 717-721.
- KALEMBA, D. & WAJS, A. 2011. Essential Oils and Spices. In JELEN, H. ed. Food Flavors Chemical, Sensory and Technological Properties. CRC Press, Estados Unidos.
- KAMENIK, J. 2013. The microbiology of meat spoilage: a review. *Maso-International*. República Checa.
- KARRE, L., LOPEZ, K. & GETTY, K. 2013. Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*. 94: 220-227.

- KHANJARI, A., KARABAGIAS, I. & KONTOMINAS, M. 2013. Combined effect of N, O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. *LWT- Food Science and Technology*. 53 (1): 94-99.
- KIM, J., CHU, S., KIM, S., LEE, D., LEE, S., LIM, S., HA, S., KWEON, S. & CHO, H. 2010. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa L. ssp. Pekinensis*. *Food Chemistry*. 119: 423-428.
- KIOKIAS, S., VARZAKAS, T., ARVANITOYANNIS, I. & LABROPOULOS, A. 2009. In *Advances in Food Biochemistry*. En YILDIZ, F ed. CRC Press. Estados Unidos.
- KIRK, R., SAWYER, R. & EGAN, H. 2011. *Composición y análisis de los alimentos de Pearson*. 2 ed. C.E.C.S.A. México D.F.
- KULISIC, T., RADONIC, A., KATALINIC, V. & MILOS, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 85(4): 633-640.
- LEBERT, I., ROBLES-OLVERA, V. & LEBERT, A. 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas spp.* and *Listeria* in meat. *International Journal of Food Microbiology*. 61 (1): 27-39.
- LEE, K. & SHIBAMOTO, T. 2002. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 4947-4952.
- LEE, M., CHOI, J., CHOI, Y., HAN, D., KIM, H., SHIM, S., CHUNG, H. & KIM, C. 2010. The antioxidative properties of mustard leaf (*Brassica juncea*) kimchi extracts on refrigerated raw ground pork meat against lipid oxidation. *Meat Science*. 84 (3): 498-504.
- MAKRI, O. 1998. Cultivation of oregano. In *The desing life of structures*. In SOMERVILLE. G. ed. Spon Press. Estados Unidos
- MARSHALL, D. & BAL'A, M. 2001. Microbiology of meats. In *Meat science and applications*. In YOUNG, O., ROGERS, R., HUI, Y. & NIP, W. ed. CRC Press. Estados Unidos.

- MARTUCCI, J., GENDE, L., NEIRA, L. & RUSECKAITE, R. 2015. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*. 71: 205-213.
- MATEAUDA, J. 2013. Estudio de la microflora bacteriana y cambios fisicoquímicos en carne bovina envasada al vacío y almacenada en frío. Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos, Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Uruguay.
- MEIC-MAG. (reglatec@meic.go.cr). 2010. Guía para el etiquetado de embutidos. MEIC, San José. INTERNET. http://meic.go.cr/reglatec/GUIAS_COMPLETAS/guia-embutidos.pdf. Buscado el 22 de Marzo del 2014.
- MINECO, CONACYT, MIFIC, SIC & MEIC.2007. RTCA 67.04.40:07: Alimentos y bebidas procesados. Grasas y aceites. Especificaciones. Ministerios de Salud. Costa Rica.
- MINECO, CONACYT, MIFIC, SIC & MEIC.2007. RTCA 67.04.54:10: Alimentos y bebidas procesados. Aditivos Alimentarios. Ministerios de Salud. Costa Rica.
- MODI, V., YASHODA, K., BHASKAR, N. & MAHENDRAKAR, N. 2008. Effect of carrageenan and oat flour on storage characteristics of fried mutton kofta. *Journal of Food Processing and Preservation*. 33(6): 763-776.
- MOHAREB, F., IRIONDO, M., DOULGERAKI A., VAN HOEK, A., AARTS, H., CAUCHI, M. & NYCHAS, G. 2015. Identification of meat spoilage gene biomarkers in *Pseudomonas putida* using gene profiling. *Food Control*. 57: 152-160.
- MORALES, A. 2013. Evaluación del potencial tecnológico de una harina de plátano verde con cáscara de la variedad Curraré (*Musa AAB Horn Plantain Cv. Harton*) como fuente de fibra y sustituto de grasa para productos cárnicos. Tesis Licenciatura. Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José.
- MURIEL-GALET, V., CRAN, M., BIGGER, S., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. & GAVARA, R. 2015. Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based

on the release of oregano essential oil and green tea extract components. Journal of Food Engineering. 149: 9-16.

NAVARRO-GARCÍA, G., BRINGAS-ALVARADO, L. & PACHECO-AGUILAR, R. 2004. Nueva herramienta para el estudio de la oxidación de los ácidos grasos, una de las causas fundamentales de la pérdida de calidad de los alimentos para la acuicultura. In: CRUZ, L., RICQUE, D., NIETO, M., VILLARREAL, D., SCHOLZ, U. & GONZÁLEZ, M. In Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. México.

NCCLS. 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 9 ed. Clinical and laboratory standards institute. Estados Unidos.

NYCHAS, G. & DROSINOS, E. 2014. Meat and poultry: Spoilage of meat. Encyclopedia of Food Microbiology. 2 ed. Elsevier. Estados Unidos.

OUSSALAH, M., CAILLET, S., SALMÉRI, S., SAUCIER, L. & LACROIX, M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 5598-5605.

PADÍN, E., POSE, G. & POLLIO, M. 2007. Antibacterial Activity of Oleoresin from Aguaribay (*Schinus molle* L.). Journal of Food Technology. 5(1): 5-8.

PASCUAL, M. & CALDERÓN, V. 2000. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ed. Días de Santos. España.

PÉREZ, M., CASTELLANO, P. & VIGNOLO, G. 2014. Evaluation of anti-*Listeria* meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. Meat Science. 96 (1): 295-303.

PESAVENTO, G., CALONICO, C., BILIA, A., BARNABEI, M., CALESINI, F., ADDONA, R., MENCARELLI, L., CARMAGNINI, L., DI MARTINO, M. & LO NOSTRO, A. 2015. Antibacterial activity of

- Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*. 54: 188-199.
- PONCE, A., AVALO, R., ROURA, S. & MOREIRA, M. 2010. Impact of oregano and rosemary oleoresins on native microflora and *E. coli* O157: H7 growth on sliced and grater carrots. *Food Protective Trends*. 30(7): 404-411.
- POTHAKOS, V., DEVLIEGHERE, F., VILLANI, F., BJÖRKROTH, J. & ERCOLINI, D. 2015. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Science*. 109: 66-75.
- RADHA, K., BABUSKIN, S., AZHAGU, P., SASIKALA, M., SABINA, K., ARCHANA, G., SIVARAJAN, M. & SUKUMAR, M. 2014. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*. 171: 32-40.
- REYES-JURADO, F, PALOU, E. & LÓPEZ-MALO, A. 2014. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 81: 68-78.
- RINGUELET, J., MARTÍNEZ, S., RÉ, M., CERIMELE, E. & HENNING, C. 2008. Diseño de una estructura para secado natural de orégano y menta. *Horticultura*. 27(63): 15-19.
- ROBERTSON, G. 2009. Food Packaging and Shelf Life. In *Food packaging and shelf life a practical guide*. En ROBERTSON, G. ed. CRC Press. Estados Unidos
- ROMERO, E., LPEZ-MALO, A. & PALOU, E. (2011). *Escherichia coli* de tipo patógeno en los alimentos y modelación de su inactivación al aplicar diversos factores de conservación. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 5(2): 28-19.
- ROMERO, R. 2007. Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ed. Médica Panamericana. México.
- RUSSELL, S. 2000. Spoilage bacteria associated with poultry. In *Poultry meat processing*. En SAMS, A. ed. CRC Press. Estados Unidos.

- RUSTAD, T. 2009. Lipid oxidation. In Handbook of seafood and seafood products analysis. En NOLLET, L. & TOLDRÁ, F. ed. CRC Press. Estados Unidos.
- SAMEC, D., PILJAC-ZEGARAC., BAGOVIC, M., HABJANIC, K. & GRUZ, J. 2011. Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea L. var. capitata*) and Chinese (*Brassica rapa L. var. pekinensis* (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Scientia Horticulturae*. 128(2): 78-83.
- SÁNCHEZ, J., SERRANO, S., MARFÍL, R. & JODRAL, M. 2009. Patógenos emergentes en la línea de sacrificio porcino: Fundamentos de seguridad alimentaria. Díaz de Santos. España.
- SANJUÁS, M. 2012. Aplicación de sistemas avanzados para la mejora de la calidad de productos marinos refrigerados de interés comercial. Tesis Dr. en Tecnología de Alimentos. Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. España.
- SANTILLÁN, L., CARMONA, S., SCHIEDA, C. & VICENTE, A. 2011. Proyecto de Inversión: Producción de orégano deshidratado. Tesis Licenciatura. Administración de negocios agropecuarios, Universidad Nacional de La Pampa, La Pampa.
- SILVA-ANGULO, A., ZANINI, P., ROSENTHAL, A., RODRIGO, D., KLEIN, G. & MARTÍNEZ, A. 2015. Combined effect of carvacrol and citral on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* and on the occurrence of damaged cells. *Food Control*. 53: 156-162.
- SILVA, A., GENOVÉS, S., MARTORELL, P., ZANINI, S., RODRIGO, D. & MARTÍNEZ, A. 2015. Sublethal injury and virulence changes in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* treated with antimicrobials carvacrol and citral. *Food Microbiology*. 50: 5-11.
- SINDELAR, J. & MILKOWSKI, A. 2011. Sodium Nitrite in Processed Meat and Poultry Meats: A Review of Curing and Examining the Risk/Benefit of Its Use. American Meat Science Association. Estados Unidos.

- SINGH, P., SINGH, S., KAPOOR, I., SINGH, G., ISIDOROV, V. & SZCZEPANIAK. 2013. Chemical composition and antioxidant activities of essential oil and oleoresins from *Curcuma zedoaria* rhizomes, part-74. *Food Bioscience*. 3: 42-48.
- STANOJEVIC, D., COMIC, L., STEFANOVIC, O. & SUKDOLAK. S. 2010. In vitro synergistic antibacterial activity of *Melissa officinalis* L. and some preservatives. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 8(1): 109-115.
- SUBRAMANIAN, J., KAGLIWAL, L. & SINGAHL, R. 2014. PRESERVATIVES | Permitted Preservatives – Nitrites and Nitrates. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2 ed. El Sevier. Estados Unidos
- TEREVINTO, M. 2010. Oxidación lipídica y proteica, capacidad antioxidativa y actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en la carne fresca y madura de novillos hereford y braford. Tesis Magister en Ciencias Agrarias. Universidad de la República, Facultad de Agronomía. Uruguay.
- TERRY, W. 1999. Specialty crops: Chinese cabbage and related oriental crops. University of Georgia College of Agricultural & Environmental Sciences. Estados Unidos.
- TONGUINO, M. 2011. Determinación de las Condiciones Óptimas para la Deshidratación de dos Plantas Aromáticas: Menta (*Mentha piperita* L) y Orégano (*Origanum vulgare* L). Tesis Licenciatura. Ingeniería Agroindustrial. Universidad Técnica del Norte, Ibarra.
- TURGIS, M., HAN, J., CAILLET, S. & LACROIX, M. 2009 Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*. 20 (12): 1073-1079.
- VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. & PÉREZ-ÁLVAREZ, J. 2010. Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of *mortadella*. *Meat Science*. 85(3): 568-576.
- WAN, Z., SHI, D., ZOU, R., HUANG, Y., BIE, Z., SHI, Z., XU, Y. & FU, T. 2014. Development and utilization of one new cytoplasmatic male sterile line of Chinese leaf mustard (*Brassica juncea* var. *rugosa* Bailey). *Scientia Horticulturae*. 165: 211-217.

WANG, Y., DING, M., GU, X., WANG, J., PANG, Y., GAO, L. & XIA, T. 2013. Analysis of interfering substances in the measurement of malonaldehyde content in plant leaves. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 9(3): 235-242.

WANG, D., FARNLEITNER, A., FIELD, K., GREEN, H., SHANKS, O. & BOEHM, A. 2013. *Enterococcus* and *Escherichia coli* fecal source apportionment with microbial source tracking genetic markers - Is it feasible? 47: 6849-6861.

WEERAKKODY, N., CAFFIN, N., TURNER, M. & DYKES, G. 2010. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control*. 21(10): 1408-1414.

9. ANEXO

9.1 CUADROS DE RESULTADOS INTERMEDIOS

Cuadro 9.1-I. Valores de pH de la réplica 1 de los geles cárnicos tratados con orégano en polvo y oleoresina, mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C.

Día	0	5	10	15	20
OO 0,4%	6,46	6,36	6,31	6,19	6,35
OO 0,6%	6,49	6,40	6,39	6,29	6,28
OP 0,5%	6,45	6,36	6,23	6,47	6,35
OP 1,0%	6,54	6,46	6,26	6,50	6,57
MP 0,5%	6,43	6,45	6,28	6,25	6,32
MP 1,0%	6,48	6,39	6,21	6,25	6,26
CONTROL	6,42	6,41	6,33	6,36	6,41

Cuadro 9.1-II. Valores de pH de la réplica 2 de los geles cárnicos tratados con orégano en polvo y oleoresina, mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C.

Día	0	5	10	15	20
OO 0,4%	6,33	6,34	6,47	6,29	6,31
OO 0,6%	6,12	6,45	6,55	6,21	6,45
OP 0,5%	6,36	6,28	6,27	6,24	6,50
OP 1,0%	6,32	6,44	6,50	6,26	6,70
MP 0,5%	6,21	6,35	6,40	6,44	6,28
MP 1,0%	6,15	6,48	6,35	6,32	6,53
CONTROL	6,36	6,42	6,40	6,21	5,76

Cuadro 9.1-III. Valores de pH de la réplica 3 de los geles cárnicos tratados con orégano en polvo y oleoresina, mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C.

Día	0	5	10	15	20
OO 0,4%	6,18	6,53	6,23	6,49	6,47
OO 0,6%	6,29	6,58	6,39	6,60	6,55
OP 0,5%	6,22	6,47	6,21	6,29	6,35
OP 1,0%	6,34	6,51	6,26	6,35	6,51
MP 0,5%	6,39	6,34	6,35	6,50	6,37
MP 1,0%	6,33	6,41	6,30	6,51	6,52
CONTROL	6,27	6,43	6,30	6,45	6,55

Cuadro 9.1-IV. Valores de IP de la réplica 1 de los geles cárnicos tratados con orégano en polvo y oleorresina, mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C.

Día	0	5	10	15	20
OO 0,4%	1,17	1,10	2,34	1,03	2,67
OO 0,6%	1,10	1,02	1,17	0,22	1,03
OP 0,5%	0,22	0,81	0,51	0,22	0,58
OP 1,0%	0,14	0,22	0,15	0,29	0,95
MP 0,5%	4,03	15,14	15,65	8,59	17,16
MP 1,0%	1,76	3,97	2,79	2,11	4,83
CONTROL	0,59	1,33	0,15	1,09	1,71

Cuadro 9.1-V. Valores de IP de la réplica 2 de los geles cárnicos tratados con orégano en polvo y oleorresina, mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C.

Día	0	5	10	15	20
OO 0,4%	1,25	1,45	0,66	2,49	1,82
OO 0,6%	1,39	1,58	1,38	2,27	3,14
OP 0,5%	1,46	1,24	0,40	0,59	0,22
OP 1,0%	0,88	0,66	0,66	0,51	0,18
MP 0,5%	3,16	11,68	7,31	31,22	24,50
MP 1,0%	2,62	4,17	3,83	7,09	3,59
CONTROL	0,59	0,81	0,85	0,67	0,70

Cuadro 9.1-VI. Valores de IP de la réplica 3 de los geles cárnicos tratados con orégano en polvo y oleorresina, mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C.

Día	0	5	10	15	20
OO 0,4%	0,73	0,95	0,44	0,73	0,87
OO 0,6%	0,81	1,38	0,15	1,17	1,60
OP 0,5%	0,58	0,40	0,22	0,29	0,36
OP 1,0%	0,73	1,06	1,32	0,59	1,34
MP 0,5%	1,82	3,74	2,91	4,32	5,38
MP 1,0%	0,44	1,75	1,47	1,23	1,66
CONTROL	0,51	0,11	0,36	0,37	0,51

Cuadro 9.1-VII. Valores de número de TBA de la réplica 1 de los geles cárnicos tratados con mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C.

Día	0	5	10	15	20
MP 0,5%	1,43	1,20	1,75	3,04	0,95
MP 1,0%	0,23	0,34	0,19	0,10	0,23
CONTROL	0,12	0,06	0,10	0,11	0,06

Cuadro 9.1-VIII. Valores de número de TBA de la réplica 2 de los geles cárnicos tratados con mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C.

Día	0	5	10	15	20
MP 0,5%	0,76	2,22	4,66	2,27	0,80
MP 1,0%	0,49	1,01	1,58	0,44	0,09
CONTROL	0,07	0,01	0,03	0,06	0,06

Cuadro 9.1-IX. Valores de número de TBA de la réplica 3 de los geles cárnicos tratados con mostaza en polvo y el control durante 20 días de almacenamiento a 5 °C.

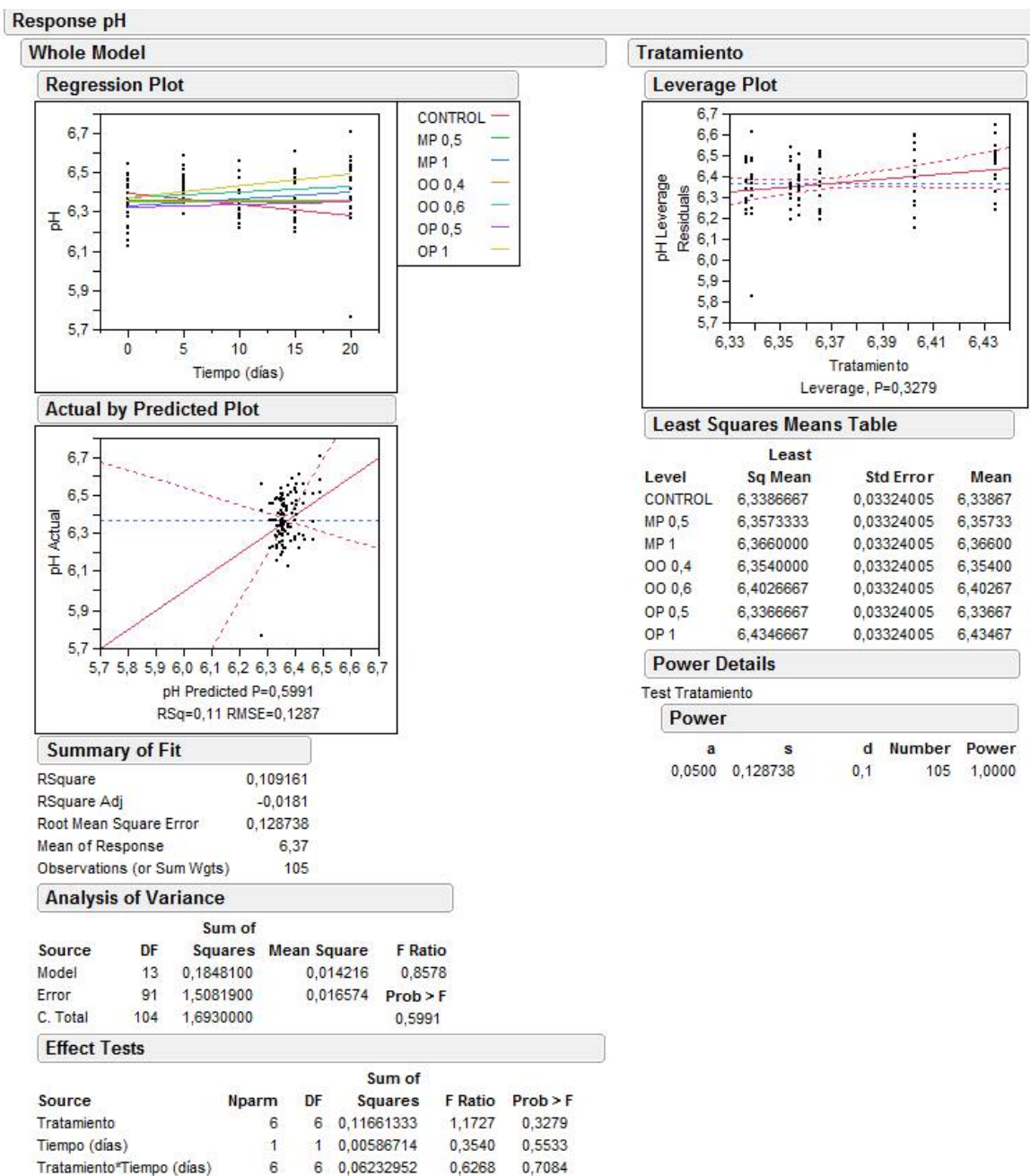
Día	0	5	10	15	20
MP 0,5%	0,80	1,49	0,81	2,48	0,64
MP 1,0%	0,39	0,66	0,23	0,79	0,27
CONTROL	0,04	0,15	0,07	0,09	0,19

Cuadro 9.1-X. Recuentos de los microorganismos analizados con los tratamientos de orégano en polvo 2,0% y control (500 ppm de NO₂ + 2,0% diacetato + 4,8% lactato).

Microorganismo	Tratamiento	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3	
		UFC/mL		UFC/mL		UFC/mL	
		A	B	A	B	A	B
<i>L.innocua</i>	OP 2,0%	30	1	82	94	70	57
	CONTROL	33000	43000	1600	1700	1100	1300
<i>Pseudomonas spp.</i>	OP 2,0%	4	6	129	98	15	14
	CONTROL	230	150	59	67	45	65
<i>L.rhamnosus</i>	OP 2,0%	18	6	8	4	6	3
	CONTROL	1100	1400	88	71	140	130
<i>E.coli</i>	OP 2,0%	0	1	5	2	5	3
	CONTROL	1900	1400	160	190	380	310

9.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

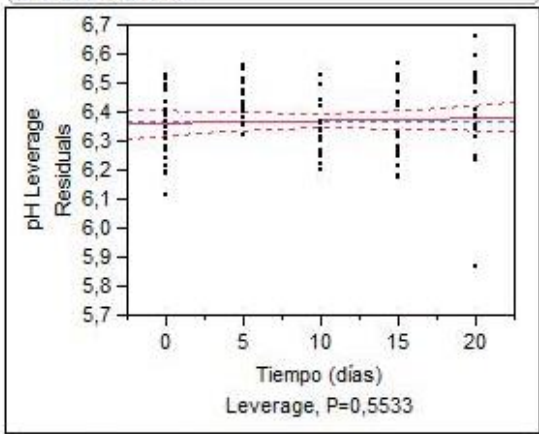
Figura 21. Análisis estadístico del comportamiento del pH en los diferentes geles cárnicos con los diferentes tratamientos durante 20 días de almacenamiento a 5 °C.



Continuación de la Figura 21.

Tiempo (días)

Leverage Plot



Power Details

Test Tiempo (días)

Power

a	s	d	Number	Power
0,0500	0,128738	0,1	105	1,0000

Tratamiento*Tiempo (días)

Leverage Plot

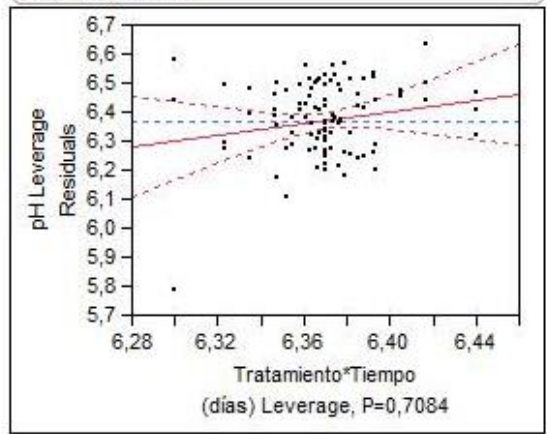
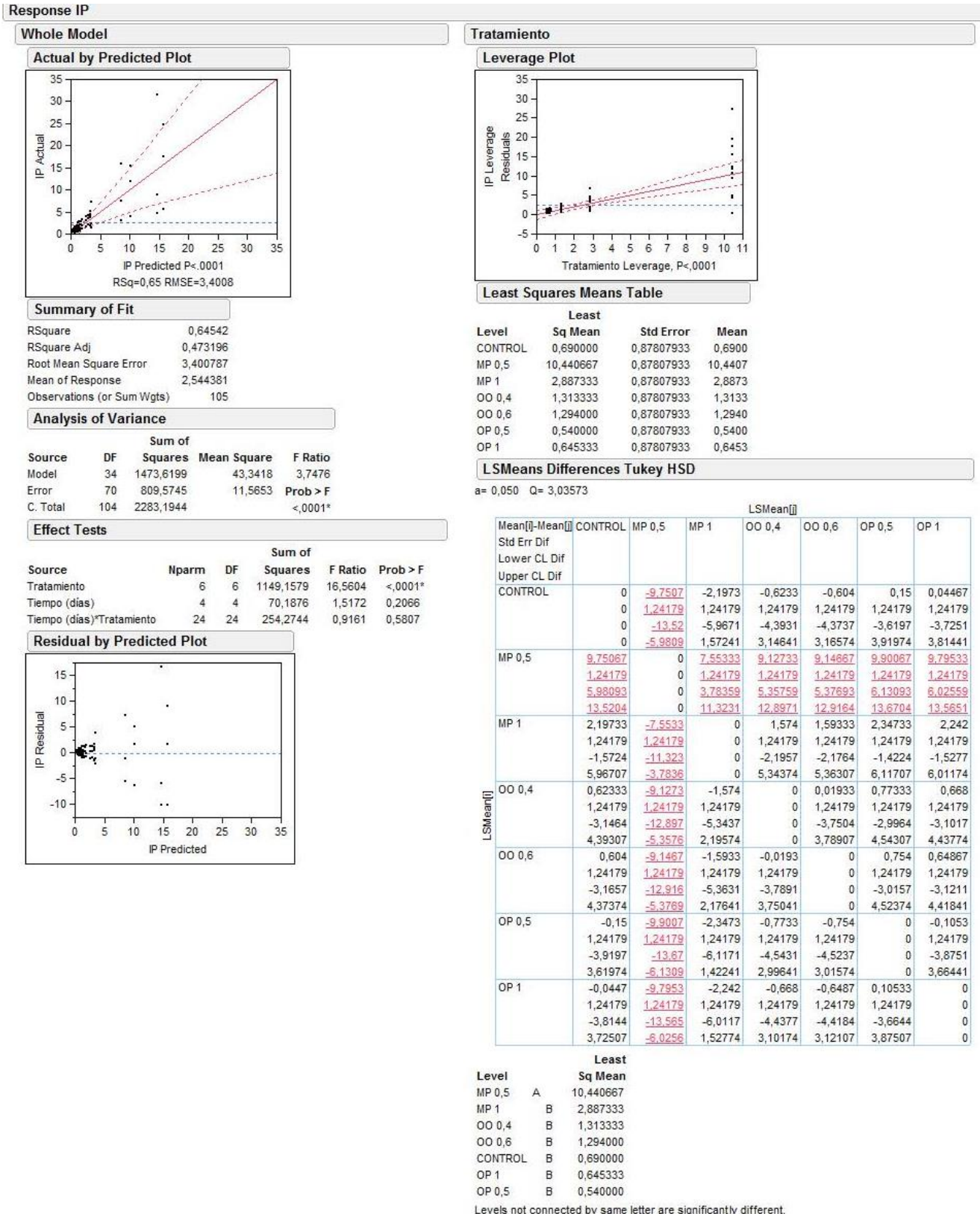


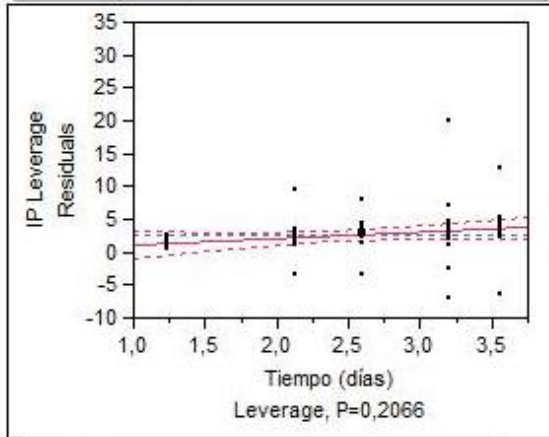
Figura 22. Análisis estadístico del comportamiento del IP en los diferentes geles cárnicos con los diferentes tratamientos durante 20 días de almacenamiento a 5 °C.



Continuación de la Figura 22.

Tiempo (días)

Leverage Plot



Least Squares Means Table

Least			
Level	Sq Mean	Std Error	Mean
0	1,2371429	0,74211248	1,23714
5	2,5985714	0,74211248	2,59857
10	2,1295238	0,74211248	2,12952
15	3,1947619	0,74211248	3,19476
20	3,5619048	0,74211248	3,56190

Power Details

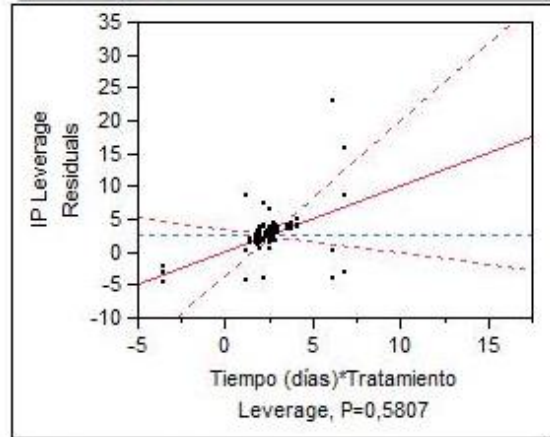
Test Tiempo (días)

Power

a	s	d	Number	Power
0,0500	3,400787	1	105	0,6342

Tiempo (días)*Tratamiento

Leverage Plot



Power Details

Test Tiempo (días)*Tratamiento

Power

a	s	d	Number	Power
0,0500	3,400787	1,556169	105	0,6558

Figura 23. Análisis estadístico del comportamiento del IP en los diferentes geles cárnicos con los diferentes tratamientos en el día 5 de almacenamiento a 5 °C.

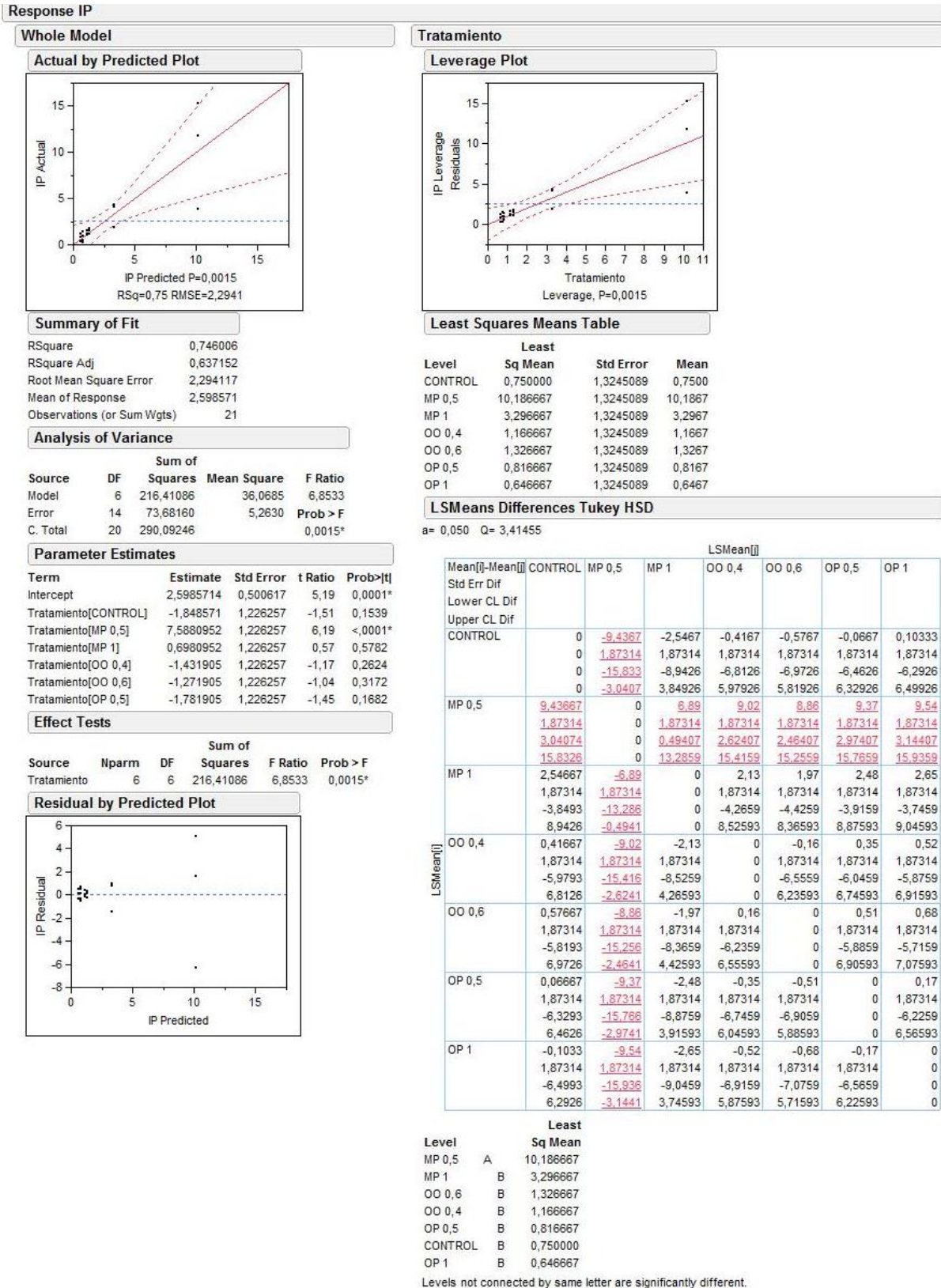


Figura 24. Análisis estadístico del comportamiento del IP en los diferentes geles cárnicos con los diferentes tratamientos sin el tratamiento MP 0,5% en el día 5 de almacenamiento a 5 °C.

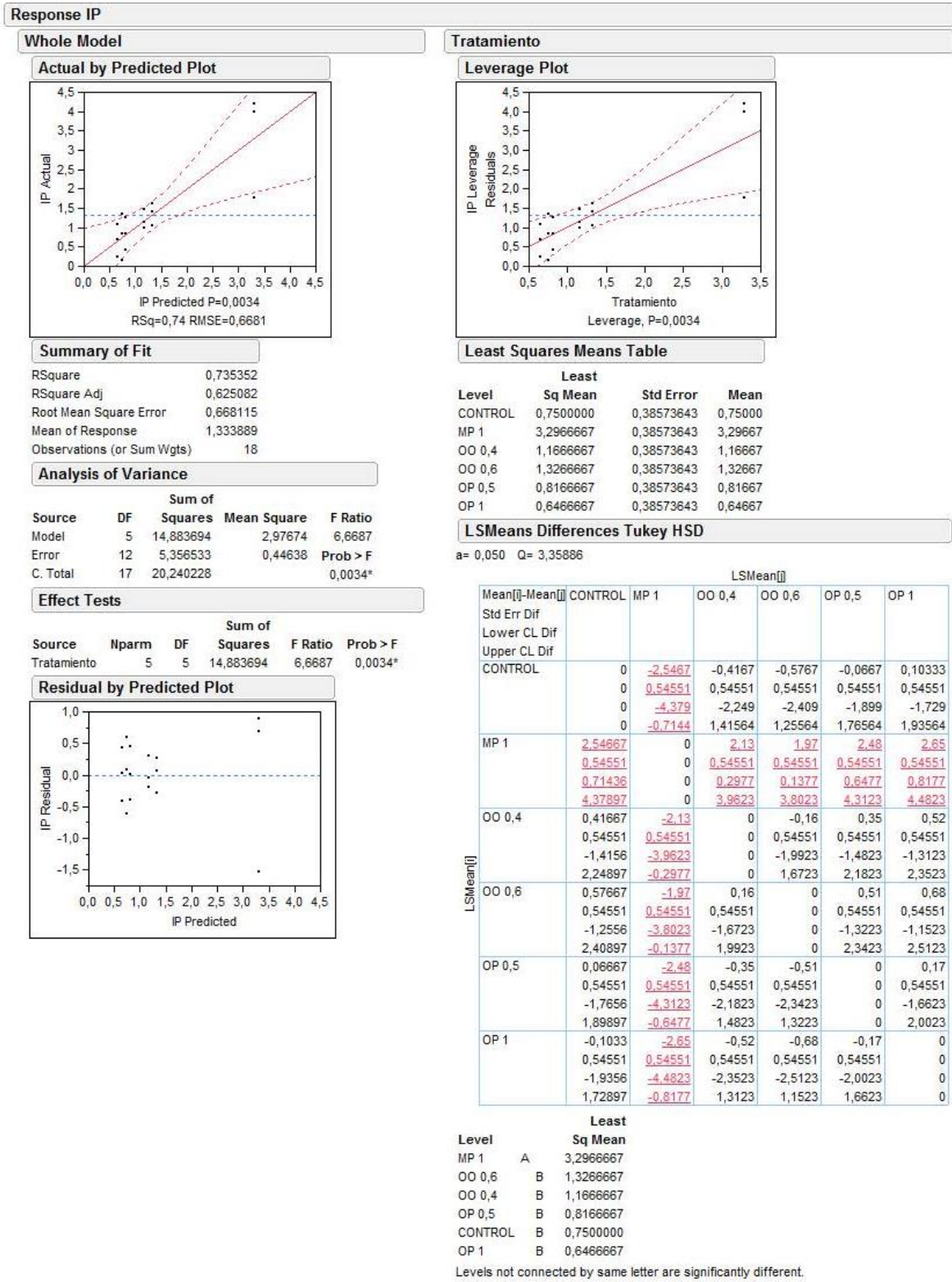
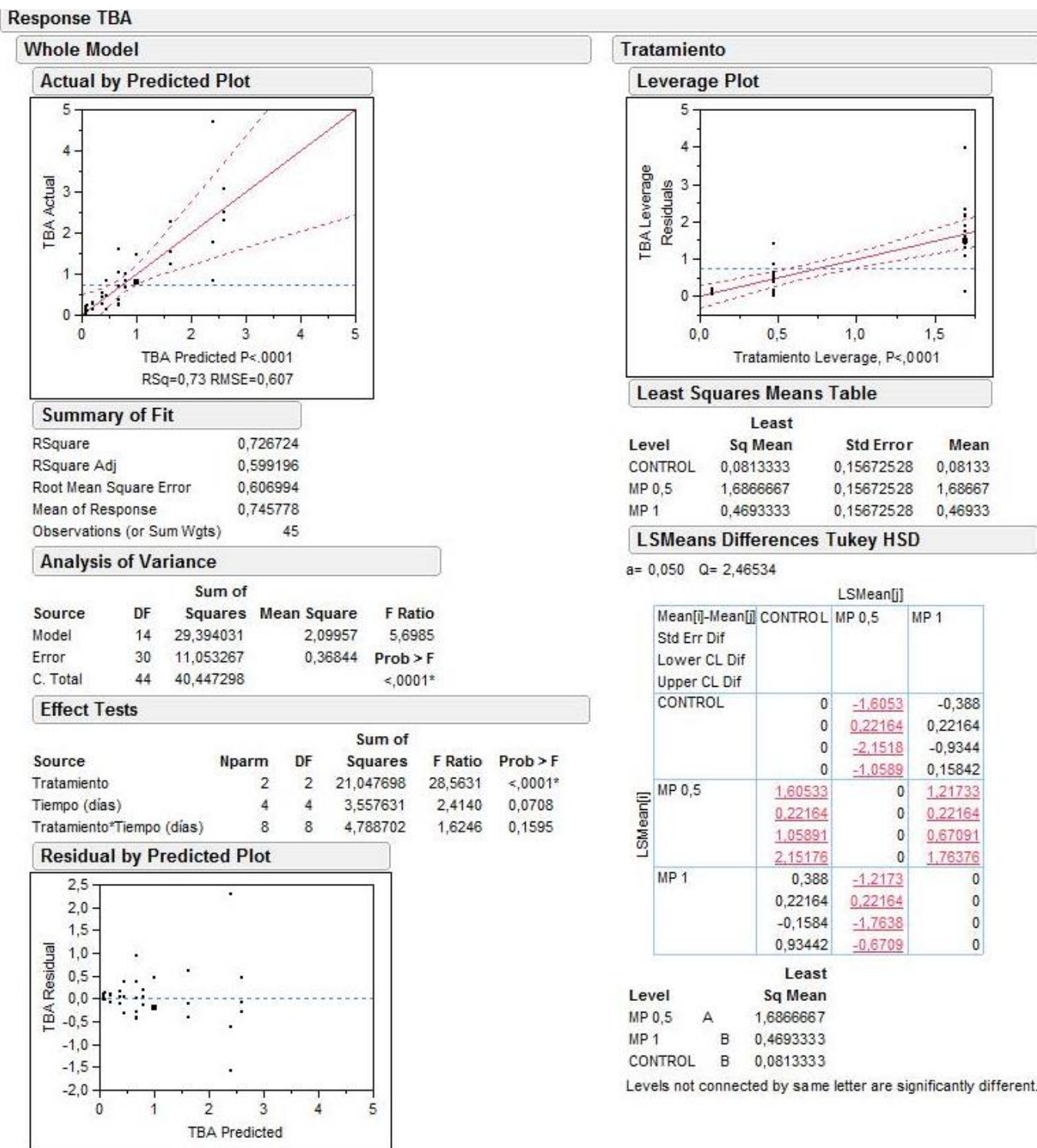


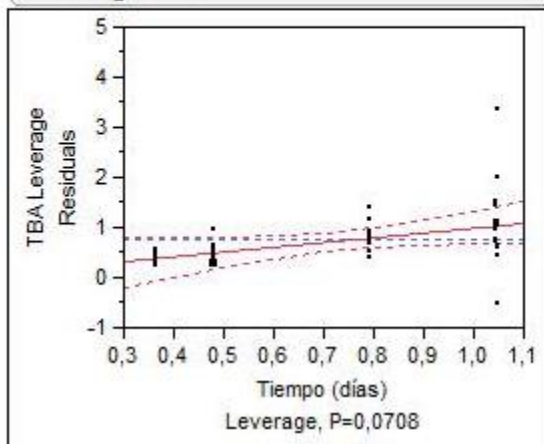
Figura 25. Análisis estadístico del comportamiento del valor del número de TBA en los diferentes geles cárnicos tratados con mostaza china en polvo y nitrito durante 20 días de almacenamiento a 5 °C.



Continuación de la Figura 25.

Tiempo (días)

Leverage Plot



Least Squares Means Table

Least			
Level	Sq Mean	Std Error	Mean
0	0,4811111	0,20233147	0,48111
5	0,7933333	0,20233147	0,79333
10	1,0466667	0,20233147	1,04667
15	1,0422222	0,20233147	1,04222
20	0,3655556	0,20233147	0,36556

Power Details

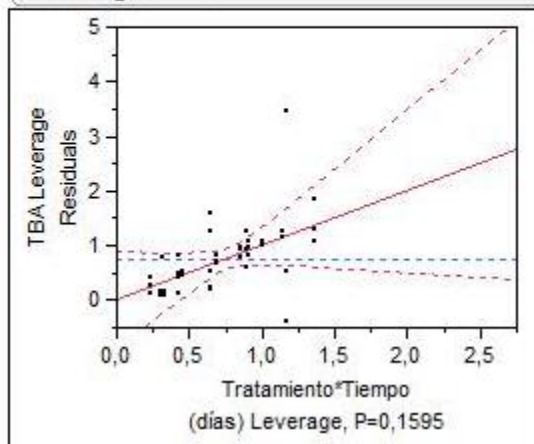
Test Tiempo (días)

Power

a	s	d	Number	Power
0,0500	0,606994	0,5	45	0,9917

Tratamiento*Tiempo (días)

Leverage Plot



Power Details

Test Tratamiento*Tiempo (días)

Power

a	s	d	Number	Power
0,0500	0,606994	0,5	45	0,9596

Figura 26. Análisis estadístico del comportamiento del valor del número de TBA en los diferentes geles cárnicos tratados con mostaza china en polvo y nitrito en el día 15 de almacenamiento a 5 °C.

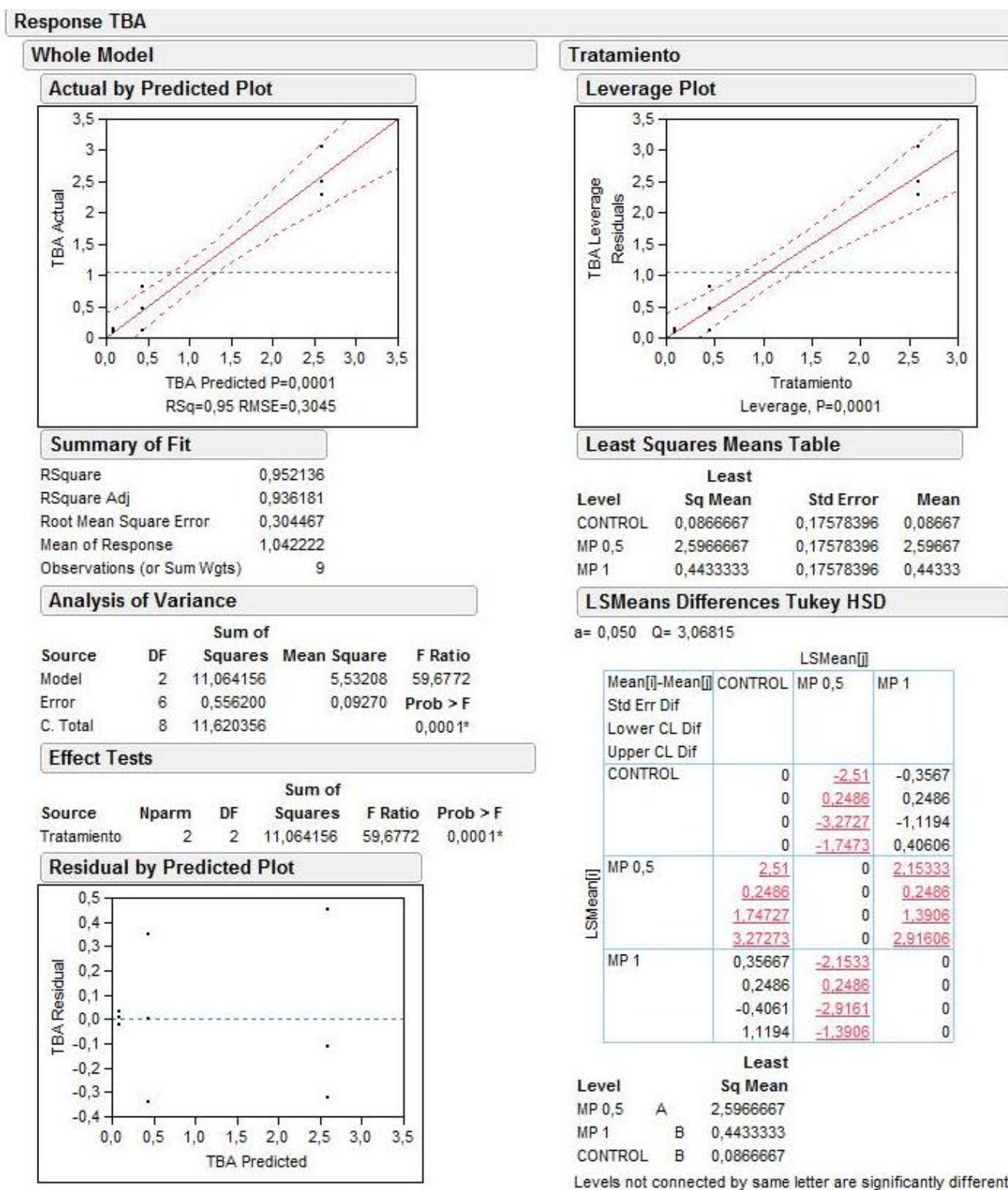


Figura 27. Análisis estadístico de los recuentos microbiológicos de *E. coli* tratado con orégano en polvo al 2,0% y el control.

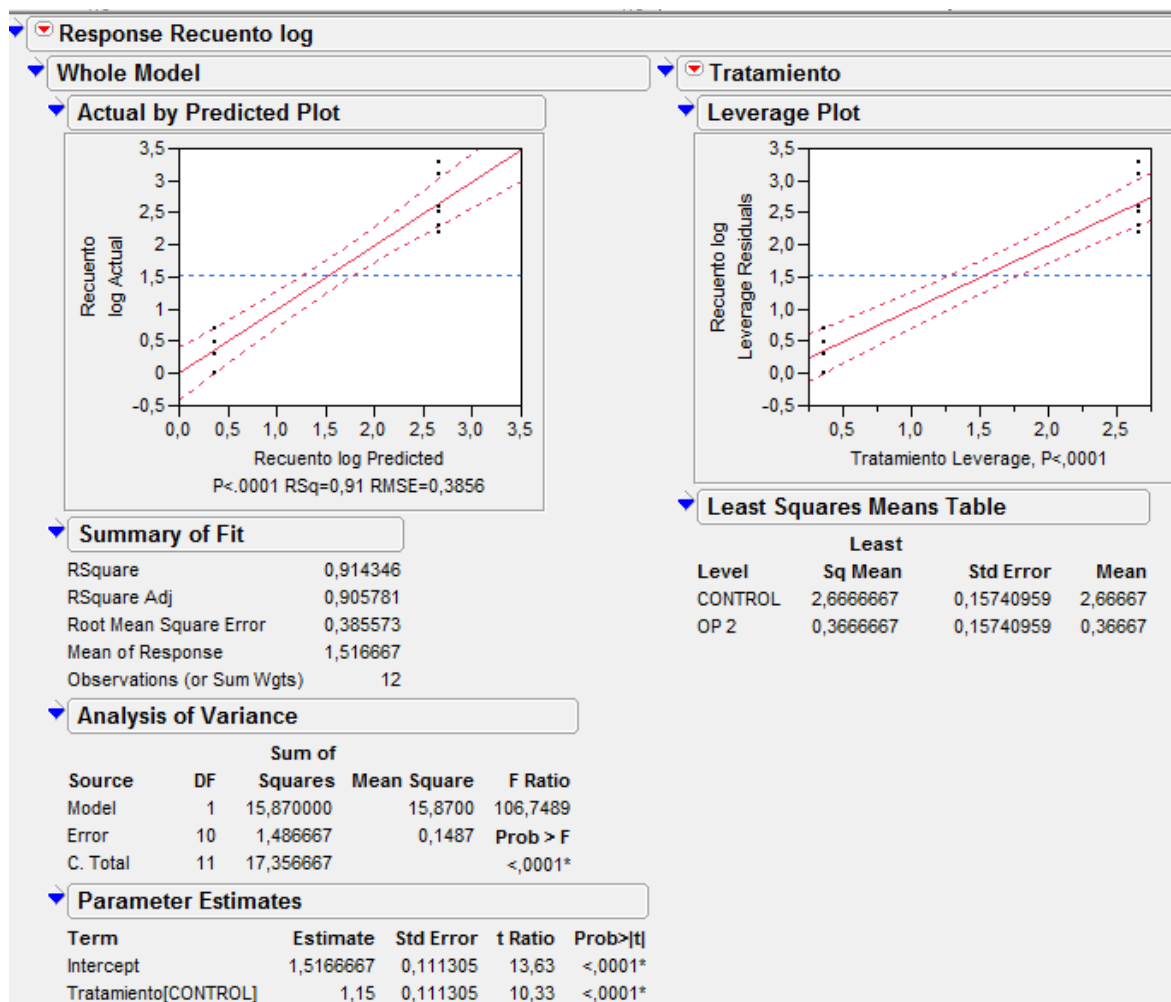


Figura 28. Análisis estadístico de los recuentos microbiológicos de *L. innocua* tratado con orégano en polvo al 2,0% y el control.

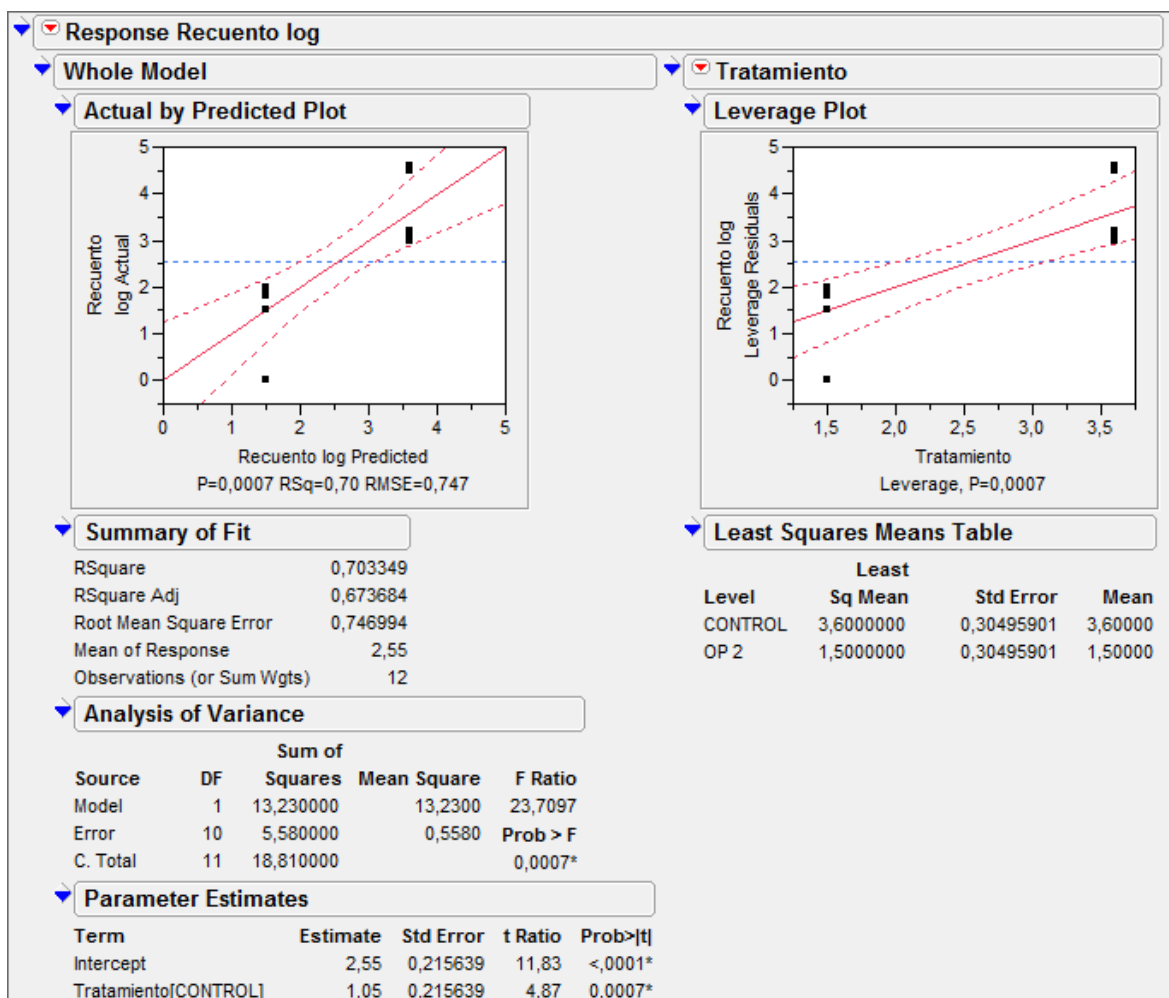


Figura 29. Análisis estadístico de los recuentos microbiológicos de *L. rhamnosus* tratado con orégano en polvo al 2,0% y el control.

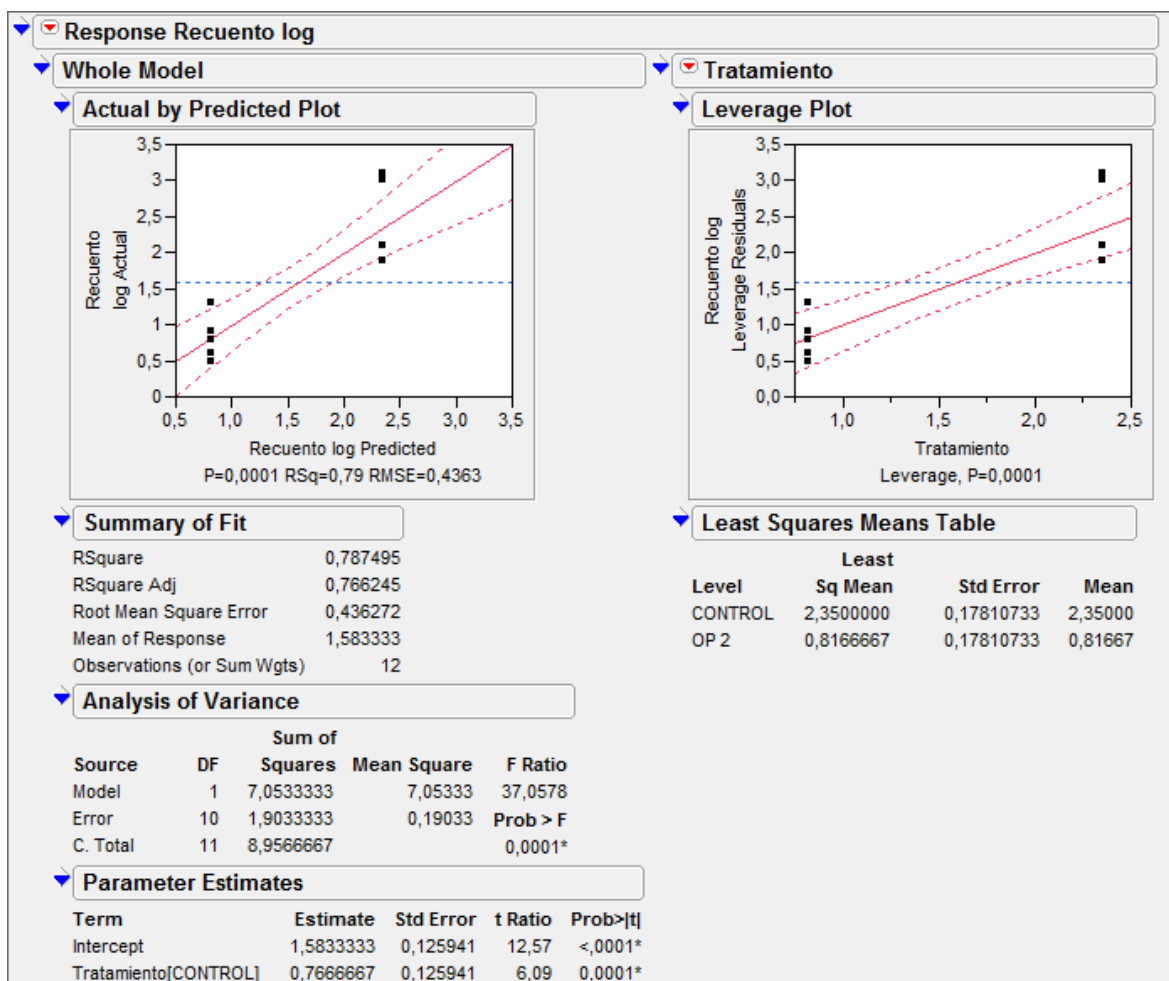


Figura 30. Análisis estadístico de los recuentos microbiológicos de *Pseudomonas* spp. tratado con orégano en polvo al 2,0% y el control.

