

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo final de graduación bajo la modalidad de proyecto para optar por el grado
de Licenciada en Ingeniería de Alimentos

Evaluación del efecto antimicrobiano y antioxidante de las especias: culantro de coyote
(*Eryngium foetidum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y orégano (*Origanum vulgare L.*) para
ser usados como una alternativa natural en la elaboración del chorizo cocido

Elaborado por:

María Marcela Rodríguez González

Carne: 903086

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Setiembre 2017

TRIBUNAL EXAMINADOR

Trabajo final de graduación bajo la modalidad de proyecto presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Elaborado por:

María Marcela Rodríguez González

Aprobado por:

Ileana Morales H.

M. Sc. Ileana Morales Herrera

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Yorleny Araya Q

M.G.A. Yorleny Araya Quesada

PROFESOR DIRECTOR

Gabriela Davidovich

Licda. Gabriela Davidovich Young

PROFESOR ASESOR

Eliana Mora Peraza

Licda. Eliana Mora Peraza

PROFESOR ASESOR

Carmela Velázquez

M. Sc. Carmela Velázquez Carrillo

PROFESOR DESIGNADO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

La información generada en este proyecto se considera de uso público.

DEDICATORIA

A ti mi Creador, que me diste la valentía y la voluntad; a mi amado esposo Róger, amigo incondicional; a mis hijos Sofía y Eduardo; a Tía Hilda q. d. D. g.

AGRADECIMIENTOS

- A mis profesoras asesoras: Yorle por estar siempre tan atenta y jalándome las orejas, a Gabriela por defenderme en el momento que más lo necesité y a Eliana por apoyarme siempre, de todas me llevo un hermoso recuerdo por ser tan humanas y profesionales, hacen muy bien su trabajo, no pude tener mejor equipo de tesis que ustedes...gracias, gracias, gracias!
- A Geova por sus consejos y apoyo desde el primer momento, a Luis que se jaló torta con mis muestras jaja, a Luis y Henry de micro, a Vanny por toda la ayuda brindada, a Camacho por las trabajadas en planta y las levantadas temprano y a Alonso siempre corriendo conmigo, a las secres: Tati y Nela por toda la ayuda.....gracias!
- A mis querid@s profes: Ana Mercedes quien me alentó a terminar este camino, Marcy, Marcia, Nadiarid, Rebeca, Eduardo, Álvaro, Luis, Patricia, Erick, Marjorie, Carmen, Elba, Jacquelline, Ileana, Sandra, Mónica, Manuel, María Lourdes, Marvin y Pedro; todos excelente tutores y seres humanos.....gracias!
- A mis amigas incondicionales: Mery y Flor, son mi apoyo....gracias!
- A mis tíos: Carlos, Yamileth y Clara, por acogerme en su hogar y alentarme.
- Al sueño Molibannann: profes Jessie y Oscar por ese gran trabajo y apoyo; Glori, Jimena, Ana María, Valerie, Valeria y Yock con quienes disfruté algo que nunca esperé vivir y a Natalia y Maricel que nos acompañaron.....gracias!
- A los del bote: Alejandra, Beatriz, Andrea, Ana Eliza, Ariela, Carolina, Crisbel, Eugenia, Silvita y Verny, por esos momentos de apoyo durante mi tesis, a mis compañeras Aurora y Diana; a todos gracias por esos momentos de felicidad y amistad....gracias!
- A mis compas de trabajo: Jeannette, Roberto y Loreana; siempre fuimos un excelente equipo...gracias!
- A mis asistentes de tesis: Pedro y Mauren, fueron un gran apoyo....gracias!

ÍNDICE

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	ii
DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE FIGURA.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
I. JUSTIFICACIÓN	17
II. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo general.....	20
2.2 Objetivos específicos	20
III. MARCO TEÓRICO	21
3.1 Generalidades del chorizo cocido	21
3.1.1 Definición y características.....	21
3.2 Oxidación lipídica en el chorizo cocido	21
3.2.1 Etapa de iniciación	23
3.2.3 Etapa de terminación	24
3.2.3 Prueba del ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	26
3.3 Variación del pH en el chorizo cocido	28
3.4 Microbiología asociada al deterioro del chorizo cocido.....	29
3.4.1 <i>Lactobacillus</i> sp.....	29
3.4.2 <i>Pseudomonas</i> sp.....	31
3.5 Antioxidantes y antimicrobianos naturales versus sintéticos	32
3.6 Propiedades y usos de las especias	32
3.6.1 Culantro de coyote (<i>Eryngium foetidum</i>)	33
3.6.2 Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	35
3.6.3 Orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.).....	36
IV. MATERIALES Y EQUIPOS	39

4.1 Localización del trabajo	39
4.2 Materiales.....	39
4.3 Procesamiento de jengibre, culantro de coyote y orégano	40
4.3.1 Elaboración del chorizo cocido con diferentes combinaciones de culantro de coyote (<i>Eryngium foetidum</i>), jengibre (<i>Zingiber officinale</i>) y orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	41
4.4.1 Análisis de datos	45
4.4.2 Procedimiento experimental:	45
4.5 Evaluación del pH y de la oxidación lipídica por medio del análisis de ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante el almacenamiento del chorizo cocido con especias.....	48
4.5.2. Procedimiento experimental:	48
4.5.1 Análisis de datos:	49
4.6 Determinación del agrado de chorizos cocidos elaborados con una combinación del culantro de coyote (<i>Eryngium foetidum</i>), jengibre (<i>Zingiber officinale</i>) y orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>)	49
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
5.1 Evaluación del efecto antimicrobiano del culantro de coyote (<i>Eryngium foetidum</i>), orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>), jengibre (<i>Zingiber officinale</i>) y sus mezclas sobre el crecimiento de <i>Lactobacillus</i> sp. y <i>Pseudomonas</i> sp. en comparación con los aditivos químicos con función antimicrobiana en el almacenamiento del chorizo cocido.....	51
5.2 Evaluación del pH y de la oxidación lipídica por medio del análisis de TBARS durante el almacenamiento del chorizo cocido con especias.	55
5.2.1 Evaluación del comportamiento del valor del pH en el almacenamiento del chorizo cocido empacado al vacío.....	55
5.2.2 Evaluación del comportamiento del valor del TBARS en el almacenamiento del chorizo cocido empacado al vacío.....	59
5.3 Determinación del agrado de chorizos cocidos elaborados con una combinación del culantro de coyote (<i>Eryngium foetidum</i>), jengibre (<i>Zingiber officinale</i>) y orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>)	63
VI. CONCLUSIONES	66
VII. RECOMENDACIONES	67
VIII. REFERENCIAS CITADAS.....	68
IX. ANEXOS	78
9.1 Resultados intermedios	78

9.1.1 Análisis microbiológico	78
9.1.2 Análisis químico	79
9.2 Análisis Estadísticos	80

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Generación de un nuevo radical libre a partir de la reacción de un grupo metilo con un radical libre. Fuente: Kiokias <i>et. al</i> (2009).	24
Figura 2. Generación de un hidroperóxido y un nuevo radical libre produciendo un mecanismo en cadena de la reacción. Fuente: Kiokias <i>et. al</i> (2009).	24
Figura 3. Subproductos capaces de detener la propagación de cadena de radicales libres, donde AH se presenta como antioxidante, vitamina E, butil hidroxianisol o butil hidroquinona terciaria. Fuente: Kiokias <i>et. al</i> (2009).	25
Figura 4. Formación de malonaldehído (MDA) producto de la oxidación de los aldehídos insaturados con radicales (RH y R1●) generados durante el proceso de oxidación. Fuente: Navarro <i>et. al</i> (2004).	27
Figura 5. Formación del compuesto cromóforo color rosa cuantificable por espectrofotometría a partir de la reacción entre el malonaldehído y el reactivo de TBA en medio ácido. Fuente: Fernández <i>et. al</i> (1997).	27
Figura 6. Cepas de <i>Lactobacillus</i> sp.	30
Figura 7. Cepas de <i>Pseudomonas</i> sp.	31
Figura 8. Culantro de coyote (<i>Eryngium foetidum</i>).	34
Figura 9. Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>).	35
Figura 10. Orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.).	37
Figura 11. Diagrama de flujo para la elaboración de las muestras de los diferentes tratamientos de chorizo. (Mora, 2015).	42
Figura 12. Embutidora manual elaborada en el taller del CITA.	46
Figura 13. Comportamiento de todos los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento para el recuento de <i>Lactobacillus</i> sp.	52
Figura 14. Comportamiento de todos los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento para el recuento de <i>Pseudomonas</i> sp.	54
Figura 15. Comportamiento de los valores de pH de cada uno de los tratamientos evaluados a través de 36 días de almacenamiento del chorizo cocido empacado al vacío y almacenado a 4°C.	56
Figura 16. Representación gráfica del cambio neto del pH en el tiempo de cada tratamiento en el chorizo cocido, empacado al vacío y almacenado a 4°C.	58

Figura 17. Color del destilado después de reaccionar con el reactivo de TBA en un chorizo cocido, empacado al vacío y almacenado por 36 días a 4°C. (a) día 36 y (b) día 29.....	59
Figura 18. Comportamiento de la oxidación de cada tipo de chorizo a través del tiempo de almacenamiento a 4°C del chorizo cocido y empacado al vacío con los tres tratamientos, mediante análisis de TBA. Las diferentes letras sobre los promedios indican diferencias significativas con un 95% de confianza.	61
Figura 19. Dendograma de la clasificación ascendente jerárquica en la obtención de 3 clústers de la prueba de agrado del chorizo empacado al vacío y almacenado a 4°C del mercado y los chorizos con los diferentes tratamientos.....	63
Figura 20. Comparación de medias de las calificaciones dadas por los consumidores de cada conglomerado para los chorizos. a) Conglomerado 1, b) Conglomerado 2, c) Conglomerado 3. Observación: Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas con un 95% de confianza.T1: tratamiento con jengibre al 0,5% y culantro al 0,5%.T2: tratamiento con orégano al 1%.T3: tratamiento con jengibre al 0,5%, culantro al 0,5% y orégano al 1%.M: chorizo que se expende en el mercado.....	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Materiales y equipo utilizados para el desarrollo del proyecto.....	39
Cuadro II. Formulaciones de chorizo para el desarrollo de los diferentes tratamientos por evaluar.....	41
Cuadro III. Tratamientos que evaluaron el efecto de cada bacteria según la muestra y tiempo de almacenamiento (n = 3).....	44
Cuadro IV. Tratamientos para evaluar el efecto de las especias en el análisis de TBARS y pH durante el tiempo de almacenamiento (n = 3).....	49
Cuadro V. Cambio neto del pH experimentado por el chorizo cocido durante el período de 36 días de almacenamiento, empacado al vacío y almacenado a 4°C (n = 3).....	57
Cuadro VI. Promedios de los resultados obtenidos de TBA de los tres tratamientos a diferentes tiempos de almacenamiento un chorizo cocido, empacado al vacío y almacenados a 4 °C (n=3; ± desviación estándar).....	60
Cuadro VII. Promedio en base logarítmica de los recuentos de <i>Lactobacillus</i> sp. en los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento (n=3; intervalo de confianza).....	77
Cuadro VIII. Promedio en base logarítmica de los recuentos de <i>Pseudomonas</i> sp. en los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento (n=3; intervalo de confianza).....	77
Cuadro IX. Promedio de los valores de pH en los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento (n = 6; Desviación estándar).....	78
Cuadro X. Promedio de los valores de TBA en los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento (n = 6; Desviación estándar).....	78
Cuadro XI. Análisis de Varianza a partir del recuento total del <i>Lactobacillus</i> sp. en los tratamientos a diferentes tiempos en el chorizo cocido (n = 3).....	79

Cuadro XII. Análisis de Varianza a partir del recuento total del <i>Pseudomonas</i> sp. en los tratamientos a diferentes tiempos en el chorizo cocido (n=3).....	79
Cuadro XIII. Valores p del análisis de varianza para de efectos simples o de interacción de los tratamientos con respecto al análisis de pH del chorizo cocido (n=3).....	79
Cuadro XIV. Análisis de Varianza en el estudio de TBARS en los tratamientos a diferentes tiempos en el chorizo cocido (n = 3).....	79

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AAPPA	Academia Del Área De Plantas Piloto De Alimentos
ANDEVA	Análisis de Varianza
AOAC	Association Of Analytical Communities
APE	Agua peptonada
ATCC	American Type Culture Collection
BHA (E-320)	Butil-hidroxi-anisol
BHT (E-321)	Butil-hidroxi-tolueno
°C	Grados Celsius
CBA	Canasta Básica Alimentaria
CCECR	Cámara Costarricense de Embutidores de Costa Rica
CITA	Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos
Cm	Centímetros
Cu	Cobre
F	Agar F para Pseudomonas
Fe	Hierro
G	Gramos
H	Hora
JMP8	Software para realizar hallazgos estadísticos
Kg	Kilogramo
LSD	Método de la diferencia significativa mínima de Fisher
M	Muestra de chorizo que se encuentra en el mercado actualmente
MAG	Ministerio de Agricultura y Ganadería
MDA	Malonaldehído
MEIC	Ministerio de Economía Industria y Comercio
m/s	Metros por segundo
Mg	Miligramos
Mm	Milímetros
MRS	Agar para <i>Lactobacillus</i> sp.
NDC32	Código de la funda usada
P	Probabilidad

PG	Galato de propilo
pH	Medida de acidez o alcalinidad de una disolución
Ppm	Partes por millón
PROCOMER	Promotora de Comercio Exterior
RTCR	Reglamento Técnico para Costa Rica
RH, R●, ROO●	Radicales
ROOH	Hidroxiperóxidos
T1	Tratamiento 1: 0,5% de culantro + 0,5% de jengibre
T2	Tratamiento 2: 1% de orégano
T3	Tratamiento 3: 0,5% culantro + 0,5% jengibre + 1% de orégano
T4	Tratamiento 4: control positivo (con aditivos químicos)
T5	Tratamiento 5: control negativo (sin aditivos químicos)
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Análisis de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Terbutil hidroquinona
UFC	Unidades formadoras de colonias
μg	Microgramos

RESUMEN

María Marcela Rodríguez González

Evaluación del efecto antimicrobiano y antioxidante de las especias: culantro de coyote (*Eryngium foetidum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y orégano (*Origanum vulgare L.*) para ser usados como una alternativa natural en la elaboración del chorizo cocido.

TESIS Ingeniería de Alimentos. San José, Costa Rica.

M. Rodríguez G., 2017

80h.: 20 fig. – 14 cuad. - 91 refs.

Se evaluó el efecto antimicrobiano de las siguientes especias secadas y molidas: culantro de coyote (*Eryngium foetidum*), orégano (*Origanum vulgare L.*), jengibre (*Zingiber officinale*) y sus mezclas sobre el crecimiento de *Lactobacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. en comparación con los aditivos químicos (lactato, diacetato y sorbato) con función antimicrobiana normalmente utilizados en la industria cárnica. Se comparó la capacidad antioxidante de dichas especias y sus mezclas por medio del análisis de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico TBARS, en comparación con el aditivo químico TBHQ con función antioxidante. Los anteriores análisis químicos y microbiológicos se realizaron durante el almacenamiento por 36 días del chorizo cocido, empacado al vacío y almacenado a 4°C; además se evaluó el agrado sensorial de los chorizos, elaborados con una combinación del culantro de coyote (*Eryngium foetidum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y orégano (*Origanum vulgare L.*) para evaluar su aplicación a nivel industrial.

Se utilizó un diseño irrestricto aleatorio con un arreglo factorial de dos factores, el factor tipo de chorizo con tres tratamientos: T1: culantro 0,5% - jengibre 0,5%, T2: orégano 1,0%, T3: culantro 0,5% - jengibre 0,5% - orégano 1,0% y dos controles: T4: control positivo (con aditivos químicos) y T5: control negativo (sin aditivos químicos) y el factor tiempo con 5 muestreos a lo largo de 36 días de almacenamiento. Como variable respuesta para el análisis microbiológico se utilizó el conteo de *Lactobacillus* sp y *Pseudomonas* sp. y para el análisis químico el número de TBA y pH. Se hicieron 3

repeticiones independientes del experimento. Para el análisis de agrado, se utilizó un arreglo unifactorial de cuatro niveles (T1, T2, T3 y M), donde M es la muestra del mercado, a los datos se les aplicó un análisis de conglomerados. Para cada grupo se aplicó un ANDEVA para evaluar la diferencia entre las muestras, y se aplicó la prueba de comparación de medias LSD donde hubo diferencia significativa con el programa JMP8.

No se presentó efecto antimicrobiano por parte de ninguna de las especias evaluadas, frente al *Lactobacillus* sp., sólo hubo efecto en el tiempo ($p < 0,05$) con un nivel de confianza del 95%. Para *Pseudomonas* sp. los tratamientos que se comportaron de manera similar al tratamiento con aditivos fueron los que contenían 1,0% de orégano, sin embargo no se puede asegurar ningún efecto antimicrobiano ya que la presencia de vacío en conjunto con el tratamiento pudieron ser los factores que controlaron el crecimiento de *Pseudomonas* sp. por ser esta una bacteria aerobia. El análisis de pH mostró interacción tiempo vs tratamiento ($p=0,001$), siendo el T2 con orégano y el T4 con aditivos los que se comportaron de manera similar. El tratamiento T4: control positivo fue el que presentó mayor oxidación lo cual fue un comportamiento inesperado y el T1: culantro-jengibre fue el que presentó menor oxidación ($p<0,001$). El índice de TBA aumentó a través del tiempo de almacenamiento ($p<0,001$) presentando el máximo de TBA el día 29, ningún valor alcanzado sobrepasó los valores límites recomendados de 1 mg de MDA por kg de muestra. El chorizo con 1% de orégano que corresponde al T1 muestra resultados de agrado similares a un chorizo que está en el mercado por lo que se escoge como el producto con mayor potencial para colocarse en el mercado ($p<0,001$).

Palabras claves: ADITIVOS QUÍMICOS, EFECTO ANTIMICROBIANO, EFECTO ANTIOXIDANTE, JENGIBRE, CULANTRO, ORÉGANO, MICROORGANISMOS DE DETERIORO, ALMACENAMIENTO, TBARS, pH, CHORIZO COCIDO, VACÍO, AGRADO SENSORIAL.

Director de la investigación: M.G.A. Yorleny Araya Quesada

Unidad Académica: Escuela de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias

Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica.

I. JUSTIFICACIÓN

Según el Ministerio de Economía Industria y Comercio, la industria de embutidos y procesamiento de carne costarricense se inició de forma casera y manual, muy diferente al concepto que hoy tenemos de dicha producción (MEIC, 2007). Parte importante del sector cárnico está representada por la Cámara Costarricense de Embutidores y Procesadores de Carne de Costa Rica, CCEPCCR, cuya misión es aumentar el consumo de embutidos y carnes procesadas, por medio de la formalización industrial, comunicándole y garantizándole al consumidor la mejor alternativa nutricional, conveniencia, inocuidad y calidad (CCECR, 2015).

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC, 2016) en la estructura calórica de la nueva Canasta Básica Alimentaria (CBA) Nacional, los embutidos representan el 4,42% del costo total, lo que implica que es un producto cárnico barato; este bajo costo económico junto a la variedad de chorizos que se encuentran en el mercado, son las razones por las que el consumo de dicho producto va en aumento, por tanto mejorarlo nutricionalmente es de gran importancia.

Actualmente existe una tendencia a desarrollar productos cárnicos con ingredientes naturales, debido al aumento de consumidores interesados en hábitos alimenticios saludables con etiquetas limpias y alto aporte nutricional (Sloan, 2015); por tanto, un estudio como este es importante ya que hay nichos de mercado donde son aceptados.

Según el RTCR (2008) uno de los productos embutidos de mayor consumo en Costa Rica es el chorizo, el cual según esta norma se define como: “Producto crudo, cocido o precocido, elaborado sobre la base de carne fresca o congelada, con agregado o no de carne cocida, de animales autorizados, con agregado de grasa comestible, perfectamente trituradas y mezcladas, emulsionado o no, elaborado con ingredientes de uso permitido, con una molienda mayor a 3 mm e introducido en tripas autorizadas con un perímetro máximo de 160 mm, ahumado o no. Para efectos de esta norma el chorizo precocido se considera como un producto crudo” (RTCR, 2008). Entiéndase producto crudo como: “embutidos, cualquiera que sea su forma de elaboración que no han sido sometidos a cocción” (RTCR, 2008). Cabe destacar que la normativa de SENASA 4238 en el capítulo 16 establece que los embutidos pueden ser frescos, secos o cocidos.

El chorizo es un alimento con un alto contenido de grasa. Según el reglamento vigente en Costa Rica, se permite una cantidad de grasa igual o menor al 40% (RTCR, 2008), lo cual hace que la oxidación lipídica se dé con más facilidad y se incremente con los procesos de cocción. La oxidación lipídica es una de las principales fuentes de deterioro que se presenta comúnmente en los chorizos (Rogers, 2001). Esto ocurre por la auto-oxidación de los fosfolípidos y ácidos grasos poliinsaturados según las cantidades presentes (Marqués, *et. al*, 2013)

Este proceso oxidativo en conjunto con la susceptibilidad microbiológica del chorizo, son factores que reducen su vida útil, ya que son responsables de la generación de olores y sabores indeseables, disminución en el valor nutricional y de la formación de sustancias potencialmente tóxicas, las cuales después de un corto período de almacenamiento en frío hacen que el alimento sea inadecuado para su consumo (Marqués *et. al*, 2013).

Según Wong y Kitts (2006), en evaluaciones del deterioro microbiano que sufren los embutidos se han realizado estudios que han demostrado la eficacia del culantro (*Eryngium foetidum*), en la inhibición del crecimiento de *Lactobacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. además en un estudio realizado por Kubo y colaboradores (2004) donde a partir de hojas frescas de culantro se extrajeron los componentes volátiles alifáticos (2E) -alcanos y alquenos y por medio de análisis microbiológico se demostró que estos compuestos tienen actividad bactericida contra *Salmonella choleraesuis* en cualquier etapa de crecimiento por consiguiente este efecto bactericida proviene en parte de la capacidad de actuar como tenso activos no iónicos.

Con respecto a la capacidad antioxidante que presenta el jengibre, Ibrahim y colaboradores (2011) realizaron un análisis de TBARS sobre el efectivo resultado antioxidante que produjo la adición de jengibre como aceite esencial a empanadas de cordero y Brewer (2011) habla sobre los contenidos fenólicos con capacidades antioxidantes como el gingerol del jengibre seco.

Lo mismo se indica para el orégano en el cual Nostro y colaboradores (2007) reportan que su capacidad antioxidante y antimicrobiana se atribuye principalmente a la acción de sus principales componentes fenólicos, carvacrol y timol, que exhiben actividad bactericida y antioxidante. Un estudio de Marqués y colaboradores (2013) comparó las propiedades

antioxidantes del orégano en carne de pollo precocinada con las de salvia, donde el orégano resultó ser más eficiente. Estos antecedentes bibliográficos hacen interesante evaluar estas tres especias.

Anteriormente en el 2015 se realizó un estudio de Zapata (2015), donde se evaluó la capacidad antioxidante del jengibre (*Zingiber officinale*) y culantro de coyote (*Eryngium foetidum*) en diferentes concentraciones en un gel cárnico modelo por la técnica de difusión en disco con agar, donde usó *Lactobacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. ambas cepas almacenadas en refrigeración. Se encontró que el jengibre en polvo al 0,5% mostró capacidad antioxidante. Con respecto a la actividad antimicrobiana *in vitro*, tanto en el estudio de Zapata (2015) como en otro estudio en el 2016 donde Acón (2016), se reportó que el culantro de coyote en polvo al 0,5% y el orégano en polvo al 2% (*Origanum vulgare* L.) respectivamente, tienen efecto antimicrobiano.

Es a partir de estos análisis y de los antecedentes bibliográficos que se considera desarrollar este proyecto aplicando los resultados obtenidos de los estudios de Zapata y Acón, pero esta vez para evaluar su capacidad antioxidante y antimicrobiana en una matriz más compleja como es el caso de un chorizo cocido.

El utilizar orégano, jengibre y culantro de coyote constituye una oportunidad para el uso de ingredientes naturales y así reducir los aditivos tradicionales como: TBHQ, lactato-diacetato de sodio o sorbato de potasio, aspecto que forma parte de las actuales demandas del consumidor. Por lo tanto, el propósito de este trabajo es evaluar si los ingredientes naturales anteriormente mencionados pueden funcionar como antioxidantes y antimicrobianos cuando se adicionan en un chorizo cocido, que es un producto tan versátil y ampliamente utilizado por los consumidores.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición de culantro de coyote (*Eryngium foetidum*), jengibre (*Zingiber officinale*), orégano (*Origanum vulgare L.*) y sus mezclas, como antioxidantes y antimicrobianos durante el almacenamiento de un chorizo cocido.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Comparar el efecto antimicrobiano del culantro de coyote (*Eryngium foetidum*), orégano (*Origanum vulgare L.*), jengibre (*Zingiber officinale*) y sus mezclas sobre el crecimiento de *Lactobacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. en comparación con los aditivos químicos (sal de cura, lactato, diacetato y sorbato) con función antimicrobiana normalmente utilizado en la industria cárnica, durante el almacenamiento del chorizo cocido.

2.2.2 Determinar la capacidad antioxidante del culantro de coyote (*Eryngium foetidum*), orégano (*Origanum vulgare L.*), jengibre (*Zingiber officinale*) y sus mezclas por medio de un análisis de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico TBARS, respecto al TBHQ con función antioxidante durante el almacenamiento del chorizo cocido.

2.2.3 Evaluar el agrado sensorial de chorizos cocidos elaborados con una combinación de culantro de coyote (*Eryngium foetidum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y orégano (*Origanum vulgare L.*) para confirmar la posibilidad de su aplicación a nivel industrial.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades del chorizo cocido

3.1.1 Definición y características

El chorizo cocido es aquel producto alimentario que ha sido sometido durante su proceso de elaboración a un tratamiento térmico tal que la relación temperatura interna/tiempo de exposición, garanticen la eliminación de patógenos. Es un producto elaborado con base en carne picada (molienda mayor a 3 mm), vísceras y subproductos cárnicos, las cuales deben provenir de animales de abasto sanos, sacrificados en mataderos autorizados y con inspección médico veterinaria oficial, grasa comestible de origen animal o vegetal, además pueden contener sal, especias, condimentos, hielo, agua, aditivos permitidos; es un producto que se presenta embutido en una tripa autorizada con un perímetro máximo de 160 mm (RTCR 411, 2008).

El chorizo cocido lleva un tratamiento térmico que según el reglamento establecido debe alcanzar una temperatura interna de 72 °C (RTCR 411, 2008); lo que conlleva a un cambio tanto físico como químico de la matriz, y se da la destrucción de microorganismos de deterioro aumentando la vida útil del mismo (Potter y Hotchkiss, 2007).

Es así como tanto los métodos de análisis sensorial, de manufactura, empaque, tiempo, temperatura y humedad relativa durante el transporte y almacenamiento son los factores que determinan la calidad de un chorizo cocido a través del tiempo de almacenamiento; la calidad se puede ver reducida por pérdida de nutrientes y cambios sensoriales indeseables producidos por mecanismos químicos, físicos y alteraciones microbianas (Labuza y Schmidl, 1985; Kopper, 1994). La oxidación lipídica, el comportamiento del pH y el crecimiento de microorganismos de deterioro son factores de calidad importantes durante el almacenamiento por lo que se amplía sobre estos en el apartado 3.2.

3.2 Oxidación lipídica en el chorizo cocido

La oxidación lipídica es la principal causa de deterioro no microbiano en los chorizos cocidos por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, presencia de fosfolípidos, iones metálicos, oxígeno, pigmentos hemo, adición de sal y procesos mecánicos de corte,

todo esto en conjunto propicia la aparición de olores y sabores desagradables, además altera el color de la carne reduciendo la calidad del producto, disminuyendo el valor nutritivo y generando compuestos nocivos para la salud (Bou *et. al*, 2009).

La oxidación lipídica es una reacción favorable termodinámicamente y negativa cinéticamente, por tanto necesita la presencia de un catalizador. Se da por dos vías de alteración donde ambas se forman de manera simultánea; la oxidación enzimática que se desarrolla con enzimas endógenas tales como las lipoxigenasas, peroxigenasas y oxidasas, la otra vía es la oxidación no enzimática donde los catalizadores son agentes del tipo metales especialmente de transición, luz y calor. (Sanjuás, 2012).

El desarrollo de reacciones oxidativas en el chorizo cocido, se producen principalmente en los fosfolípidos presentes en la membrana celular, por la exposición al oxígeno, luz, calor e iniciadores tales como radicales libres que van formando peróxidos. El oxígeno (O_2) produce el daño conocido como “estrés oxidativo”, consecuencia de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y los mecanismos de defensa antioxidantes (Belitz y Grosch, 1997).

Tanto los lípidos como las proteínas son idóneos para sufrir dicho “estrés oxidativo”. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) actúan sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como resultado de la peroxidación lipídica, la cual se inicia cuando un átomo de hidrógeno es capturado en la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que en un ambiente aerobio se desarrolla una interacción del radical carbonilo ($R\bullet$) con el O_2 dando lugar a la formación del radical peróxilo ($ROO\bullet$), radical hidroxilo ($OH\bullet$), el radical anión superóxido ($O_2\bullet$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) continuando con una reacción secuencial en la cual se sustrae un nuevo H de un ácido graso y formando al ROOH que por descomposición formará el radical alcóxilo ($RO\bullet$) (Estévez *et. al*, 2008).

Los radicales libres con el fin de estabilizarse, sustraen un hidrógeno de un ácido graso generalmente colindante a una insaturación o doble enlace, convirtiéndolo en un radical lipídico; el O_2 se une al radical lipídico formando un radical lipoperóxido, mismo que busca estabilizarse y sustrae un hidrógeno de otro ácido graso vecino creando de esta forma un lipohidroperóxido (LOOH) y un nuevo radical lipídico generando una reacción en cadena

que termina en la oxidación progresiva de las grasas presentes de la carne afectando los ácidos grasos insaturados, los grupos hemo de los pigmentos, los aminoácidos de las proteínas y los dobles enlaces de las vitaminas; los LOOH se descomponen en aldehídos y otras sustancias de descomposición como productos secundarios volátiles de bajo peso molecular y no volátiles de alto peso molecular que continúan reaccionando con otros componentes de la carne como lo son las proteínas, hidratos de carbono y agua, que afectan sensorialmente al producto de manera negativa (Carballo, 2013; Terevinto, 2010).

Una vez que el sacrificio del animal se realiza, inicia el proceso de peroxidación autocatalítica donde los cambios bioquímicos propios del metabolismo y la maduración de la carne favorecen las condiciones entre los factores pro-oxidantes contra la capacidad oxidante; el tiempo de oxidación depende de varios factores como son: manejo del animal antes del sacrificio, alimentación de éste, tipo de tejido muscular, pH y temperatura de la carcasa; el deshuesado, procesado y reestructuración de las membranas musculares de la carne facilitan las reacciones entre los pro-oxidantes con los ácidos grasos insaturados generando radicales libres y expansión de la reacción oxidativa (Carballo, 2013).

A bajas temperaturas se presenta la auto-oxidación de los ácidos grasos insaturados mediante un proceso autocatalítico a través de un mecanismo de radicales libres que vienen a ser los compuestos intermedios en una reacción que presenta una etapa de iniciación, una etapa de propagación y una etapa de terminación (Carballo, 2013).

3.2.1 Etapa de iniciación

En esta etapa la lipólisis de fosfolípidos y triglicéridos, en presencia de lipasas, genera ácidos grasos sensibles a la oxidación (Gandemer, 1998). Desde el punto de vista químico, el hidrógeno se extrae de una molécula de ácido olefínico (RH) para formar lentamente radicales alquilo (R•) en presencia de un catalizador como los iones metálicos Fe^{+3} y Cu^{+2} , luz, calor o radiación; el tiempo que se demora en finalizar esta etapa, depende del grado de insaturación de los ácidos grasos, de la concentración intracelular y de los antioxidantes naturales o sintéticos presentes (Farmer, 1994).

Como se representa en la figura 1, un radical libre ataca a un grupo metilo de la cadena carbonada del ácido graso sustrayendo un átomo de hidrógeno formando un nuevo radical libre:

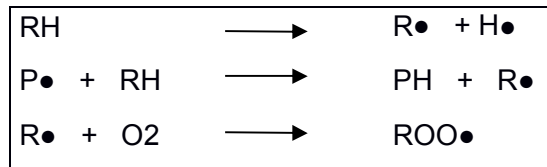


Figura 1. Generación de un nuevo radical libre a partir de la reacción de un grupo metilo con un radical libre. Fuente: Kiokias *et. al* (2009).

3.2.2 Etapa de propagación

La formación del radical R• en la fase de iniciación en presencia de oxígeno molecular forma radicales peróxilo (ROO•) que reacciona para formar hidroperóxidos ROOH y la formación de un nuevo radical libre R• propagando la reacción Kiokias *et. al* (2009) como lo muestra la figura 2.

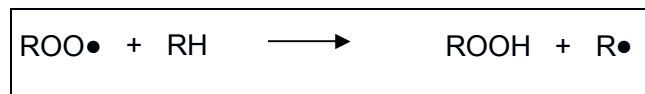


Figura 2. Generación de un hidroperóxido y un nuevo radical libre produciendo un mecanismo en cadena de la reacción. Fuente: Kiokias *et. al* (2009).

3.2.3 Etapa de terminación

Durante esta etapa se da la aniquilación mutua de los radicales libres como se presenta en la figura 3; la reacción puede detenerse mediante la adición de un antioxidante el cual actúa como un secuestrante de radicales libres donde el electrón no apareado del antioxidante se deslocaliza dentro de la estructura del anillo aromático estabilizando al compuesto formado; una segunda manera de detener la reacción es que cualquier clase de radical libre alquílico del lípido R• reaccione con un radical libre lipídico peroxi ROO• formando una especie estable no iniciadora y no propagadora y una tercera forma es cuando dos radicales libres alquílicos R• se unen Kiokias *et. al* (2009).

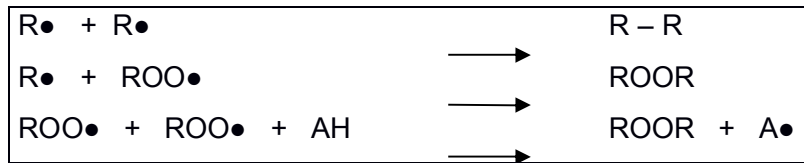


Figura 3. Subproductos capaces de detener la propagación de cadena de radicales libres, donde AH se presenta como antioxidante, vitamina E, butil hidroxianisol o butil hidroquinona terciaria. Fuente: Kiokias *et. al* (2009).

Durante todo el proceso de oxidación las proteínas se oxidan produciendo transformaciones en ciertos aminoácidos, fragmentación de la cadena peptídica, agregaciones, entrecruzamientos y un aumento de la susceptibilidad a la proteólisis. Los procesos oxidativos que afectan a las proteínas llevan a la formación de agregados proteicos que podrían tener un efecto sobre la digestibilidad de la proteína (Estévez, 2011).

La oxidación de la mioglobina presenta una decoloración desagradable en la carne que afecta la aceptación de esta por parte del consumidor. Las oxidaciones en el chorizo, producen una disminución significativa de su valor nutritivo en términos de disponibilidad de aminoácidos esenciales y digestibilidad de las proteínas oxidadas, destrucción de vitaminas y pérdidas nutricionales (Armenteros *et. al*, 2012).

Problemas de salud tales como las enfermedades gastrointestinales, aterosclerosis y cáncer han sido adjudicados a la presencia de productos y subproductos derivados de la oxidación lipídica tales como los hidroperóxidos los cuales a su vez se descomponen en compuestos carboxílicos, furanos sustituidos, hidrocarburos y alcoholes (Terrasa, 2012). También es importante mencionar que la oxidación produce rancidez sensorial en los productos (en este caso en el chorizo) siendo una causa de rechazo para los consumidores (Armenteros *et. al*, 2012), razón por la cual desde sus inicios se han desarrollado varias estrategias para prevenir el deterioro oxidativo en éstos, principalmente empleando antioxidantes químicos. Una de las formas de evitar la oxidación, es limitando el acceso del oxígeno a los componentes de la carne, desarrollando nuevos métodos de almacenamiento como el envasado al vacío o el envasado en atmósferas modificadas (Pettersen *et. al*, 2004; Lund *et. al*, 2007).

La forma más común de controlar la oxidación lipídica es usando antioxidantes durante el proceso de producción de los alimentos. Según el Reglamento Técnico Centroamericano: Alimentos y Bebidas Procesadas, RTCA 67.04.54:10 (2012), se conoce como “antioxidante” a los aditivos alimentarios que prolongan la vida en almacén de los alimentos protegiéndolos del deterioro ocasionado por la oxidación, por ejemplo, la rancidez de la grasa y cambios de color. La función del antioxidante es reaccionar con el radical libre cediéndole un electrón al radical, de manera que el radical logra oxidarse y transformarse en un radical débil, es decir, con poca o nada capacidad de producir efectos tóxicos. Los mecanismos de acción que utilizan los antioxidantes son: el sistema de prevención donde se impide la formación de los radicales libres y/o especies reactivas, otros inhiben la acción de los radicales libres y los del sistema de reparación que favorecen la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas dañadas (Badui, 2006).

Para determinar el grado de oxidación lipídica existen diferentes métodos, los que determinan los productos de oxidación primarios y los que determinan los productos de oxidación secundarios. En este estudio, se evaluó únicamente el valor del número de ácido tiobarbitúrico el cual mide los productos de oxidación secundarios (Navarro *et. al*, 2004) por ser éste el más representativo para el presente estudio.

3.2.3 Prueba del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

De los subproductos generados en la oxidación lipídica se producen compuestos volátiles como el malonaldehído (figura 4) que proviene básicamente de la oxidación de aldehídos insaturados; el malonaldehído es además un compuesto prodesnaturalizante de las proteínas al iniciar el entrecruzamiento de dos grupos aminos (Navarro *et. al*, 2004).

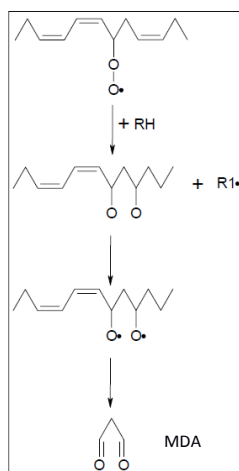


Figura 4. Formación de malonaldehído (MDA) producto de la oxidación de los aldehídos insaturados con radicales (RH y R1•) generados durante el proceso de oxidación. Fuente: Navarro *et. al* (2004).

La prueba de TBARS mide el aumento de los productos secundarios de oxidación y es una técnica simple que se basa en la reacción de una molécula de malonaldehído con dos moléculas del ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un complejo coloreado rosado: malonaldehído TBA como el de la figura 5, que puede ser cuantificado ya que presenta un máximo de absorción de 530-532 nm (Navarro *et. al*, 2004).

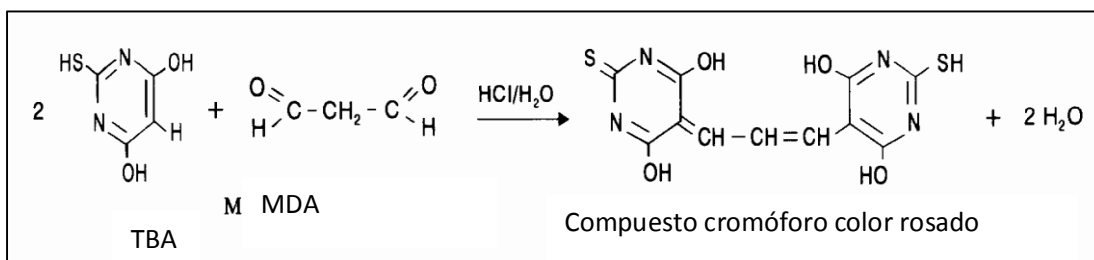


Figura 5. Formación del compuesto cromóforo color rosa cuantificable por espectrofotometría a partir de la reacción entre el malonaldehído y el reactivo de TBA en medio ácido. Fuente: Fernández *et. al* (1997).

La intensidad del color rosa aumenta durante el tiempo de almacenamiento, conforme va aumentando la cantidad de moléculas de malonaldehído, MDA, producto de la oxidación lipídica en la carne. Además, se ha comprobado que esta reacción no es específica porque algunas veces el TBA reacciona con otros compuestos, el color se forma por la presencia de muchos productos de oxidación secundarios que se van desarrollando en el periodo de almacenamiento y demás factores que influyen en el color como lo son temperatura, tiempo de calentamiento, pH, antioxidantes e iones metálicos (Fernández *et. al*, 1997).

Valores de TBARS menores a 1 mg de MDA / kg de carne son considerados por algunos autores que han realizado análisis sensoriales, como niveles aceptables de oxidación en productos de consumo humano (Banerjee *et al*; 2012). Esta técnica tiene el inconveniente de que es poco sensible a bajas concentraciones de MAD y que la presencia de otras sustancias reactivas al TBA como por ejemplo sacáridos y aldehídos interfieren en la reacción MDA-TBA; también el MDA puede reaccionar con las proteínas presentando menores niveles de oxidación, por tanto es recomendable hacer esta prueba a través del tiempo para extender el ámbito de reacción y poder determinar con mayor exactitud la reacción de oxidación (Romero *et. al*, 1997).

3.3 Variación del pH en el chorizo cocido

El grado de acidez o alcalinidad es una medición muy utilizada en la industria alimentaria ya que este es uno de los parámetros que ayuda a evaluar la inocuidad y calidad del alimento según corresponda a sus características, en un producto como éste el pH se encuentra entre los 5.5 y 6.5 a este rango de pH se favorece el color del producto y se modifica las funciones de las proteínas mejorando la ligazón y consistencia del chorizo, además disminuye la capacidad de retención de agua lo que inhibe el crecimiento de microorganismos (Jiménez y Carballo, 1989).

Una de las razones más comunes por las que el valor del pH en los productos cárnicos varía, es la presencia de las bacterias ácido lácticas (BAL) que la carne tiene en su propia flora bacteriana, éstas son capaces de sobrevivir al tratamiento térmico que se le aplica a los embutidos cocidos, las que sobreviven y se reponen a este tratamiento aumentan su

crecimiento durante el almacenamiento produciendo ácido láctico el cual acidifica el medio en el que están y disminuye el valor del pH (Amerling, 2001; Jiménez y Carballo, 1989).

3.4 Microbiología asociada al deterioro del chorizo cocido

Tanto las bacterias del género de *Pseudomonas* sp. como *Lactobacillus* sp. forman parte de las bacterias que están frecuentemente involucradas en el deterioro de los alimentos cárnicos refrigerados presentando mucosidad, agriado, pegajosidad, putrefacción y color verdoso (Frazier y Weshoff, 1993).

Este deterioro microbiológico se ve favorecido por la presencia de flora bacteriana que la aporta tanto la carne como los ingredientes naturales que se utilizan para elaborar el chorizo cocido (Amerling, 2001); un estudio realizado por Milbourne (1982) en jamones observó que a diferentes choques térmicos *Lactobacillus viridescens* soporta el tratamiento térmico, concluyendo que al parecer el jamón actúa como un agente protector al calor, por consiguiente se considera que la presencia de proteínas, las grasas y aceites que se encuentran en la matriz cárnica, ejercen un efecto protector sobre la capa externa de los microorganismos, que obstaculiza la penetración del calor húmedo aplicado en el tratamiento térmico a las células microbianas para destruirlas, si estas se encuentran dentro de alguna de las estructuras protectoras mencionadas, el calor no logra penetrar con facilidad, por la cual no se logra la esterilidad comercial de los productos cárnicos (Potter y Hotchkiss, 2007). Por lo tanto es de suma importancia utilizar el tratamiento térmico correcto con un adecuado control de la temperatura y el tiempo de aplicación.

3.4.1 *Lactobacillus* sp.

El género *Lactobacillus* (lactis: leche, bacillus: pequeños bacilos) se caracteriza porque la forma de sus células son bacilos largos y extendidos, aunque se pueden observar bacilos cortos o coco-bacilos. Estos se presentan comúnmente formando cadenas y en general son no mótils, pero cuando tienen motilidad es por la presencia de flagelación peritrica. Son Gram positivos para su buen desarrollo necesitan los carbohidratos, los cuales fermentan para dar lugar a ácido láctico, alcohol y dióxido de carbono (CO₂) como subproductos; son microaerofílicas (Barreiro y Sandoval, 2006).

Las colonias de *Lactobacillus* sp. en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos como las que se presentan en la figura 6. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza. Algunas cepas presentan ligera actividad proteolítica debido a proteasas y peptidasas ligadas a la pared celular o liberadas por ésta, así como una débil actividad lipolítica debido a la acción de lipasas intracelulares (Frazier y Westhoff, 1993).

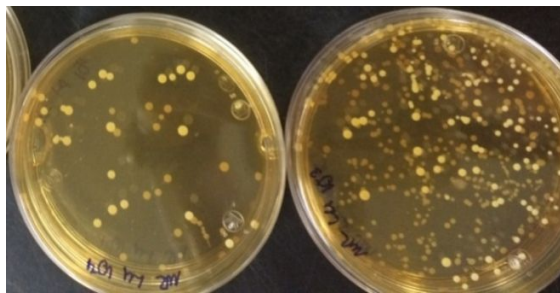


Figura 6. Cepas de *Lactobacillus* sp.

Crecen en medios de cultivo con exigencias nutricionales complejas tales como aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables; el medio de cultivo que cumple con estos requerimientos es el MRS que contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, con una suplementación de jugo de tomate, manganeso, acetato y ésteres del ácido oleico, especialmente Tween 80 (Samaniego y Sosa del Castillo, 2000).

El rango de pH para su crecimiento es de 4,5 – 6,4 con óptimo crecimiento entre 5,5 y 6,2, y se detiene a valores de pH de 3,6 a 4,0. Además en medios neutros o ligeramente alcalinos disminuye su crecimiento considerablemente; sin embargo los lactobacilos son capaces de reducir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico lo que a su vez permite evitar o disminuir el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores (Carrillo y Audisio, 2007).

Otras características importantes del *Lactobacillus* sp. son: con respecto a la temperatura de crecimiento la mayoría son mesófilos con un crecimiento óptima de 30 – 40 °C de

temperatura, algunos crecen por debajo de 15 °C y hay cepas que crecen por debajo de 5 °C (Carrillo y Audisio, 2007); además contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados y hasta sulfuro de hidrógeno (H₂S) y aminas (Frasier y Westhoff, 2000).

3.4.2 *Pseudomonas* sp.

Los microorganismos del género *Pseudomonas* son microorganismos móviles, debido a la presencia de uno o más flagelos polares, son bacilos oxidasa positivos no fermentadores y son psicotolerantes, característica importante que participa en el deterioro de los alimentos conservados en refrigeración como es el del chorizo cocido. Son aerobios, con el oxígeno como aceptor de electrones. Algunas bacterias de este grupo producen pigmentos fluorescentes de colores amarillo-verdosos como el que se puede apreciar en la figura 7, los cuales actúan como sideróforos: moléculas cuya función es capturar el hierro del medio necesario para el metabolismo del microorganismo (Díaz, 2011).

Presentan una gran capacidad para utilizar varios sustratos como fuente de energía debido a la presencia de un gran número de plásmidos que contienen operones inducibles para la síntesis de enzimas específicas las cuales permiten catabolizar los compuestos presentes en el medio, por tanto son capaces de colonizar casi cualquier superficie (Díaz, 2011).



Figura 7. Cepas de *Pseudomonas* sp.

La *Pseudomona* sp. produce catalasa y oxidasa, así como amoniaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono, crecen a temperaturas de 20-25 °C y es psicotolerante; se encuentran comúnmente en el suelo y en el agua y son poco resistentes al calor; producen malos olores y sabores en los alimentos cuando alcanzan poblaciones de 10⁷ UFC/g (Barreiro y Sandoval, 2006).

En el chorizo, el proceso de picado de la carne hace que los microorganismos presentes en la superficie como las *Pseudomonas* sp. se distribuyan por todo el producto, favoreciendo la alteración y la reducción de la vida útil del chorizo, razón por la que la presencia de este microorganismo es un buen indicador de las Buenas Prácticas de Manufactura en el proceso de producción (Carrillo y Audisio, 2007).

3.5 Antioxidantes y antimicrobianos naturales versus sintéticos

Añadir ingredientes sintéticos o naturales con capacidad antioxidante a los chorizos cocidos permite reducir los fenómenos de oxidación al eliminar los radicales libres y así detener la cadena de reacciones que inician los procesos oxidativos. (Gray *et. al*, 1996).

En la industria cárnica es muy común el uso de antioxidantes sintéticos como el butil-hidroxi-anisol o E-320 (BHA), butil-hidroxi-tolueno o E-321 (BHT), galato de propilo (PG) y la terbutil-hidroquinona (TBHQ) que según MEIC-MAG (2009) corresponden a 100 mg/kg referido al contenido de grasa en uso individual y hasta un máximo de 200 mg/kg en mezclas, en productos frescos y 30 mg/kg en productos deshidratados. Estas cantidades permitidas están reguladas porque su uso está cuestionado por el efecto tóxico que evidencian estudios médicos, ya que niveles altos de BHT, BHA y TBHQ pueden actuar como agentes generadores del cáncer o ser teratógenos (Armenteros *et. al*, 2012).

El empleo de antioxidantes de origen natural en forma de compuestos puros, extractos y/o aceites esenciales se ha extendido en la industria cárnica durante los últimos años debido principalmente al mal uso que se ha hecho de los aditivos químicos que por exceso de éstos, producen un efecto tóxico que afecta la salud del consumidor. Dentro de estas sustancias de origen natural capaces de reducir los fenómenos oxidativos de lípidos y proteínas podemos incluir especias, frutas, extractos vegetales y productos derivados de semillas oleaginosas, entre otros (Sánchez-Escalante *et. al*, 2003).

3.6 Propiedades y usos de las especias

El uso de las especias en los alimentos se ha dado a través de los años para mejorar la aromaticidad y sabor de estos, algunos se obtienen de las hojas, otros de las flores, raíces, frutos, semillas, tallos, entre otros; y se pueden añadir en forma natural, molida, seca o en extracto (Sujah, 2006).

Su uso como sustancias que presentan propiedades medicinales, antisépticas, antimicrobianas, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas ha sido y se continúa evaluando, producto del nuevo auge por lo natural, que está reclamando actualmente el consumidor; dichas propiedades presentes en las especias se debe a la presencia de componentes químicos principalmente de los compuestos fenólicos (Badui, 2006).

3.6.1 Culantro de coyote (*Eryngium foetidum*)

Se ubica dentro de las hierbas aromáticas de fácil cultivo y se usa para condimentar los alimentos, se le conoce con el nombre de "perejil chino", pertenece a la misma familia del comino, eneldo, del hinojo y del perejil (figura 8). Se utiliza en la preparación de algunos embutidos, da sabor a las verduras, a las carnes y a los pescados, las hojas son dulces con un leve sabor a limón (Almeida, 2011).

La especie es originaria de América tropical continental y las Indias Occidentales y ahora se cultiva en regiones tropicales de Asia y África. El culantro se utiliza en platos de todo el Caribe, América Latina y Asia, particularmente en India, Corea y Singapur, pero es relativamente desconocido en los países occidentales, incluyendo la mayor parte de Norte América (Small, 2011).

En Costa Rica la mayor producción a nivel industrial se da en la zona de Turrialba en la provincia de Cartago y en Siquirres de la provincia de Limón, siendo un producto de exportación principalmente para los mercados latinos de Estados Unidos (Durán, 2009); según datos obtenidos del MAG (2011) Costa Rica es el mayor exportador de culantro de coyote del mundo.



Figura 8. Culantro de coyote (*Eryngium foetidum*).

Esta especie fue usada para aumentar el tiempo de preservación de carnes, además se han detectado numerosos compuestos aromáticos en las diferentes especies de *Eryngium* entre ellos: 2,4,5-trimetilbenzaldehído y 5-decanona (Takemasa e Hirasa, 1998). También en el artículo escrito por Paul *et. al* (2011) se describen una lista de sustancias químicas que se encuentran dispersas en todas las partes que conforman la planta de culantro de coyote como lo son: triterpenos, terpenos, carbonilos, saponinas y alcoholes.

Efectos antimicrobianos son reportados: Homer y colaboradores (2009) realizaron un estudio *in vitro* para determinar la eficacia antibacteriana de una suspensión al 10% p / v de las hojas naturales del culantro (*Eryngium foetidum*) para el control en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium* donde se evidenció la aparente sensibilidad de las bacterias gram-positivas y la resistencia de las bacterias gram-negativas. Además se evidenció una actividad antibacteriana significativa contra *S. aureus* y *B. subtilis*, pero no contra *E. coli* y *S. typhimurium*. con 100% de mortalidad tanto para *S. aureus* como para *B. subtilis*. Los resultados obtenidos a partir de esta investigación sugieren que las hojas de culantro pueden usarse potencialmente como conservantes alimentarios, aumentando la vida útil de los productos alimenticios.

La capacidad antioxidante alta que se presentó en el análisis que Jaramillo y colaboradores (2011) realizaron cuando evaluaron el efecto del aceite esencial del culantro utilizando el ensayo de la decoloración del radical DPPH (2,2-difenil-1-picril hidracilo) donde el aceite esencial de las hojas de *E. foetidum* presentó un alto porcentaje

de aldehídos alifáticos (E-2-dodecenal, 5-dodeceno, tetradecanal, tetradecenal) y aromáticos (2,4,6-trimetilbenzaldehído, 3,4,5-trimetilfenol) hace que esta especia sea una fuente importante de antioxidantes naturales por evaluar.

3.6.2 Jengibre (*Zingiber officinale*)

El jengibre es una planta rizomatosa, con hojas linear-lanceoladas de hasta más de 20 cm de longitud, largos pedúnculos florales con densas inflorescencias y flores individualmente rodeadas de brácteas, el rizoma exhibe fractura corta y amilácea (figura 9) y su olor es particularmente aromático con sabor picante y especiado, es una planta tropical que se cultiva en la mayoría de los países tropicales (Cañigüeral, 2003).

El jengibre se cultiva en la zona norte de Costa Rica iniciándose en el 2004 con pequeñas áreas de siembra en la Región Brunca y es en el 2006 donde empieza el aumento de su cultivo en el cantón de Pérez Zeledón de San José y en Buenos Aires de Puntarenas (Morales, 2007).

El jengibre contiene un 4,0 a 7,5 % de oleorresina la cual está compuesta del aceite esencial cuya composición química varía según la especie de jengibre que se esté usando. Los principales componentes del aceite son sesquiterpenos, como α -zingibereno, α -curcumeno, β -bisaboleno, β -bisabolona, (EE)- α -farneseno y β -sesquifelandreno y monoterpenos como alcanfor, β -felendreno, geranial, neral y linalol y de las sustancias picantes que contienen como agentes químicos los gingeroles y los sogaoles. Se trata de fenilalcanonas o fenilalcanonoles no volátiles con cadenas de diferentes longitudes, siendo los más importantes el [6]-gingerol y el [6]-sogaol; todos estos compuestos son antioxidantes y antimicrobianos (Takemasa y Hirasa, 1998).



Figura 9. Jengibre (*Zingiber officinale*).

El uso del jengibre como especia en los productos cárnicos se basa tanto en sus características sensoriales que le confieren un especial sabor y aroma a las carnes, como en su capacidad antioxidante que proviene de las sustancias químicas shogool, gingerol y el zingibereno y en sus capacidades antimicrobianas donde los compuestos químicos responsables son la gingerona y el gingerol (Takemasa y Hirasa, 1998).

La capacidad antioxidante de esta especia (tanto como aceite esencial y como especie en polvo), se evaluó en un estudio realizado por Hassan y colaboradores (2010) donde utilizando los métodos de actividad de barrido de 1, 1-difenil-2-picrylhidrazil (DPPH) y poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) se demostró su potencial como antioxidante en ambas presentaciones.

Además de su capacidad antioxidante también hay estudios que demostraron capacidad antimicrobiana del jengibre, tal es el caso de Vásquez y colaboradores (2001) los cuales en un estudio orientado a la determinación del método más adecuado para la obtención del aceite esencial de jengibre, identificaron los componentes zingibereno y α -curcumeno y al realizar una prueba de prueba de sensibilidad biológica encontraron que hay efecto antimicrobiano ante el *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *S. faecalis*.

3.6.3 Orégano (*Origanum vulgare* L.)

El orégano, es uno de los condimentos fundamentales de la cocina italiana y de todos los países mediterráneos, cada país lo usa de manera diferente, es consumido en todo tipo de platos: salsas de tomate, pastas, salsas en general, pizzas, pescados, carnes, pollo, verduras, cordero, estofados, aceites aromatizados, marinadas, se usa seco y se puede usar desde el principio de la cocción teniendo muy buena aceptación cuando se combina con perejil, romero, tomillo, ajedrea, salvia (Almeida, 2011). El orégano (figura 10) es originario de la región mediterránea, en particular Grecia, Italia y España; se cultiva en Albania, Francia, México, Turquía, Yugoslavia y la región del Mediterráneo; es parte de la familia de la menta, el color de la hoja es verde grisáceo y el de la flor es púrpura. El timol y carvacrol son los ingredientes aromatizantes principales de esta especia (Young *et. al*, 2001).



Figura 10. Orégano (*Origanum vulgare L.*)

Se ha encontrado por medio de investigaciones que hay en el mundo al menos 61 especies de 17 géneros pertenecientes a seis familias bajo el nombre de orégano. La familia Lamiaceae se considera el grupo más importante que contiene el género *Origanum* que aporta las especies de orégano conocidas; también se encuentran dos géneros de la familia *Verbenaceae* utilizados para la producción de hierbas orégano; las otras familias (*Rubiaceae*, *Scrophulariaceae*, *Apiaceae* y *Asreraceae*) no son consideradas tan importantes (Bandoni, 2009).

Otros estudios han demostrado la eficacia del carvacrol y timol del orégano contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y también es eficaz contra *Vibrio parahaemolyticus* cuando está presente en el medio de crecimiento en forma de polvo en concentraciones de 0,5 %; además se reportó el efecto antimicrobiano de varias especies contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y se confirmaron actividades antimicrobianas para la canela, la mejorana, el orégano y el tomillo, donde el orégano presentó una amplia actividad antimicrobiana tanto contra bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. (Takemasa y Hirasa, 1998).

Cabe mencionar que el orégano no sólo posee compuestos antimicrobianos, esta especie presenta varios compuestos activos con fuerte efecto antioxidante como son el fenólico glucósido (4-fenil-D-glucopiranósido) característico por ser soluble en agua, ácido caféico, ácido protocatequínico, ácido rosmarínico y ácido 2-caffeoyloxy-3-fenilpropiónico, estos compuestos son antioxidantes más efectivos que el tocoferol, 4-fenil-D-Glucopiranósido y 2-caffeoyloxy-3-fenilpropiónico que poseen actividades antioxidantes comparables al BHA (Raghavan, 2000).

Por ejemplo en Bozin y colaboradores (2006) mediante la metodología de actividad de barrido de 1, 1-difenil-2-picrylhrazil (DPPH) obtuvo que el aceite esencial de orégano presentó efecto antioxidante y por medio de análisis microbiológico determinó la capacidad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Actualmente las partes de plantas de orégano y extractos bioquímicos de esta son utilizados comúnmente en la industria alimentaria como especia siendo considerada una de las más importantes a nivel mundial. Con los avances científicos, su popularidad aumenta por su facilidad de cultivo, uso e industrialización. (Almeida, 2011). Sin embargo, el uso de orégano como un aditivo alimentario se ve limitado por su intenso aroma y sabor que podría provocar que sensorialmente algunos productos se consideren inaceptables por los consumidores (Muriel-Galet *et. al*, 2015).

IV. MATERIALES Y EQUIPOS

4.1 Localización del trabajo

El proyecto se desarrolló en la Planta Piloto de la Universidad del Costa Rica para la elaboración de los chorizos y secado de especias; en el Laboratorio de Microbiología del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) para el análisis microbiológico; en el Laboratorio de Química y en el Laboratorio de Análisis Sensorial de la Escuela de Tecnología de Alimentos para el análisis químico y para la prueba de aceptación del consumidor respectivamente; entidades pertenecientes a la Universidad de Costa Rica, Sede Rodrigo Facio, Montes de Oca, San José.

4.2 Materiales

Cuadro I. Materiales y equipo utilizados para el desarrollo del proyecto.

Elaboración del chorizo (en Planta Piloto)	
Materiales	Equipo
Recortes de res, cerdo y tocino, soya texturizada hidratada, almidón de papa, concentrado de soya, sal común, sal de cura, tripolifosfato, eritorbato y humo líquido, fundas para chorizo NDC32, TBHQ, lactato, diacetato y sorbato; culantro de coyote, orégano y jengibre	Molino Kramer con cedazo de 8 y 5 mm, refrigerador, embutidora manual, cocina, termómetro, cronómetro, molino de martillos con malla de 0,060, cortador de cuchillas Hobart, secador con aire caliente, tipo cabina y de la casa comercial National®
Análisis microbiológico (en Laboratorio de Microbiología)	
Bolsas para vacío, McFarland, cepas de bacterias <i>Lactobacillus</i> sp. ATCC 393 <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC 27853, caldo APE, agar MRS y F, material para tinción Gram	Máquina para vacío, asas microbiológicas, cuchillos, tablas y cucharas estériles, refrigeradora, incubadoras a 35 °C, stomacher, bolsas para stomacher, vortex, tubos de ensayo, placas, botellas para contener, jarras con candela, autoclave, lámpara ultravioleta, microscopio, contador de colonias Quebec
Análisis químico (en Laboratorio de Química)	
Ácido clorhídrico 4M, antiespumante, reactivo TBA (0,2883 g/100 mL de ácido acético glacial al 90%)	Balanza analítica y granataria, pipeta de 5mL y 1mL, procesador de alimentos Oster, balón de destilación, perlas de vidrio, plantilla eléctrica, tubo de ensayo con tapón, cronómetro, termómetro, centrifuga, espectrofotómetro, pHmetro
Análisis sensorial (en Laboratorio de Sensorial)	
Muestras del chorizo	Cocina, computadora

4.3 Procesamiento de jengibre, culantro de coyote y orégano

Se procesaron tres lotes de cada una de las especias, provenientes de tres proveedores diferentes y se mezclaron las especias frescas para obtener una muestra homogénea; las cuales se secaron según la metodología definida por Zapata (2015) y Acón (2016). Las especias no se esterilizaron para mantener las condiciones de un proceso industrial; se almacenaron al vacío y se guardaron en refrigeración a 4 °C durante 3 semanas máximo, para su adición al chorizo.

Elaboración de culantro de coyote en polvo: El producto se seleccionó, se lavó y se desinfectó con una disolución de cloro 100 ppm por 5 minutos y se eliminó el exceso de agua en una canasta escurridora. Posterior a esto, se secó en el secador de cabina de la Planta Piloto del CITA en condiciones de temperatura de 75 °C y velocidad de aire de 1 m/s. Esto hasta alcanzar humedad final del producto de 10%. Una vez que se secó el producto, se procedió a una molienda en un molino de martillos con malla de 0,060 milésimas de pulgadas (Zapata, 2015).

Elaboración de jengibre en polvo: El producto se seleccionó, se lavó en una olla de acero inoxidable y mediante flujo continuo de agua se retiró la tierra adherida con la ayuda de un cepillo, se desinfectó con una disolución de cloro 100 ppm por 5 minutos y se escurrió en una canasta escurridora. Posteriormente, se formaron hojuelas con un espesor de 3 mm de tamaño empleando un cortador de cuchillas Hobart. El proceso de secado se inició a 75 °C durante los primeros 90 minutos y se terminó a 55 °C hasta alcanzar un equilibrio de humedad de 12%. Una vez que se secó el producto, se procedió a una molienda en un molino de martillos con malla de 0,060 milésimas de pulgadas (Zapata, 2015).

Elaboración de orégano en polvo: Las hojas de orégano frescas se limpiaron y se lavaron bien bajo el chorro del grifo de agua, se desinfectaron con una disolución de cloro 100 ppm por 5 minutos y se escurrieron en una canasta escurridora. Las hojas se secaron en un secador de cabina a 50 °C durante 8 h hasta alcanzar una humedad del 10%. Las hojas secas se molieron en un molinillo de especias para obtener partículas finas de polvo (Acón, 2016).

4.3.1 Elaboración del chorizo cocido con diferentes combinaciones de culantro de coyote (*Eryngium foetidum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y orégano (*Origanum vulgare L.*).

Formulaciones

Las formulaciones que se utilizaron en el estudio se presentan en el Cuadro II. Con respecto a las especias, se usaron las concentraciones que fueron evaluadas en el estudio antimicrobiano *in vitro* y en la evaluación de la oxidación lipídica en un modelo cárnico por Zapata (2015) y Acón (2016) por ser este proyecto una aplicación a los resultados obtenidos en el estudio de ambos autores, sin embargo se usó al 1% el orégano porque en una prueba sensorial preliminar el 2% de orégano tiene un sabor muy fuerte mientras que el 1% si es tolerado por el consumidor y porque en la literatura como por ejemplo los autores Takemasa y Hirasa (1998) reportan capacidad antimicrobiana y antioxidante del orégano en polvo al 1%. Se usó culantro de coyote y jengibre juntos porque Zapata (2015) reportó capacidad antimicrobiana del culantro de coyote y capacidad antioxidante del jengibre, sólo orégano porque esta especia presenta ambos efectos y los tres juntos para observar cómo se comportaban en conjunto para evaluar el efecto antioxidante y antimicrobiano en el chorizo cocido.

Cuadro II. Formulaciones de chorizo para el desarrollo de los diferentes tratamientos por evaluar.

Ingredientes	Control Negativo	Control positivo	T1	T2	T3
	%	%	%	%	%
Recorte de res 15% grasa	20	20	20	20	20
Recorte de cerdo 30% grasa	30	30	30	30	30
Tocino	30	30	30	30	30
Soya texturizada hidratada *	7	7	7	7	7
Concentrado de soya	1	1	1	1	1
Almidón de papa	2	2	2	2	2
Agua	10	10	10	10	10
Sobre la base anterior					
Sal	1	1	1	1	1
Sal de cura 6,5%	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Fosfato para embutidos	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
TBHQ		0,2			
Lactato-diacetato de sodio		2,5			
Sorbato de potasio		0,3			
Culantro de coyote			0,5		0,5
Jengibre			0,5		0,5
Orégano				1	1

*Relación soya texturizada: agua 1:3
Fuente: Mora, 2015

Descripción del proceso de elaboración

En la figura 11 se observa el diagrama de flujo para la elaboración de las muestras de los diferentes tratamientos de chorizo y posteriormente la descripción de cada paso del proceso

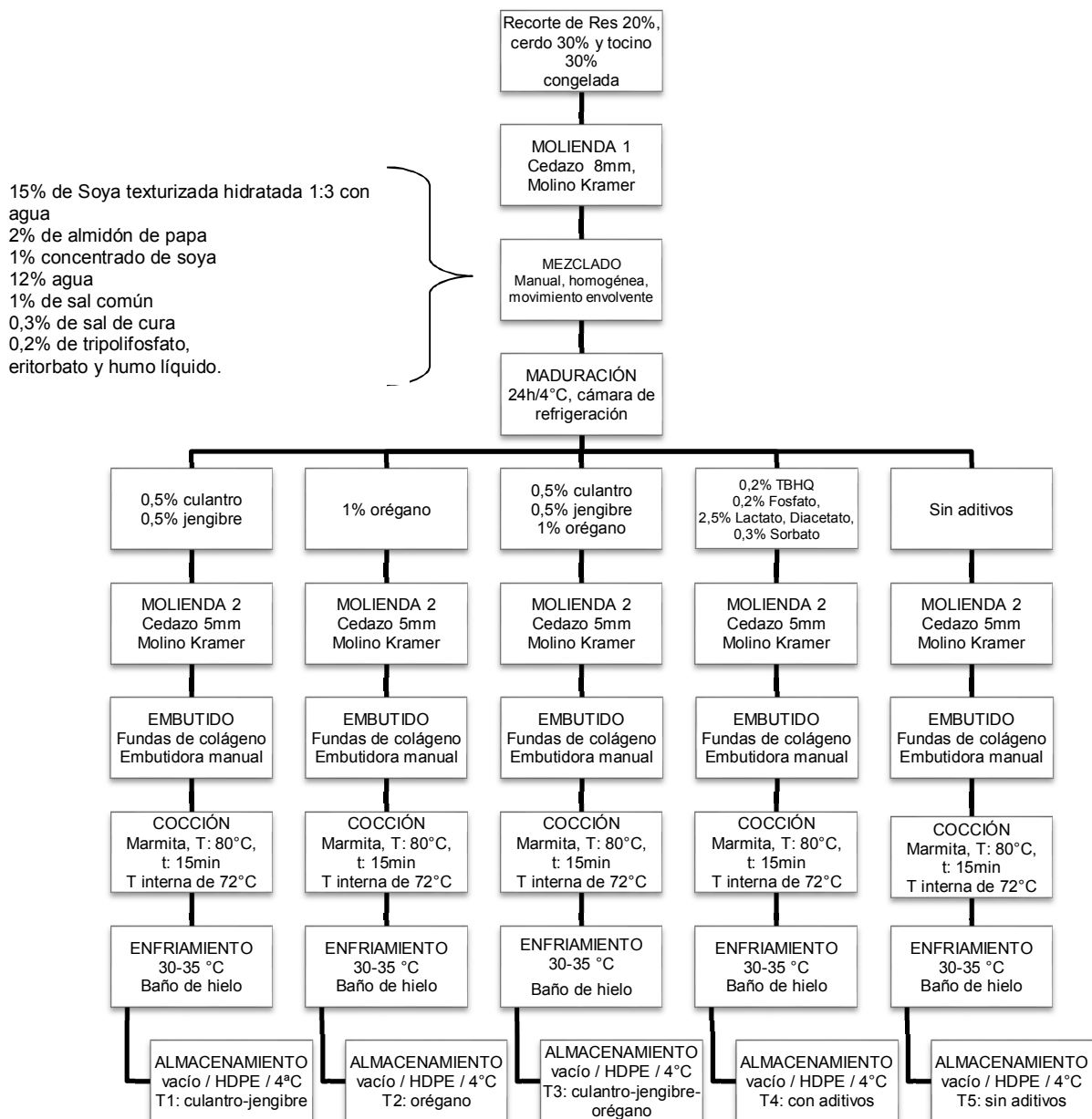


Figura 11. Diagrama de flujo para la elaboración de las muestras de los diferentes tratamientos de colágeno de chorizo. (Mora, 2015)

Pesado: se pesó cada uno de los ingredientes de la formulación.

Molienda 1: se llevó a cabo en el molino Kramer, la carne se pasó a través del dado o cedazo de 8 mm de diámetro. La carne se encontraba congelada. Este método garantizó que las funciones del picado se efectuaran de mejor manera, pues facilitó el trabajo de mezclado (A.A.P.P.A., 2004).

Mezclado: a la carne molida, se le adicionó 15% de soya texturizada hidratada en una relación 1:3 con el agua, 2% de almidón de papa, 1% concentrado de soya, 12% agua, 1% de sal común, 0,3% de sal de cura, 0,2% de tripolifosfato, eritorbato y humo líquido. Luego se mezclaron de manera manual para integrar los ingredientes entre sí hasta obtener una masa homogénea y se amasó de forma tal que se expulsó el aire que pudo quedar ocluido, eliminando así los defectos por espacios vacíos en el producto final (Amerling, 2001). Una vez que se agregaron los ingredientes, se separó la mezcla en cinco partes y se añadieron a cada parte las especias que caracterizaron cada tratamiento de la evaluación (ver figura 11).

Reposo: se mantuvo la mezcla por 24 horas en la cámara de refrigeración, debidamente rotulada y protegida del ambiente externo, para mejorar las características sensoriales del chorizo.

Molienda 2: se llevó a cabo en el molino Kramer, la carne se pasó a través del dado o cedazo de 5 mm de diámetro para disminuir aún más su tamaño de partícula. La carne debió mantenerse en refrigeración para garantizar que las funciones del picado fueran óptimas (A.A.P.P.A., 2004). En esta fase del proceso se separaron las muestras necesarias para realizar posteriormente los ensayos microbiológicos (ver sección 4.2)

Embutido: Se embutieron los chorizos de tamaño de 10 cm, similar a los que se encuentran en el comercio, cada uno de cada tratamiento, en una funda especial para chorizo cocido (comestible, de colágeno, resistente al agua y temperatura) marca Naturin NDC-D (n° de artículo 642) calibre 32, comprado a la empresa Viscofan ubicada en Heredia, utilizando la embutidora manual de la Planta Piloto.

Cocción: Se realizó en marmita a 80 °C por 15 min, asegurándose de alcanzar una temperatura interna de 72 °C según la especificación de RTCR: 411-2008.

Enfriamiento: el chorizo se colocó en un baño de hielo con el fin de disminuir su temperatura hasta 30 °C ó 35 °C. Esta reducción de temperatura rápida tenía el objetivo de detener la cocción, con el fin de evitar sobre-cocción del embutido.

Almacenamiento: el chorizo embutido y empacado al vacío, se colocó en la cámara de muestras de la Planta Piloto del CITA a 4 °C, rotulado correctamente.

4.4 Efecto antimicrobiano del culantro de coyote (*Eryngium foetidum*), orégano (*Origanum vulgare L.*), jengibre (*Zingiber officinale*) y sus mezclas sobre el crecimiento de *Lactobacillus sp.* y *Pseudomonas sp.* en comparación con los aditivos químicos con función antimicrobiana en el almacenamiento del chorizo cocido

Se utilizó un diseño irrestricto aleatorio con un arreglo factorial de dos factores, el factor tipo de chorizo a 5 niveles (T1: culantro 0,5% y jengibre 0,5%, T2: orégano 1,0%, T3: culantro 0,5%, jengibre 0,5% y orégano 1,0%, T4: con aditivos químicos y T5: sin aditivos químicos) y el tiempo como factor continuo por un período de 40 días y 5 muestras, Como variable respuesta se realizó el recuento de *Lactobacillus sp.* y *Pseudomonas sp.* Se hicieron 3 repeticiones independientes del experimento. El Cuadro III muestra el tratamiento experimental que se llevó a cabo para determinar el efecto que tienen las especias utilizadas sobre el crecimiento de *Lactobacillus sp.* y *Pseudomonas sp.*

Cuadro III. Tratamientos que evaluaron el efecto de cada bacteria según la muestra y tiempo de almacenamiento (n = 3).

Muestras de chorizo	Variable respuesta recuento de	Tiempo de almacenamiento (días) para cada uno				
		0	15	22	29	36
T1: culantro 0,5% y jengibre	<i>Pseudomonas sp.</i>	0	15	22	29	36
	<i>Lactobacillus sp.</i>					
T2: orégano 1,0%	<i>Pseudomonas sp.</i>	0	15	22	29	36
	<i>Lactobacillus sp.</i>					
T3: culantro 0,5%, jengibre 0,5% y orégano 1,0%	<i>Pseudomonas sp.</i>	0	15	22	29	36
	<i>Lactobacillus sp.</i>					
T4: con aditivos químicos	<i>Pseudomonas sp.</i>	0	15	22	29	36
	<i>Lactobacillus sp.</i>					
T5: sin aditivos químicos	<i>Pseudomonas sp.</i>	0	15	22	29	36
	<i>Lactobacillus sp.</i>					

4.4.1 Análisis de datos

Para el análisis de resultados se realizó un análisis de regresión de los efectos simples y de la interacción, cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó una prueba de comparación de medias Tukey, con una α igual a 0.05. Si el tiempo dio diferencia significativa se aplicó una regresión lineal. Cuando no hubo efecto significativo, se reportó la potencia de la prueba ($1 - \beta$).

4.4.2 Procedimiento experimental:

Preparación del inóculo

Los cultivos de las bacterias utilizadas fueron: *Lactobacillus* sp. ATCC 393 y *Pseudomonas* sp. ATCC 27853, provistas por el CITA. Se elaboró una solución con cada microorganismo indicador siguiendo el método descrito por Pouch (2001) con una solución salina al 0,85% en su fase estacionaria (18 horas de incubación aproximadamente) y colocando cada uno de ellos en dicha solución debidamente rotulados, hasta que se obtuvo una concentración igual al estándar McFarland 1,0 (10^8 UFC/mL). Posteriormente se realizaron diluciones decimales hasta la concentración de 10^5 UFC/mL para *Pseudomonas* sp. y de 10^6 UFC/mL para *Lactobacillus* sp.

Inoculación con Lactobacillus sp.

Se inoculó cada tratamiento evaluado que se presenta en el cuadro III. Se colocó 25 mL del inóculo sobre la superficie de 125 ± 1 g de las muestras de cada tratamiento (antes de ser embutido), según lo propuesto por Pouch (2001) para alcanzar una concentración inicial de 10^5 UFC/g; una vez hecho la inoculación se embutió cada uno de los tratamientos utilizando una embudadora manual fabricada en el taller del CITA (figura 12) y se segmentaron en chorizos de 25 ± 1 g cada uno para posteriormente realizarles el tratamiento térmico descrito en la sección 4.3.1.

Inoculación con Pseudomonas sp.

El cuadro III presenta cada tratamiento que fue evaluado. Primero se embutieron trozos de 25 ± 1 g de chorizo de cada tratamiento utilizando la embudadora manual hecha en el taller del CITA de la figura 12, posteriormente se les realizó el tratamiento térmico y luego

sobre un área de 3x2 cm² (área usada sólo con el fin de estandarizar el método) se inoculó por el método de microgoteo cada una de las muestras de los distintos tratamientos con 0,75 mL de *Pseudomonas* sp. a una concentración de 10⁵ UFC/mL para alcanzar una concentración inicial de 10³ UFC/g.

Ambas muestras inoculadas con *Lactobacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. se empacaron (de manera similar a los chorizos cocidos del mercado) al vacío y se almacenaron en la cámara de muestras a 4 °C del laboratorio de microbiología del CITA por el tiempo de almacenamiento seleccionado para la investigación para simular las condiciones de manejo tradicional en el país de este producto.



Figura 12. Embutidora manual elaborada en el taller del CITA

Análisis microbiológico

El análisis microbiológico de ambos microorganismos consistió en pesar, en condiciones asépticas, 25 ± 1 g de la muestra de cada tratamiento correspondiente a cada tiempo de almacenamiento, utilizando una cuchara estéril, se colocó asépticamente en una bolsa de stomacher y se agregó 225 mL de agua peptonada 0,1%, luego se homogeneizó en un Stomacher durante 2 minutos (Pouch, 2001).

Tanto para *Lactobacillus* sp. como para *Pseudomonas* sp. se transfirió 1 mL de la disolución 1:10 a 9 mL de agua peptonada 0,1% en un tubo de ensayo, con una micropipeta estéril; se agitó 25 veces, por un tiempo de 7s en el Vortex; se repitió este

proceso diluyendo la muestra hasta 10^{-6} UFC/mL transfiriendo 1 mL de la disolución anterior a 9 mL de agua peptonada 0,1% (Pouch, 2001).

Para *Lactobacillus* sp. las placas fueron inoculadas usando una pipeta estéril de 1 mL depositando 0,2 mL de la disolución 10^{-1} en cada una de las superficies de 5 placas de Petri conteniendo de 12 a 15 mL de agar MRS(denominación de las siglas...) solidificado; para las siguientes diluciones se depositaron 0,1 mL en las superficies de las placas de Petri por duplicado (2 placas para cada dilución usada) y se esparció inmediatamente el inóculo por toda la superficie del agar con una asa de Drigalsky estéril, una vez que el inóculo se secó las placas inoculadas se introdujeron en forma invertida en una jarra anaeróbica con candela las cuales se colocaron en la cámara de incubación por 72 ± 3 h a 35 ± 1 °C (Pouch, 2001).

Para *Pseudomonas* sp. las placas fueron inoculadas colocando 1 mL de la disolución 10^{-1} repartido en la superficie de 3 placas Petri con 12 a 15 mL de Agar F solidificado; para las siguientes disoluciones se depositaron 0,1 mL en las superficies de las placas de Petri por duplicado (2 placas para cada dilución usada) y se esparció inmediatamente el inóculo por toda la superficie del agar con una asa de Drigalski estéril, una vez que el inóculo se secó las placas inoculadas se introdujeron en forma invertida en la cámara de incubación por (48 ± 3) h a (35 ± 1) °C (Da Silva *et. al*, 2013).

Para el conteo de las colonias típicas de cada microorganismo se usaron las técnicas de plateo descritas en el Handbook of Microbiological Media (Atlas, 2010).

Después de cumplido el tiempo de incubación de cada microorganismo, se observó si hubo crecimiento de colonias. *Lactobacillus* sp. se contó bajo luz natural. *Pseudomonas* sp. se contó bajo luz ultravioleta para distinguir las colonias con fluorescencia típica de *Pseudomonas* sp. y de esta forma no considerar en el conteo final aquellas colonias que crecieron pero que no presentaban el fenómeno de fluorescencia. Se realizaron tinciones de Gram como pruebas confirmatorias de la presencia de ambos microorganismos. Se utilizó un contador de colonias Quebec para hacer el conteo de colonias, se calculó el número de microorganismos por gramo de muestra (Solís *et. al*, 2009) y se reportaron los resultados.

4.5 Evaluación del pH y de la oxidación lipídica por medio del análisis de ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante el almacenamiento del chorizo cocido con especias.

4.5.2. Procedimiento experimental:

Análisis TBARS

Se realizó tomando 10 g de cada tratamiento de chorizo, macerada en un procesador de alimentos Oster durante 1 minuto y se colocó en un balón de destilación de 250 mL. Luego se adicionaron 80 mL de agua destilada, la cantidad necesaria (gota a gota) de ácido clorhídrico 4 M para alcanzar el pH de 1,5, seguido por una preparación antiespumante y algunas perlas de vidrio. El balón se calentó con una plantilla eléctrica para recolectar 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 ensayo con tapón y se agregaron 5 mL de reactivo TBA (0,2883 g/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 en forma similar un blanco con 5 mL de agua y 5 mL de reactivo. Los tubos posteriormente se enfriaron en agua durante 10 minutos y se determinó su Absorbancia (D) corrigiendo con el blanco a 538 nm en una celda de 1 cm (Kirk *et al*; 2009; Jung *et al*; 2012). El número de TBA se calculó de la siguiente forma: N° TBA (como mg de aldehído malónico por kg de muestra) = 7,8D.

Análisis de pH

Para determinar el pH de las muestras, se utilizó un pHmetro (Metrohm, 827 pH Lab) calibrado en pH=4 y pH=7. Se homogenizaron 10 g de muestra macerada de cada tratamiento con 20 mL de agua destilada durante 1 minuto y se realizó la medición por duplicado, a una temperatura promedio de 20 °C (AOAC, 2012; Rubio *et. al*, 2007).

Se realizaron tres repeticiones independientes del experimento, cada una con diseño irrestricto al azar con un arreglo factorial 5 x 5 como se muestra en el cuadro IV; el factor tipo de muestra a 5 niveles: T1: culantro 0,5% y jengibre 0,5%, T2: orégano 1,0%, T3: culantro 0,5%, jengibre 0,5% y orégano 1,0%, T4: con aditivos químicos y T5: sin aditivos químicos que correspondió a las diferentes formulaciones con las especias y el factor nominal tiempo de almacenamiento con 5 niveles: 0, 15, 22, 29 y 36 días.

Las muestras de chorizo se almacenaron en refrigeración a 4 °C en la cámara de producto terminado de la Planta Piloto del CITA, para evaluar la respuesta del TBARS a las especias agregadas en comparación con el control positivo y negativo. En el cuadro IV se presentan los tratamientos planteados sin adición de antioxidante para poder evaluar el efecto de las especias sobre el TBARS y pH durante el tiempo de almacenamiento.

Cuadro IV. Tratamientos para evaluar el efecto de las especias en el análisis de TBARS y del pH durante el tiempo de almacenamiento (n = 3).

Muestras de chorizo	Variables respuesta	Tiempo de almacenamiento para cada uno (días)				
		0	15	22	29	36
T1: culantro 0,5% y jengibre 0,5%	TBARS y pH	0	15	22	29	36
T2: orégano 1,0%	TBARS y pH	0	15	22	29	36
T3: culantro 0,5%, jengibre 0,5% y orégano 1,0%	TBARS y pH	0	15	22	29	36
T4: con aditivos químicos	TBARS y pH	0	15	22	29	36
T5: sin aditivos químicos	TBARS y pH	0	15	22	29	36

4.5.1 Análisis de datos:

Para el análisis de resultados se realizó un ANDEVA de los efectos simples y de la interacción, cuando se encontraron diferencias significativas, con una $\alpha = 0.05$, para identificar las diferencias se aplicó una prueba de comparación de medias Tukey y cuando no hubo efectos significativos se reportó la potencia de la prueba ($1 - \beta$).

4.6 Determinación del agrado de chorizos cocidos elaborados con una combinación del culantro de coyote (*Eryngium foetidum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y orégano (*Origanum vulgare L.*)

Se realizó este objetivo con el fin de evaluar la aceptación del consumidor con las combinaciones utilizadas en la formulación de los diferentes tratamientos, para valorar el desarrollo de un chorizo cocido con especias a nivel industrial, las formulaciones fueron evaluadas sensorialmente y comparadas con respecto a un chorizo comercialmente disponible que presentara de manera similar las características de los chorizos

elaborados; se valoró la variable respuesta para determinar el agrado de chorizos de los tratamientos T1: culantro 0,5% y jengibre 0,5%, T2: orégano 1,0%, T3: culantro 0,5%, jengibre 0,5% y orégano 1,0% y M: Chorizo mercado.

Arreglo experimental y análisis de datos

Se utilizó un arreglo unifactorial de cuatro niveles (T1: culantro 0,5% y jengibre 0,5%, T2: orégano 1,0%, T3: culantro 0,5%, jengibre 0,5% y orégano 1,0%, M: muestra del mercado). A los datos se les aplicó un análisis de conglomerados. Para cada grupo se aplicó un ANDEVA para determinar si existe diferencia entre las muestras, en caso de encontrar las diferencias se aplicó la prueba de comparación de medias LSD con el programa JMP8.

Prueba agrado general

Se rebanaron aproximadamente 30 g de cada uno de los tres tratamientos evaluados y de la muestra del mercado, se cocinó sobre una plancha caliente a aproximadamente 90 °C en la superficie del chorizo por 2 minutos y se sirvió sobre tortilla pequeñas calientes para asemejar la forma común de ser consumido este producto por los participantes. Se sirvieron las cuatro muestras de forma aleatorizadas y balanceada, donde se presentaron los tratamientos (T1: culantro 0,5% y jengibre 0,5%, T2: orégano 1,0%, T3: culantro 0,5%, jengibre 0,5% y orégano 1,0%,) y la muestra del mercado (M). Se sirvió agua para que los participantes se enjuagaran cada vez que degustaron una de las muestras, esto con la finalidad de eliminar el sabor de la muestra evaluada anteriormente. Se codificó cada una de las muestras con 3 números, los jueces evaluaron en cabinas individuales; el panel consistió de la participación de 100 panelistas consumidores de chorizo, los cuales usaron escala hedónica híbrida de 10 cm. La adquisición de los datos se hizo usando el software Fizz.

Con los resultados obtenidos se realizó un conglomerado para evaluar cómo se agruparon los participantes de acuerdo con su similitud en el agrado de los chorizos. Se realizó un análisis de segmentación, o “clúster”, el cual tiene como objetivo la búsqueda de grupos similares de individuos o variables que se van agrupando en conglomerados seleccionando en cada caso, las variables que se consideran principales para identificar

los grupos, la medida de proximidad más apropiada y el criterio para agrupar a los individuos en conglomerados (Bernabéu y Olmeda, 2008).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación del efecto antimicrobiano del culantro de coyote (*Eryngium foetidum*), orégano (*Origanum vulgare L.*), jengibre (*Zingiber officinale*) y sus mezclas sobre el crecimiento de *Lactobacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. en comparación con los aditivos químicos con función antimicrobiana en el almacenamiento del chorizo cocido.

Para *Lactobacillus* sp. la inoculación se realizó antes del tratamiento térmico, ya que como se indicó, es una bacteria capaz de soportar altas temperaturas (León, *et. al*, 2005). Se inocularon 10^6 UFC/mL en 125 ± 1 g de chorizo y quedaron aproximadamente 5 log UFC/g viables.

Observando en los anexos el análisis de varianza del cuadro XI obtenido de los recuentos de *Lactobacillus* sp. durante el periodo de almacenamiento se determinó que no hay efecto del tratamiento con una potencia de prueba de 0,5570. No hubo interacción tiempo-tratamiento; para el tiempo el cambio fue significativo ($p < 0,0001$) con un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto sólo el tiempo fue significativo ya que el recuento de *Lactobacillus* sp. fue aumentando en todos los tratamientos, durante el almacenamiento como se muestra en la figura 13.

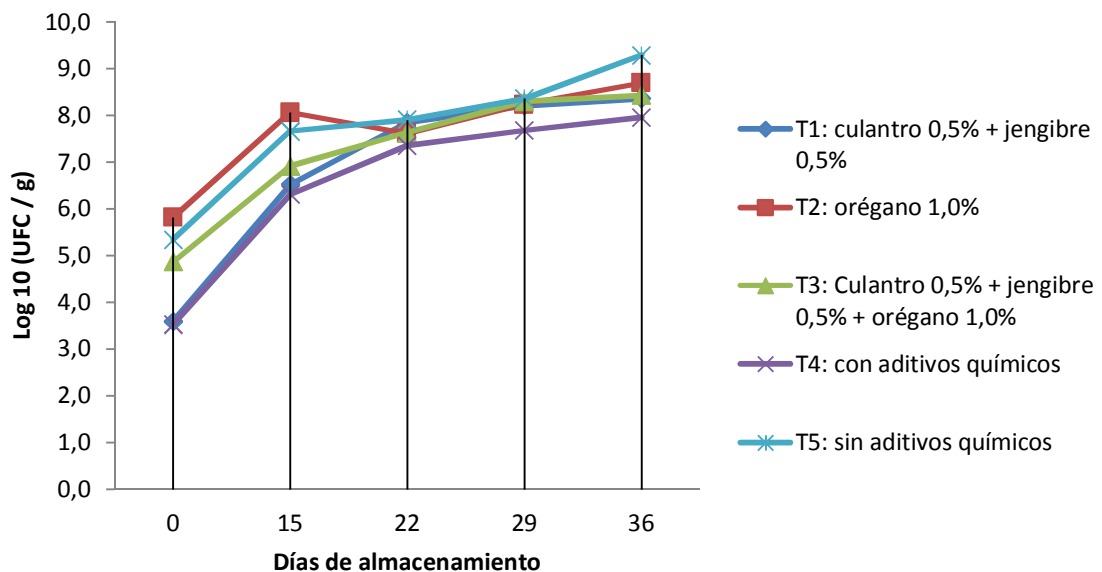


Figura 13. Comportamiento de todos los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento para el recuento de *Lactobacillus* sp.

En la representación gráfica de la figura 13 se puede observar que todos los tratamientos se comportaron de manera similar como lo indica el análisis de varianza del cuadro V.

Según García y colaboradores (2011), la carne fresca empacada al vacío y en refrigeración favorece el desarrollo de las bacterias ácido lácticas, las cuales están en condiciones anaeróbicas; estos investigadores realizaron su análisis sobre carne fresca con una concentración inicial de *Lactobacillus* sp. de 10^5 UFC/g donde a los 9 días de almacenamiento al vacío a 4°C el recuento de *Lactobacillus* sp. aumentó a 10^8 UFC/g ($p < 0,001$). La evaluación de estas especias era necesaria ya que en el caso del análisis hecho por Zapata (2015), se demostró un efecto antimicrobiano con *Lactobacillus* sp. usando culantro de coyote en polvo al 0,5% bajo condiciones controladas, pero como se expresa en este análisis la aplicación de este resultado a un producto como el chorizo no se presentó.

Los factores que propiciaron el crecimiento de esta bacteria se deben a que las bacterias ácido lácticas son endógenas de la carne utilizada para elaborar los productos cárnicos cocidos y refrigerados, empacados al vacío como el procesado en este estudio; la

multiplicación de bacterias ácido lácticas se favorece porque aprovechan el alto contenido de carbohidratos presentes en el chorizo, son psicotolerantes, logran sobrevivir al tratamiento térmico debido a su tolerancia al calor, sal y los nitritos y es anaerobia facultativa (Amerling, 2001).

Por lo tanto no se pudo observar ningún efecto antimicrobiano por parte de ninguna de las especies evaluadas y el crecimiento de *Lactobacillus* sp. se presentó a través del tiempo de almacenamiento en todos los tratamientos de manera significativa.

El otro microorganismo de deterioro incluido en este estudio fue *Pseudomonas* sp. metodológicamente en primera instancia se inoculó 10^8 UFC/ g del microorganismo en la pasta del chorizo crudo y luego se realizó el tratamiento térmico, esto asumiendo que se tuviera una carga alta en la materia prima y que al final del proceso de cocción la carga se encontrara entre 10^3 UFC/g a 10^4 UFC/g, sin embargo como era de esperar, el tratamiento térmico eliminó por completo el microorganismo obteniendo recuentos menores a 10 UFC/g (Díaz *et. al*, 2011) y por tanto se tomó la decisión de inocular por el método de microgoteo sobre una superficie de 3×2 cm² (sólo para estandarizar el método) se inocularon 10^5 UFC/mL en 25 ± 1 g de chorizo ya con el tratamiento térmico realizado, y quedaron aproximadamente 3 log UFC/g viables.

Como lo menciona García y colaboradores (2011) en un estudio de vida útil realizada a carne empacada al vacío y almacenada a 4 °C, *Pseudomonas* sp. son consideradas como indicadoras de una adecuada manipulación higiénica por tanto en una producción de chorizo, la posterior manipulación de este y una posible recontaminación pos-producción puede ocurrir, siendo este procedimiento de inoculación una recreación de lo que en su momento podría, presentarse, y de esta manera evaluar si la presencia de especias en el chorizo cocido y empacado al vacío pueden variar el desarrollo de *Pseudomonas* sp. inoculadas sobre el chorizo.

En el cuadro XII del análisis de varianza que se ubica en los anexos, se observa que *Pseudomonas* sp. durante el periodo de almacenamiento se determinó que no hay interacción entre los efectos simples tiempo y tratamiento y que sólo el efecto simple tiempo y el efecto simple tratamiento fueron significativos con un nivel de confianza del 95%.

Se puede ver en la figura 14 que en este caso la concentración de *Pseudomonas* sp. disminuyó a lo largo del tiempo de almacenamiento en todos los tratamientos. Este resultado muestra la poca tolerancia de *Pseudomonas* sp. al vacío principalmente, como se explicó en el marco teórico, este microorganismo es aerobio. Según Sun Lee (2010) el crecimiento microbiano o actividad en un paquete hermético puede modificar la composición interna de un empaque por el consumo de O₂ y la producción de CO₂ del microorganismo, que puede a su vez ser utilizado para reducir el crecimiento de microbios tales como *Pseudomonas* sp.

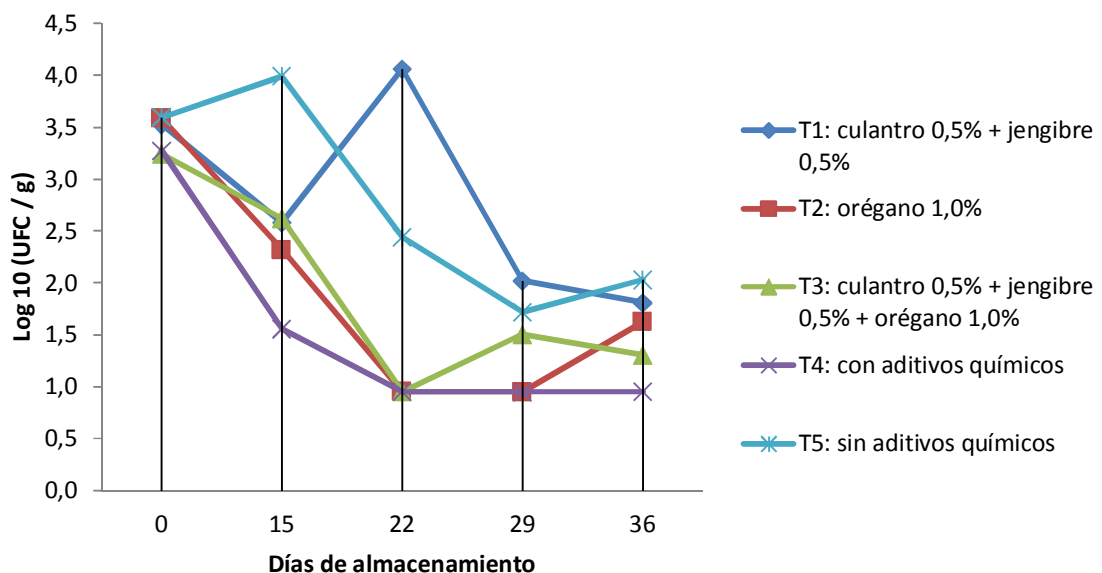


Figura 14. Comportamiento de todos los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento para el recuento de *Pseudomonas* sp.

Un estudio presentado por Rodríguez (2009) muestra como a través de 90 días de almacenamiento de carne fresca empacada al vacío y almacenada a 4 °C se da un crecimiento de *Pseudomonas* sp. hasta el día 60; este estudio hace pensar que la aplicación de especias, vacío y tratamiento térmico, (este último, encargado de reducir la flora microbiana presente en los alimentos e impedir alteraciones producidas por microorganismos no patógenos), controlaron el crecimiento de este microorganismo de

deterioro en el producto evaluado, y que en una posible recontaminación pos-producción estas barreras en conjunto pueden controlar el crecimiento de *Pseudomonas* sp. por tanto, la combinación de estos factores logran inhibir el crecimiento de esta bacteria a través del tiempo.

Como se observa en la figura 14 en el tiempo de almacenamiento los tratamientos donde hubo una reducción semejante al tratamiento con aditivos fueron los que contenían orégano este resultado es comparable a los resultados obtenidos por Hammer y colaboradores (1999) en el cual de 52 tipos de extractos de plantas y aceites esenciales sólo tres de ellas presentaron efecto inhibitorio contra *Pseudomonas* sp. donde el orégano fue uno de esos. En un estudio para evaluar el efecto antibacteriano del *Origanum vulgare* L. realizado por Faleiro y colaboradores (2005) se aisló del material seco del orégano por hidrodestilación tres componentes que constituían el 70% del aceite: timol (33%), γ -terpineno (26%) y P - cimeno (11%) y que presentaron actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*. Lo cual hace prever que estos compuestos u otros presentes en el orégano junto con las condiciones de almacenamiento, ejercieron efecto bactericida. Aquí es donde vale la pena hacer un estudio en aerobiosis simulando una recontaminación para determinar si cuando el consumidor abre el empaque y lo almacena por corto tiempo en refrigeración sin vacío, la especia es capaz de actuar frente al microorganismo y además demostrar que bajo condiciones favorables para su crecimiento el orégano presenta efecto antimicrobiano.

5.2 Evaluación del pH y de la oxidación lipídica por medio del análisis de TBARS durante el almacenamiento del chorizo cocido con especias.

5.2.1 Evaluación del comportamiento del valor del pH en el almacenamiento del chorizo cocido empacado al vacío

Se midió la variación del pH en el almacenamiento de las muestras del chorizo, dicho parámetro se evaluó en los diferentes tratamientos durante el tiempo de almacenamiento de 0 a 36 días.

Según el análisis estadístico del cuadro XIII que se presenta en los anexos, el efecto simple del tiempo y del tratamiento son significativos; además hay interacción tiempo vs tratamiento.

La figura 15 muestra el comportamiento del valor promedio del pH de los tratamientos evaluados a través de los días de almacenamiento, donde se puede observar que los valores de pH en el día 0 son diferentes para cada uno de los tratamientos y van disminuyendo de manera similar.

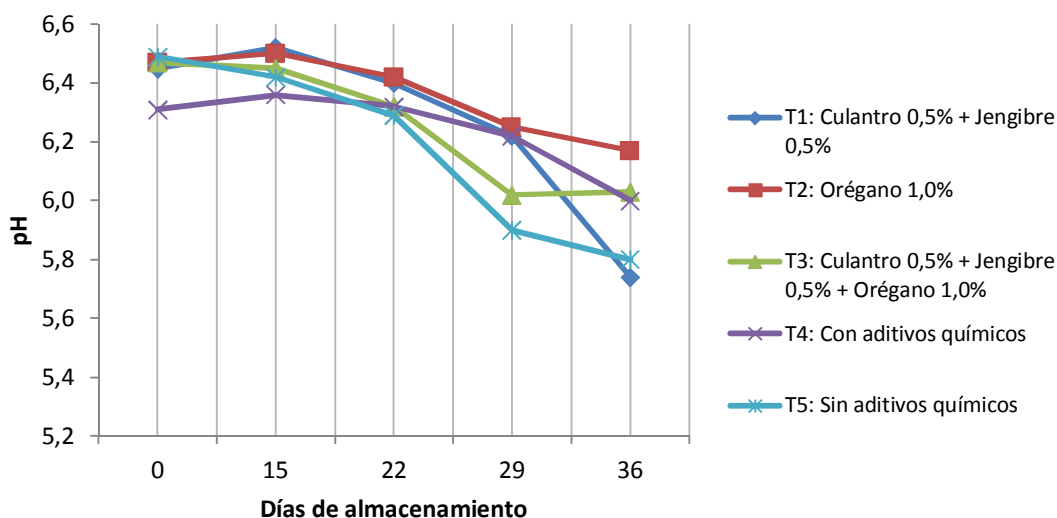


Figura 15. Comportamiento de los valores de pH de cada uno de los tratamientos evaluados a través de 36 días de almacenamiento del chorizo cocido empacado al vacío y almacenado a 4°C.

Al obtener este resultado se realizó un análisis estadístico de cambio neto de pH para poder observar de forma más fehaciente el resultado del estudio de pH en esta investigación y poder observar la interacción entre los efectos simples tiempo – tratamiento. A continuación en el cuadro V se presenta el cambio neto del pH en el tiempo de cada tratamiento evaluado por presentarse la interacción entre los factores simples, la cual indica que el comportamiento en el tiempo va a depender del tratamiento o que el comportamiento del tratamiento va a depender del tiempo.

Cuadro V. Cambio neto del pH experimentado por el chorizo cocido durante el período de 36 días de almacenamiento, empacado al vacío y almacenado a 4°C (n = 3 ± intervalo de confianza).

TRATAMIENTO	CAMBIO NETO DE pH
T1: culantro 0,5% - jengibre 0,5%	-1,128 ± 0,539 ^b
T2: orégano 1,0%	-0,293 ± 0,202 ^a
T3: culantro 0,5% - jengibre 0,5% - orégano 1,0%	-0,432 ± 0,140 ^{ab}
T4: con aditivos químicos	-0,312 ± 0,215 ^a
T5: sin aditivos químicos	-0,690 ± 1,314 ^{ab}

Como se puede observar el cuadro V, los cambios netos de pH más pequeños los presentan el T2 con orégano 1,0% y el T4 con aditivos, indicando que estos son los tratamientos donde estadísticamente el pH tuvo menor variabilidad, el rango de pH en estos dos tratamientos fue de entre 6,47 a 6,0; el cuadro IX del anexo muestra la variación de pH de los otros tratamientos (donde los cambios netos son mayores, indicando un mayor cambio de pH) siendo el T1: culantro 0,5% + jengibre 0,5% el que presentó el rango mayor, comparando estos resultados con la representación gráfica de la figura 16 es posible observar este resultado.

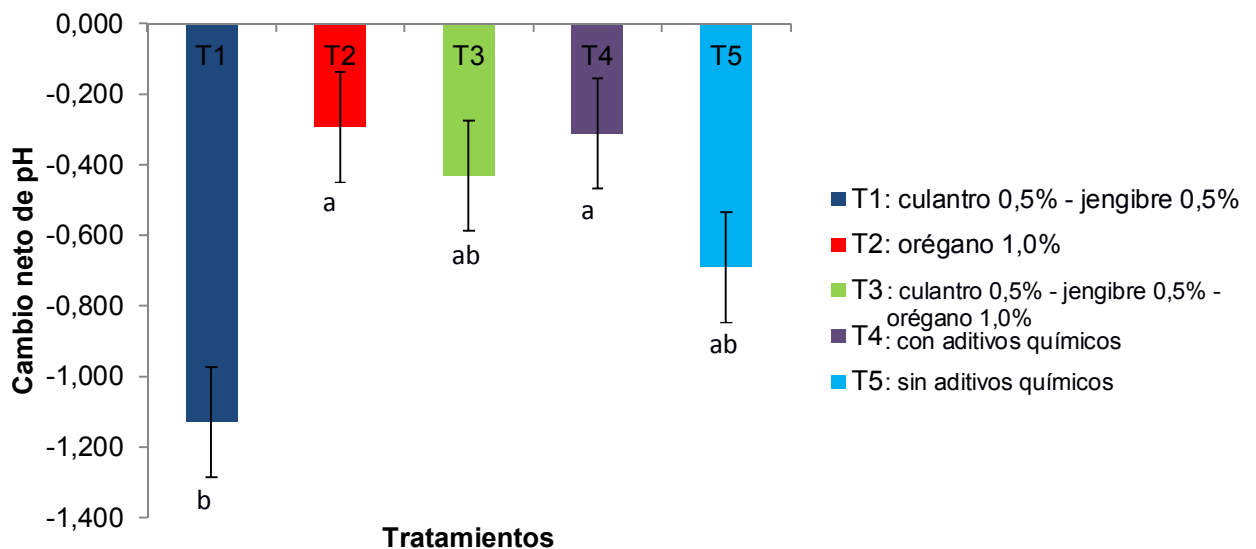


Figura 16. Representación gráfica del cambio neto del pH en el tiempo de cada tratamiento en el chorizo cocido, empacado al vacío y almacenado a 4°C.

Es importante recordar que los lactobacilos aumentan la acidez porque producen ácido láctico, además juegan el papel más importante en la alteración de la carne en anaerobiosis en fases tardías de almacenamiento en frío (Mateauda, 2013); por tanto la disminución de pH se pudo presentar debido a la reactivación de microorganismos de deterioro propios de la flora de la carne o que se hayan incorporado con las especias, como lo son los *Lactobacillus* sp. y que aunque fueron afectados durante el tratamiento térmico lograron recuperarse con el ambiente propicio para su desarrollo, y así iniciaron la descomposición del chorizo cocido.

En los análisis realizados por Zapata (2015) y Acón (2016) se encontró que en un gel cárnico esta diferencia significativa en sus análisis estadísticos no se presentaron; la presencia de grasas, condimentos y diferentes carnes en la producción del chorizo, disminuyen el pH de este producto, siendo la razón según Mateauda (2013), un aumento en la carga bacteriana o la adición de especias. Por lo tanto el valor del pH no es un buen indicador de deterioro y el tratamiento con orégano al 1,0% es el que se comporta

estadísticamente de manera similar al tratamiento con aditivos manteniendo estables los valores de pH.

5.2.2 Evaluación del comportamiento del valor del TBARS en el almacenamiento del chorizo cocido empacado al vacío

En algunas muestras que contenían orégano se presentó una coloración anormal amarilla que también se mostró en el trabajo de Acón (2016), a pesar de que en la metodología se consideraron todas las sugerencias propuestas por Díaz y colaboradores (2014) para evitar la presencia del color amarillo, este siempre se presentó en las muestras que contenían orégano durante toda la evaluación como lo muestra la figura 16 y por consiguiente no se pudo cuantificar la oxidación en estos tratamientos.

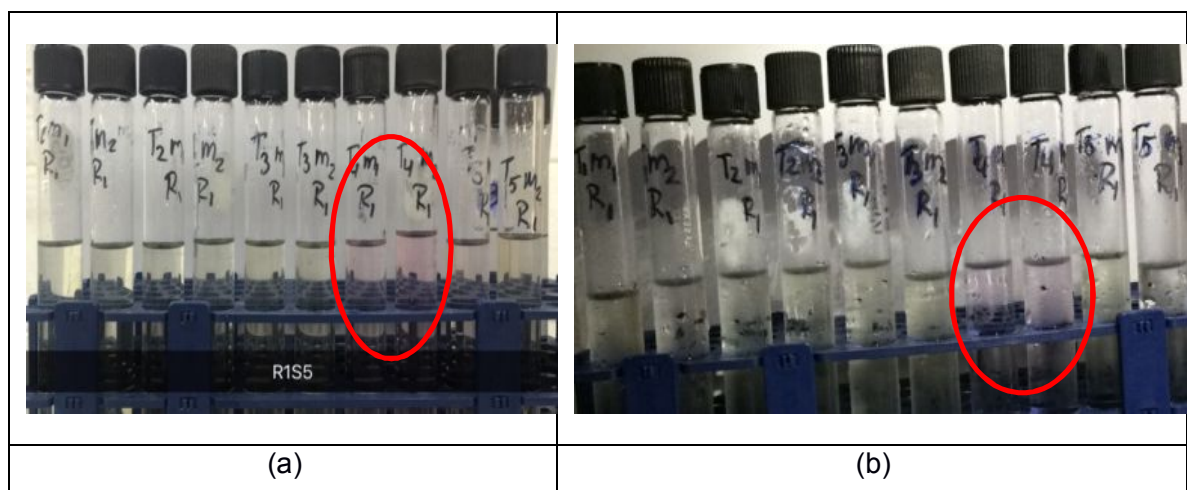


Figura 17. Color del destilado después de reaccionar con el reactivo de TBA en un chorizo cocido, empacado al vacío y almacenado por 36 días a 4°C. (a) día 36 y (b) día 29.

Esta interferencia según Díaz y colaboradores (2014) se ha observado porque muchos compuestos logran reaccionar con el TBA y producir el color amarillo o en otras ocasiones anaranjados, los cuales tienen absorbancia máxima a los 440 nm – 460 nm y al traslaparse estas curvas se podría obtener una estimación incorrecta de las mediciones a 530 nm. Compuestos en productos cárnicos producen estos complejos amarillos o

naranja, tales como proteínas y péptidos solubles en agua, antioxidantes polifenólicos, pigmentos, aminoácidos, azúcares, aldehídos, nitritos y nitratos, quelantes de metales, aditivos y ácidos grasos, los cuales pueden afectar el resultado y por lo tanto los valores TBA con el mismo nivel de oxidación según calificaciones de sabor (Rustad, 2010., Díaz *et al.*, 2014)

Se mantuvo el análisis esperando ver resultados de oxidación al final del tiempo de almacenamiento pero esto no ocurrió, por tanto se procedió a eliminar los datos donde se presentaba dicha coloración (T2: orégano 1,0% y T3: culantro 0,5% + jengibre 0,5% + orégano 1,0%) y se procedió a analizar los resultados de los tratamientos T1: culantro 0,5% + jengibre 0,5%, T4: con aditivos químicos y T5: sin aditivos químicos.

El análisis estadístico que se presenta en el cuadro XIV de los anexos muestra con un nivel de confianza del 95%, que los efectos simples: tiempo y tratamiento son significativos.

El cuadro VI presenta como el índice de TBA fue aumentando sostenidamente en el tiempo donde el máximo de TBA se presentó en el día 29 con una leve reducción en el día 36, lo que indica el comienzo de la oxidación en el tiempo.

Cuadro VI. Promedios de los resultados obtenidos de TBA de los tres tratamientos a diferentes tiempos de almacenamiento un chorizo cocido, empacado al vacío y almacenados a 4 °C (n=3; ± desviación estándar).

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (días)	PROMEDIO TBA (mg de malonaldehído/kg de muestra)
0	0,193 ± 0,054 ^c
15	0,249 ± 0,051 ^c
22	0,278 ± 0,053 ^c
29	1,169 ± 0,062 ^a
36	0,556 ± 0,051 ^b

Nota: Las diferentes letras sobre los promedios indican diferencias significativas con un 95% de confianza.

Este comportamiento se observa de forma gráfica en el gráfico 17 Donde se ve el aumento en el día 29, este comportamiento es característico del análisis de TBA ya que representa el momento en que inicia la formación de los compuestos secundarios de los hidroperóxidos llegando a un mayor valor del límite establecido por Candogan y Kolsarici (2003) de TBA = 1 mg de MDA / kg en el análisis sensorial realizado en salchichas donde se evaluó la oxidación por el método de TBA a través de 49 días de almacenamiento en refrigeración a 4°C.

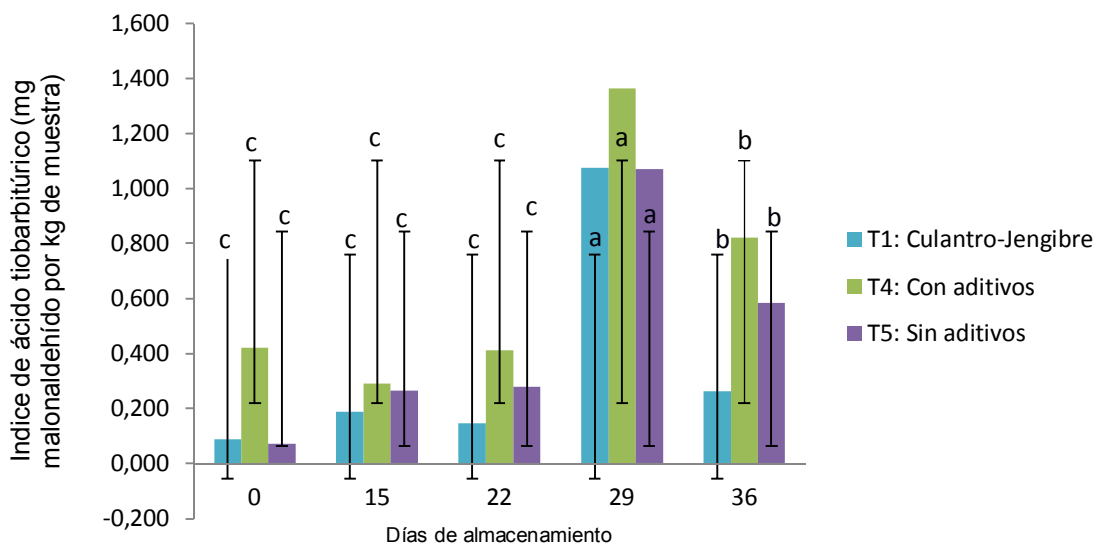


Figura 18. Comportamiento de la oxidación de cada tipo de chorizo a través del tiempo de almacenamiento a 4°C del chorizo cocido y empacado al vacío con los tres tratamientos, mediante análisis de TBA. Las diferentes letras sobre los promedios indican diferencias significativas con un 95% de confianza.

El proceso de oxidación lipídica que se presentó a través del tiempo en este chorizo se dio por la adición de aditivos y condimentos además de la aplicación del tratamiento térmico que favorece el deterioro oxidativo por la pérdida de la integridad de las membranas haciendo a los componentes lipídicos más accesibles a los catalizadores de oxidación lipídica, se aumenta la concentración de hierro ionizado por la ruptura del

enlace con la proteína, se da la formación de la ferrilmioglobina hipervalente promotora de oxidación inactivándose las enzimas antioxidantes de la carne (Rhee *et al*; 1996; Min *et al*; 2008).

El tratamiento T4: control positivo fue el que presentó mayor oxidación (ver figura 17) lo cual fue un comportamiento inesperado y el T1: culantro-jengibre fue el que presentó menor oxidación. Este comportamiento se presentó por el sorbato de potasio adicionado (se agregó: TBHQ, sorbato, y el lactato-diacetato que fueron añadidos por su efecto antimicrobiano); en un análisis de un alimento a base de carne de pollo realizado por Salinas y La Rosa (2001) se presentó este resultado. El sorbato de potasio puede disminuir su concentración a través del tiempo de almacenamiento por autooxidación debido a la presencia de oxígeno que algunas veces queda remanente dentro del empaque al vacío, éste se une a los dobles enlaces del ácido entre sus átomos de carbono 4 y 5, originando de esta manera productos como malonaldehído (Salinas y La Rosa, 2001).

Es importante reiterar que el empaque utilizado no forma un vacío al 100% y que el sorbato de potasio al transformarse a ácido sórbico en el chorizo tiene una estructura ligeramente similar a las grasas y sigue la misma ruta metabólica de los ácidos grasos, al formarse un ácido graso del material lipídico del chorizo el ácido sórbico favorece su propagación al atraparlo, acelerando las reacciones de oxidación explicadas en el marco teórico de este documento (Alvarado, 2017).

Debido a lo explicado anteriormente no se pudo observar el resultado antioxidante del jengibre que observó Zapata (2015). No obstante, ningún valor obtenido sobrepasa los valores límites recomendados de 1 mg de MDA por kg de muestra (Candogan y Kolsarici, 2003), en conclusión los 3 tratamientos controlan la oxidación lipídica en todos los tiempos de almacenamiento. El tratamiento que menos TBA formó fue el T1: culantro 0,5% + jengibre 0,5% entonces probablemente valga la pena realizar un estudio aumentando la cantidad de réplicas para ver si se encuentra la diferencia; también aplicando otros análisis de oxidación como por ejemplo índice de p-anisidina (Chirinos, *et al*; 2015) y cromatografía de gases usados en la industria cárnica (Figueiredo, *et al*; 2016)

5.3 Determinación del agrado de chorizos cocidos elaborados con una combinación del culantro de coyote (*Eryngium foetidum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y orégano (*Origanum vulgare* L.)

El principal objetivo que tiene un análisis sensorial que involucra consumidores es conocer el gusto, la aceptación o reacción de estos ante un determinado producto (Rojas, 2010). Para este análisis, se determinó cuál producto fue calificado con un mayor agrado de forma significativa con respecto a los demás productos en la prueba (Stone y Sidel, 2004).

Al usar la técnica de conglomerados en este estudio para identificar segmentaciones en preferencias, se encontraron 3 segmentos de panelistas los cuales se presentan en la figura 18.

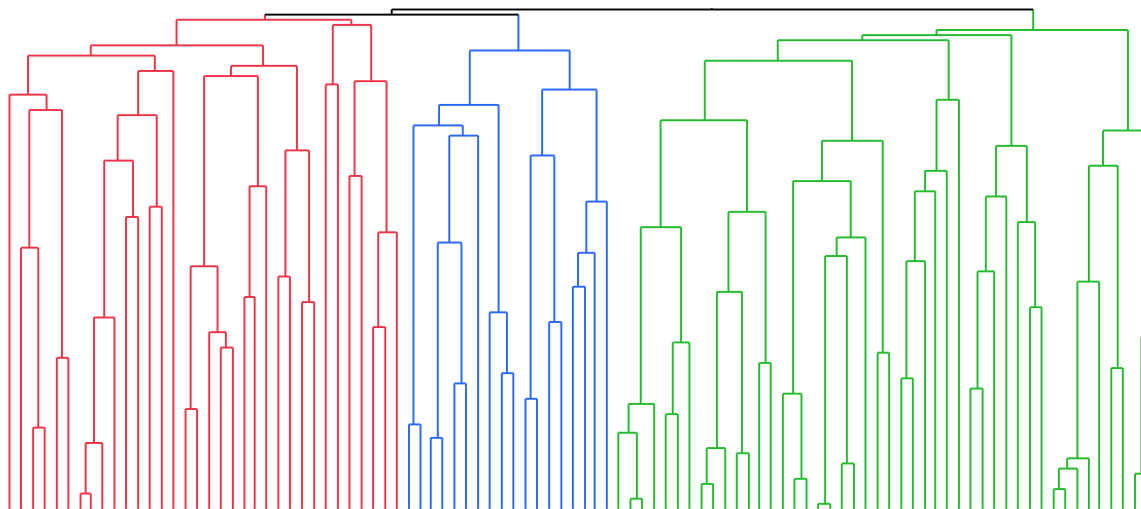


Figura 19. Dendrograma de la clasificación ascendente jerárquica en la obtención de 3 clústers de la prueba de agrado del chorizo empacado al vacío y almacenado a 4°C del mercado y los chorizos con los diferentes tratamientos.

El conglomerado G1 agrupó el 33% del total de consumidores, siendo el segundo grupo en tamaño, el conglomerado G2 agrupó el 48% siendo el grupo más representativo y el conglomerado G3 agrupó el 18% presentando el grupo más pequeño.

Se realizó un análisis de varianza para cada uno de los conglomerados el cual se presenta en las figuras 23, 24 y 25 del anexo. En todos los grupos se encontraron diferencias significativas con un 95% de confianza a un $p < 0,0001$ en el agrado de las muestras evaluadas; para evaluar la tendencia específica de aceptación hacia las diferentes muestras de chorizo, a cada conglomerado se le aplicó una prueba de comparación de medias LSD Fisher que se puede observar en la figura 19.

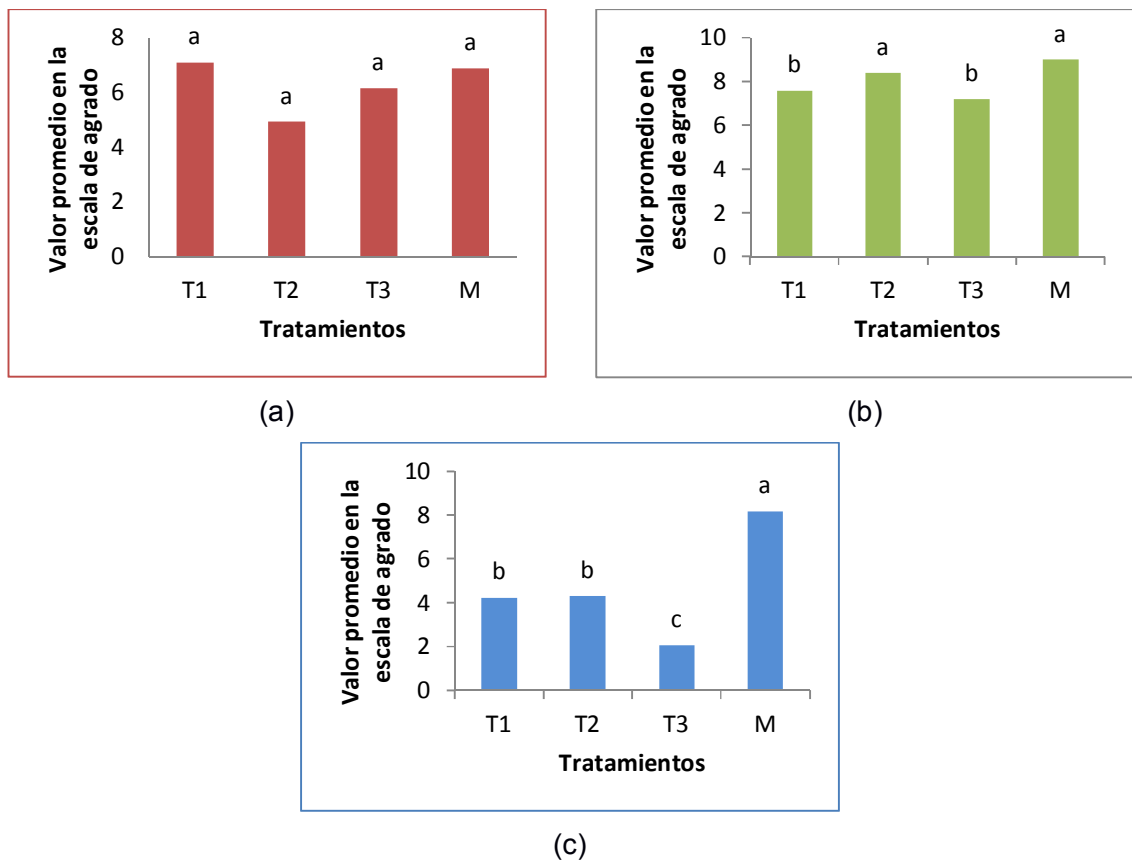


Figura 20. Comparación de medias de las calificaciones dadas por los consumidores de cada conglomerado para los chorizos. a) Conglomerado 1, b) Conglomerado 2, c) Conglomerado 3. Observación: Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas con un 95% de confianza. T1: tratamiento con jengibre al 0,5% y culantro al 0,5%. T2: tratamiento con orégano al 1%. T3: tratamiento con jengibre al 0,5%, culantro al 0,5% y orégano al 1%. M: chorizo que se expende en el mercado.

Como se puede observar en la figura 19 a, el conglomerado G1 con el 33% de los consumidores tuvo mayor preferencia por el chorizo con jengibre 0,5% y culantro 0,5% (T1), el del mercado (M) y jengibre 0,5%, culantro 0,5% y orégano 1,0% (T3), mientras que el T2: con orégano 1,0%, presentó la menor preferencia con diferencia significativa, por lo tanto, observando la puntuación se puede concluir que a este grupo no le agradó el chorizo con sabor a orégano.

El conglomerado G2 (figura 19.b) con el 48% de los consumidores presentó el mayor agrado, siendo en tamaño el grupo más representativo. El mayor agrado lo obtuvo el chorizo de mercado (M) sin diferencia significativa con respecto al orégano 1,0% (T2), lo cual indica que les agradó tanto el del mercado como el con orégano 1,0%; con jengibre 0,5% y culantro 0,5% (T1) y jengibre 0,5%, culantro 0,5% y orégano 1,0% (T3) se observó que en ambos no hay diferencia significativa entre ellos pero con diferencia significativa con respecto al del mercado (M) y orégano 1,0% (T2); lo cual hace pensar que a este grupo le agradó el orégano 1,0% (T2).

El conglomerado G3 (figura 19.c) presentó la menor cantidad de consumidores con apenas un 18% y donde se observa que el mayor puntaje lo obtuvo el del mercado (M) con diferencia significativa con respecto a los otros tratamientos, le sigue en puntaje el orégano 1,0% (T2), jengibre 0,5% y culantro 0,5% (T1) y jengibre 0,5%, culantro 0,5% y orégano 1,0% (T3) respectivamente, por lo tanto por ser el más pequeño, este grupo no es tan representativo como para extrapolarlo a una muestra mayor.

Tomando en cuenta que el G2 es el que presenta el mayor agrado y la cantidad de consumidores más alta en lo que se refiere a cantidad de panelistas consumidores de chorizo, se puede concluir que un chorizo con un porcentaje de 1% de orégano, es aceptado.

VI. CONCLUSIONES

- Los chorizos elaborados mostraron un aumento significativo del recuento de *Lactobacillus* sp. en el tiempo ($P < 0,0001$) con un nivel de confianza del 95% sin diferencia entre tratamientos.
- En el análisis microbiológico con *Pseudomonas* sp. los tratamientos donde el orégano se encuentra presente se comportaron estadísticamente similar al tratamiento que contenía antimicrobianos químicos reduciendo la carga bacteriana, sin embargo para observar un efecto bactericida por parte de esta especie hay que hacer un estudio en aerobiosis simulando una recontaminación para determinar si cuando *Pseudomonas* sp. se coloca en su ambiente propicio para su crecimiento la especie es capaz de actuar frente al microorganismo.
- Los resultados de pH mostró interacción tiempo vs tratamiento ($p=0,001$), el T2 con orégano 1,0% y el T4 con aditivos químicos, son los que presentaron menor disminución del pH, por tanto se concluye que el valor de pH no es un buen indicador de deterioro.
- El tratamiento T4: con aditivos químicos fue el que presentó mayor oxidación lo cual fue un comportamiento inesperado y el T1: culantro 0,5% + jengibre 0,5% fue el que presentó menor oxidación ($p<0,001$). El índice de TBA fue aumentando a través del tiempo de almacenamiento ($p<0,001$) presentando el máximo de TBA el día 29, ningún valor alcanzado sobrepasó los valores límites recomendados de 1 mg de MDA por kg de muestra.
- El chorizo con 1% de orégano muestra resultados de agrado similares a un chorizo que está en el mercado por lo que se selecciona como el de mayor agrado ($p<0,001$).

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio del efecto antimicrobiano del orégano con *Pseudomonas* sp. en un embutido empacado en aerobiosis (por ejemplo cuando se abre un empaque en el hogar y no se consume totalmente el producto) para observar cuál es esa capacidad de protección hacia el embutido al momento de colocar la bacteria en su ambiente de crecimiento óptimo.
- Buscar alternativas para poder evaluar la capacidad antioxidante del orégano utilizando otros métodos como por ejemplo índice de p-anisidina y cromatografía de gases para futuros estudios de oxidación en matrices cárnicas complejas debido a la interferencia que genera el color amarillo y que impide usar el TBA como método de análisis.
- Evaluar diferentes porcentajes de la mezcla culantro- jengibre en embutidos considerando o evitando la presencia de otros antioxidantes o prooxidantes en la formulación del chorizo.

VIII. REFERENCIAS CITADAS

- ACADEMIA DEL ÁREA DE PLANTAS PILOTO DE ALIMENTOS (A.A.P.P.A). 2004. Introducción a la tecnología de alimentos. 2 ed. Limusa Noriega editores, S.A. México D.F.
- ACÓN, Y. 2016. Evaluación de la capacidad antioxidante y antimicrobiana del polvo y oleoresina de orégano (*Oreganum vulgare*) y del polvo de mostaza china (*Brassica juncea*), para utilizar como alternativa natural en embutidos. Proyecto de graduación para optar por el grado de licenciatura en ingeniería de alimentos. Universidad de Costa Rica. San José.
- ALMEIDA, R. 2011. Usos Y Propiedades De Las Especies Y Condimentos. Universidad Técnica Del Norte. Ecuador.
- ALVARADO, H. 2017. Reacciones químicas de oxidación en productos cárnicos. Universidad de Costa Rica, San José. Comunicación personal.
- AMERLING, C. 2001. Tecnología de la carne. EUNED. Costa Rica.
- AOAC. 2012. pH of acidified foods. AOAC Official Method 981.12
- ARMENTEROS, M; VENTANAS, S; MORCUENDE, D; ESTÉVEZ, M y VENTANAS, J. 2012. Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. Eurocarne. Universidad de Extremadura. 207: 63-73.
- ARMENTEROS, M; VENTANAS, S; MORCUENDE, D; ESTÉVEZ, M y VENTANAS, J. 2012. Efecto de la adición de antioxidantes naturales sobre el color y la estabilidad lipídica del jamón cocido. Grupo Tecal, departamento de producción animal y ciencia de los alimentos. Universidad de Extremadura.
- ATLAS, R. 2010. Handbook of Microbiological media. 4°Ed. CRC Press, Florida.
- BADUI, S. 2006. Química de los Alimentos. 4°Ed. Pearson Educación, México.
- BANDONI, A. 2009. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Editorial Cytel. Universidad de Cornell. USA.

- BANERJEE, R; VERMA, A; DAS, A; RAJKUMAR, V; SHEWALKAR, A. y NARKHEDE, H. 2012. Antioxidant effects of broccoli powder extract in goat meat Nuggets. *Meat Science*. 91: 179-184.
- BARREIRO, J y SANDOVAL, A. 2006. Operaciones de Conservación de Alimentos por Bajas Temperaturas. Editorial Equinoccio. Universidad Simón Bolívar. Venezuela.
- BELITZ, H y GROSCH, W. 1997. Química de los Alimentos. 2ª Ed. Acribia, S.A. Zaragoza.
- BERNABÉU, R Y OLMEDA, M. 2008. El consumidor de alimentos ecológicos en Castilla-La Mancha. Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha.
- BOZIN, B., MIMICA-DUKIC, N., SIMIN, N. y ANACKOV, G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food*. 54: 1822–1828.
- BOU, R; CODONY, R; TRES, A. y DECKER, E. 2009. Dietary strategies to improve nutritional value, oxidative stability and sensory properties of poultry products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8: 800- 822.
- BREWER, MS. 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*. 10 (4): 221-247.
- CANDOGAN, K. y KOLSARICI, N. 2003. Storage stability of low-fat beef frankfurters formulated with carrageenan or carrageenan with pectin. *Meat Science*. 64(2): 207-214.
- CAÑIGUERAL, S. 2003. Plantas medicinales y drogas vegetales. Unidad de Farmacología y Farmacognosia. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. 22: 167-168.
- 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.
- CARRILLO, L y AUDISIO, M. 2007. Carnes rojas. *In* Bejarano, N., Gómez, S., Ancasi, E. y Benítez, M. eds. Manual de Microbiología de los Alimentos. UNJU, San Salvador.

- CCECR. 2015. Cámara Costarricense de Embutidores. Costa Rica. Consultado: 22 de abril de 2015. INTERNET.
- CHIRINOS, R ; PEDRESCHI, R ; CEDANO, I ; CAMPOS, D. 2015. Antioxidants From Mashua (*Tropaeolum Tuberosum*) Control Lipid Oxidation In Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis L.*) Oil And Raw Ground Pork Meat. *Journal Of Food Processing And Preservation*. Vol.39(6), pp.2612-2619.
- DA SILVA, N; HIROTOMI, M; JUNQUEIRA, V; SILVEIRA, N; DA SILVA DO NASCIMENTO, M y ROMEIRO, R. 2013. *Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual*. CRC Press, Florida.
- DÍAZ DE VILLEGAS, M; BUENO, G; DE ARMAS, G; TORRES, E y SAURA, M. 2011. Un modelo adecuado de curvas de sobrevivencia microbial en la inactivación térmica de *Pseudomonas aeruginosa*. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*. Vol. 45. 2-6 pp.
- DIAZ, C. 2011. Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie. Trabajo final de graduación para optar por el grado de Doctorado en Ciencias Exactas, Área de Química. Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA). Buenos Aires.
- DIAZ, P; LINARES, M; EGEA, M; AUQUI, S. y GARRIDO, M. 2014. TBARs distillation method: revision to minimize the interference from yellow pigments in meat products. *MeatScience*. 98: 569-573.
- DURÁN, A; GONZÁLEZ, M. y MORA, D. 2009. Estudio sobre la situación actual de la competitividad técnica del subsector exportador de culantro de coyote de Costa Rica. Universidad de Costa Rica.
- ESTÉVEZ, M. 2011. Protein carbonyls in meat systems: A review. *MeatScience*, 89: 259-279.
- ESTÉVEZ, M; KYLLI, P; PUOLANNE, E; KIVIKARI, R. y HEINONEN, M. 2008. Oxidation of skeletal muscle myofibrillar proteins in oil-in-water emulsions: interaction with lipids and effect of selected phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 10933–10940.

- FALEIRO, L; MIGUEL, G; GOMES, S; COSTA, L; VENANCIO, F; TEIXEIRA, A; FIGUEIREDO, AC; BARROSO, JG y PEDRO, LG. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 53(21): 8162-8168.
- FARMER, L. 1994. The role of nutrients in meat flavour formation *Proceedings of the Nutrition Society*. 53: 327-333.
- FIGUEIREDO, I; CLAUS, T; OLIVEIRA, O; ALMEIDA, V; MAGON, T; VISENTAINER, J. 2016. Fast derivatization of fatty acids in different meat samples for gas chromatography analysis. *Journal of Chromatography*. Vol.1456, pp.235-241.
- FRAZIER, W y WESTHOFF, D. 1993. *Microbiología de Alimentos*. Cuarta edición. Acribia. Zaragoza.
- GANDEMER, G. 1998. Lipids and meat quality. Lypolysis oxidation and flavour. *Proc. 44 th, ICoMST*. Barcelona. p 106-119.
- GARCÍA, G; BERMUDEZ, R; HERMIDA, G; GARCÍA-FONTAN, M; TEMPERÁN, S y LORENZO, J. 2011. Estudio de la vida útil de medial canal de "Capón Villalba" almacenada a vacío y en atmósfera modificada. XLVIII Simposio Científico De Avicultura. Santiago de Compostela.
- GRAY. J.I; GOMAA, E.A. y BUCKLEY, D.J. 1996. Oxidative Quality and Shelflife of Meats. *Meat Science*, 43(S): S111-S123.
- HAMMER, KA; CARSON, CF y RILEY TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 1999. 86 (6): 985-990.
- HASSAN, A; NAUMAN, M; MUHAMMAD, F; HUSSAIN, S y NADEEM, M. 2010. A Comparative Study on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Ginger (*Zingiber officinale*) and Cumin (*Cuminum cyminum*). *J. Agric. Food Chem.* 58: 8231–8237
- HIRASA K. y TAKEMASA M. 1998. *Spice Science and Technology*. Marcel Dekker Inc. New York.

HOMER, S; BACCUS-TAYLOR, G y AKINGBALA, J. 2009. Antibacterial efficacy of *Eryngium foetidum* (Culantro) against select Food-borne pathogens. CAES: 27th West Indies Agricultural Economics Conference.

IBRAHIM, H; ABOU-ARAB, A Y ABU SALEM, F. 2011. Antioxidant and antimicrobial effects of some natural plant extracts added to lamb patties during storage. *Grasas y aceites*. 62 (2): 139-148.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS. 2016. Canasta básica alimentaria de Costa Rica.

INTERNET: <http://www.ccit.hn/wp-content/uploads/2014/08/Anexo-Resolucion-No.283-2012-Aditivos-Alimentarios.pdf>

INTERNET: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?para_m1=NRTCynValor1=1ynValor2=64990ynValor3=75733ystrTipM=TC

JARAMILLO, B; DUARTE, E y MARTELO, I. 2011. Composición química volátil del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. colombiano y determinación de su actividad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 16(2)140-15.

JUNG, E; YUN, I; GO, G; KIM, G; SEO, H; JOO, S. y YANG, H. 2012. Effects of radix puerariae extracts on physicochemical and sensory quality of precooked pork sausage during cold storage. *Food Science and Technology* 46: 556-562.

KIOKIAS, S; VARZAKAS, T; ARVANITOYANNIS, I y LABROPOULOS, A. 2009. In *Advances in Food Biochemistry*. En YILDIZ, F ed. CRC Press. Estados Unidos.

KIRK, R; SAWYER, R. y EGAN, H. 2009. *Composición y Análisis de los Alimentos de Pearson*. 9 ed. Grupo Editorial Patria. México.

KOPPER, G. 1994. *Cómo determinar la vida útil de un alimento*. Taller regional sobre pequeña y mediana empresa alimentaria. CITA, San José.

- KUBO, I; FUJITA, K; KUBO, A; NIHEI, K y OGURA, T. Antibacterial Activity of Coriander Volatile Compounds against *Salmonella choleraesuis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52 3329-3332.
- LABUZA, T y SCHMIDL, M. 1985. Accelerated shelf-life testing of food. Food Technology 39(9): 57.64.
- LEÓN, V; TOTOSAUS, A; GUERRERO, I y PÉREZ, M. 2005. Efecto de Bacterias Acido lácticas termorresistentes en salchichas cocidas. Ciencia y Tecnología Alimentaria 5(2): 135-141.
- LUND, M; HVIID, M y SKIBSTED, L. 2007. The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. Meat Science, 76: 226–233.
- MATEAUDA, J. 2013. Estudio de La microflora bacteriana y cambios fisicoquímicos en La carne bovina, empacada AL vacío y almacenada en frío. Trabajo final de graduación para optar por el grado de licenciatura en Bioquímica. Universidad de La República de Uruguay. 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 14 de abril del 2016.
- MILBOURNE, K. 1982. Thermal Tolerance of *Lactobacillus viridescens* in Ham. Meat Science, 9: 113-119.
- MIN, B; NAM, K; CORDRAY, J y AHN, D. 2008. Factors Affecting Oxidative Stability of Pork, Beef, and Chicken Meat. Iowa State University Animal Industry.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA. 2011. Actualidad fitosanitaria. N°59.
- MINISTERIO DE ECONOMÍA INDUSTRIA Y COMERCIO. 2007. Comisión para promover la competencia. Sesión ordinaria N° 24-2007. San José.
- MORA, E. 2015. Procedimiento para la Elaboración de un Chorizo. Universidad de Costa Rica, San José. Comunicación personal.

- MORALES, A. 2007. El cultivo del jengibre (*Zingiber officinale*). Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica.
- MURIEL-GALET, V., CRAN, M., BIGGER, S., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. y 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, G.; BRINGAS, L. y PACHECO, 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. Universidad de Sonora. México.
- NOSTRO, A., SUDANO, A., BISIGNANO, G., MARINO, A., CANNATELLI, M., PIZZIMENTI, F., CIONI, P., PROCOPIO, F y BLANCO, A. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*. (56) 519-523.
- PAUL, J; SEAFORTH, C y TIKASINGH, T. 2011. *Eryngium foetidum* L.: a review. *Fitoterapia*. 82: 302-308.
- PETTERSEN, M., MIELNIK, M., EIE, T., SKREDE, G. y NILSSON, A. 2004. Lipid oxidation in frozen, mechanically deboned turkey meat as affected by packaging parameters and storage conditions. *Poultry Science*, 83: 1240–1248.
- POTTER, N y HOTCKISS, J. 2007. *Food Science*. 5° edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza.
- POUCH, F. It, K. 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3 ed. American Public Health Association, Washington, DC. USA.
- RAGHAVAN UHL, S. 2000. *Handbook of Spices, Seasonings and Flavorings*. CRC Press.
- RHEE, K; ANDERSON, L y SAMS, A. 1996. Lipid Oxidation Potential of Beef, Chicken, and Pork. *Journal Of Food Science*. 61(1): 8-15.

- ROGERS, R. 2001. Manufacturing of Reduced-Fat, Low-Fat, and Fat-Free Emulsion Sausage. In Hui, Y; Nip, W; Rogers, R y Young, O; eds. Meal Science and Applications. Marcel Dekker, New York.
- ROJAS, A. 2010. Características de un puré de papaya (*Carica papaya L.*) variedad Pococí que influyen en su utilización como sustituto de grasa. Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- ROMERO, V; GUILLÉN, M. y GUZMÁN, M. 1997. Utilización del ensayo del Ácido 2-tiobarbitúrico (ATB) para evaluar el proceso autooxidativo en alimentos. Grasas y Aceites 47: 96-102.
- RTCR 411:2008. 2008. Reglamento técnico: productos cárnicos embutidos: salchicha, salchichón, mortadela y chorizo, especificaciones. N° 35079-MEIC-MAG-S. Consultado: 18 de junio de 2015.
- RTCR 67.04.54:10. 2012. Reglamento técnico centroamericano: alimentos y bebidas procesadas. Aditivos alimentarios. N° 283-2012-COMIECO-LXII. Consultado: 7 de febrero del 2016.
- RUBIO, B; MARTÍNEZ, B; SÁNCHEZ, M; GARCÍA, M; ROVIRA, J. y JAIME, I. 2007. Study of the shelf life of a dry fermented sausage "salchichón" made from raw material enriched in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids and stored under modified atmospheres. MeatScience 76: 128-137.
- RUSTAD, T. 2009. Lipid oxidation. In Handbook of seafood and seafood products analysis. En NOLLET, L. & TOLDRÁ, F. ed. CRC Press. Estados Unidos.
- SALINAS, N y LA ROSA, Y. 2001. Estudio de la estabilidad del ácido sórbico en un alimento a base de pollo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). CIENCIA 9(1): 96-102.
- SAMANIEGO, L y SOSA DEL CASTILLO, M. 2000. Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Matanzas.

- SÁNCHEZ-ESCALANTE, A; TORRESCANO, G; DJENANE, D; BELTRÁN, J. A y RONCALÉS, P. 2003. Stabilization of colour and odour of beef patties by using lycopene-rich tomato and peppers as a source of antioxidants. *Journal of Science and Food Agriculture*, 83: 187–194.
- 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.
- SLOAN, A. 2015. The top ten food trends. *Food Technology* 69 (4): 24-40.
- SMALL, E. 2011. Top 100 exotic food plants. CRC Press. Florida.
- STONE, H y SIDEL, J. 2004. Sensory evaluation practices. Elsevier Academic Press, California.
- TAKEMASA, M y HIRASA, K. 1998. Spice Science and Technology. CRC Press. P: 53-84.
- 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.
- TERRASA, A.M. 2012. Alternativas tecnológicas aplicables al desarrollo y conservación de productos cárnicos cocidos (patés) durante el almacenamiento refrigerado. Trabajo final de graduación para optar por el grado de Maestría en Tecnología e Higiene de Los Alimentos. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- VÁSQUEZ, O; ALVA, A y MARREROS, J. 2001. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*. 1(1): 38-42.
- WONG, P y KITTS, D. 2006. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food chemistry*. 505-515.

YOUNG, O; ROGERS, R; HUI, Y y NIP, W. 2001. Meat Science and Applications. CRCPress.

ZAPATA, V. 2015. Determinación del efecto bacteriostático y del efecto antioxidante del culantro coyote (*Eryngium foetidum*) deshidratado, jengibre (*Zingibero officinale*) deshidratado y oleorresina de jengibre en una matriz cárnica. Trabajo final de graduación para optar por el grado de licenciatura en ingeniería de alimentos. Universidad de Costa Rica. San José.

IX. ANEXOS

9.1 Resultados intermedios

9.1.1 Análisis microbiológico

Cuadro VII. Promedio en base logarítmica de los recuentos de *Lactobacillus* sp. (UFC/g) en los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento (n=3; intervalo de confianza).

TRATAMIENTOS	Días de almacenamiento				
	0	15	22	29	36
T1: culantro-jengibre	3.593 ± 2.733	6.519 ± 3.336	7.845 ± 1.010	8.201 ± 1.198	8.361 ± 0.694
T2: orégano	5.813 ± 1.868	8.061 ± 1.078	7.615 ± 1.205	8.233 ± 1.216	8.693 ± 1.483
T3: culantro-jengibre-orégano	4.863 ± 1.739	6.911 ± 2.538	7.634 ± 1.243	8.297 ± 1.280	8.430 ± 0.622
T4: con aditivos químicos	3.524 ± 2.680	6.309 ± 3.132	7.350 ± 0.932	7.682 ± 0.855	7.955 ± 0.964
T5: sin aditivos químicos	5.341 ± 1.314	7.660 ± 1.632	7.905 ± 0.609	8.358 ± 1.349	9.287 ± 0.820

Cuadro VIII. Promedio en base logarítmica de los recuentos de *Pseudomonas* sp. en los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento (n=3; intervalo de confianza).

TRATAMIENTOS	Días de almacenamiento				
	0	15	22	29	36
T1: culantro-jengibre	3.527 ± 1.032	2.581 ± 0.126	4.059 ± 0.892	2.020 ± 0.584	1.810 ± 0.850
T2: orégano	3.586 ± 0.308	2.319 ± 0.071	0.954 ± 0.000	0.950 ± 0.000	1.626 ± 0.774
T3: culantro-jengibre-orégano	3.241 ± 0.296	2.619 ± 0.324	0.954 ± 0.000	1.503 ± 0.574	1.303 ± 0.342
T4: con aditivos químicos	3.275 ± 0.180	1.557 ± 1.182	0.954 ± 0.000	0.950 ± 0.000	0.954 ± 0.000
T5: sin aditivos químicos	3.595 ± 0.176	3.992 ± 0.606	2.439 ± 0.700	1.719 ± 0.248	2.031 ± 0.546

9.1.2 Análisis químico

Cuadro IX. Promedio de los valores de pH en los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento (n = 6; intervalo de confianza)

TRATAMIENTOS	Días de almacenamiento				
	0	15	22	29	36
T1: culantro-jengibre	6.45 ± 0.071	6.52 ± 0.051	6.40 ± 0.044	6.22 ± 0.10	5.33 ± 0.49
T2: orégano	6.47 ± 0.055	6.50 ± 0.045	6.42 ± 0.11	6.25 ± 0.16	6.17 ± 0.18
T3: culantro-jengibre-orégano	6.47 ± 0.081	6.45 ± 0.10	6.32 ± 0.24	6.02 ± 0.26	6.03 ± 0.079
T4: con aditivos químicos	6.31 ± 0.17	6.36 ± 0.14	6.32 ± 0.14	6.22 ± 0.26	6.00 ± 0.31
T5: sin aditivos químicos	6.49 ± 0.078	6.42 ± 0.094	6.29 ± 0.17	5.90 ± 0.34	5.80 ± 0.26

Cuadro X. Promedio de los valores de TBA en los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento (n = 6; intervalo de confianza).

TRATAMIENTOS	Días de almacenamiento				
	0	15	22	29	36
T1: culantro-jengibre	0.087 ± 0.098	0.19 ± 0.15	0.14 ± 0.094	2.31 ± 2.43	0.26 ± 0.21
T4: con aditivos químicos	0.42 ± 0.24	0.29 ± 0.057	0.41 ± 0.24	2.14 ± 1.54	0.82 ± 0.32
T5: sin aditivos químicos	0.083 ± 0.084	0.26 ± 0.070	0.28 ± 0.32	1.78 ± 1.38	0.58 ± 0.25

9.2 Análisis Estadísticos

Cuadro XI. Análisis de Varianza a partir del recuento total del *Lactobacillus* sp. en los tratamientos a diferentes tiempos en el chorizo cocido (n = 3).

Parámetro	Prob >F
Tiempo (días) * Tratamiento	0,5819
Tiempo (días)	< 0,0001*
Tratamiento	0,1128

Nota: Efecto significativo a $\alpha < 0,05$ con un 95% de confianza

Cuadro XII. Análisis de Varianza a partir del recuento total del *Pseudomonas* sp. en los tratamientos a diferentes tiempos en el chorizo cocido (n=3).

Parámetro	Prob >F
Tiempo (días) * Tratamiento	0,8200
Tiempo (días)	< 0,0001*
Tratamiento	< 0,0001*

Nota: Efecto significativo a $\alpha < 0,05$ con un 95% de confianza

Cuadro XIII. Valores p del análisis de varianza para de efectos simples o de interacción de los tratamientos con respecto al análisis de pH del chorizo cocido (n=3).

Parámetro	Prob >F
Tiempo (días) * Tratamiento	0,0011*
Tiempo (días)	< 0,0001*
Tratamiento	0,0325*

Nota: Efecto significativo a $\alpha < 0,05$ con un 95% de confianza

Cuadro XIV. Análisis de Varianza en el estudio de TBARS en los tratamientos a diferentes tiempos en el chorizo cocido (n = 3).

Parámetro	Prob >F
Tiempo (días) * Tratamiento	0, 2781
Tiempo (días)	< 0,0001*
Tratamiento	< 0,0001*

Nota: Efecto significativo a $\alpha < 0,05$ con un 95% de confianza