



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
INGENIERÍA QUÍMICA – BIOINGENIERÍA

PRESERVACIÓN DE ALIMENTOS CÁRNICOS EMPLEANDO UN  
AGENTE ANTIOXIDANTE PRODUCIDO POR UNA RUTA QUIMIO-  
ENZIMÁTICA A PARTIR DE ÁCIDO GÁLICO

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:  
IA. JOSÉ ALEJANDRO RUBIO ESTRADA

TUTOR PRINCIPAL  
DR. MIQUEL GIMENO SECO, FACULTAD DE QUÍMICA

CD. MX. ENERO, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dr. Bárzana García Eduardo

Secretario: Dr. Tecante Coronel Alberto

1er vocal: Dr. Gimeno Seco Miquel

2ndo vocal: Dr. García Arrazola Roeb

3er vocal: Dra. Montiel Pacheco Carmina

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: LAB 314 CONJUNTO  
E FACULTAD DE QUÍMICA

**TUTOR DE TESIS:**  
DR. Miquel Gimeno seco

---

# FIRMA

## Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	5
RESUMEN.....	6
1. Introducción .....	7
1.1. Producción y consumo industrial de la carne.....	7
1.2 Características de la carne .....	9
1.2.1 Del músculo a la carne.....	9
1.2.2. Contenido de humedad.....	10
1.2.3 Grasa Intramuscular.....	11
1.2.4 Proteínas musculares .....	12
1.2.5 Vitaminas .....	13
1.2.6 Minerales .....	13
1.3 Deterioro de la carne.....	14
1.3.1 Oxidación lipídica.....	14
1.4 Técnicas de conservación de la carne.....	21
1.4.1 Técnicas de control de la temperatura .....	22
1.4.2 Tecnologías no térmicas.....	23
1.4.3 Técnicas de procesamiento de la carne.....	25
1.4.4 Tecnologías de empaquetamiento de la carne .....	26
1.4.5 Aditivos en la carne.....	27
1.5 Características y propiedades del PGAL .....	36
2. Objetivo.....	39
2.1 Objetivos particulares .....	39
3. Hipótesis .....	40
4. Metodología .....	41
4.1 Diseño experimental. ....	41

4.2 Síntesis de PGAL.....	43
4.3 Preparación de muestras.....	44
4.3.1 Carne sumergida en los tratamientos (experimento 1) .....	44
4.3.2 Carne molida con los tratamientos homogenizados (experimento 2).....	45
4.4 Caracterización de la carne .....	46
4.3.1 Contenido de humedad y materia volátil .....	46
4.3.2 Contenido total de lípidos.....	47
4.5 Protocolo para medir oxidación de la carne .....	48
4.5.1 productos de oxidación primaria .....	48
4.5.2 Productos de oxidación secundaria .....	51
4.6 Análisis Estadísticos .....	54
5. Resultados .....	56
5.1 Efecto antioxidante del PGAL en la carne sumergía en solución	56
5.2 Efecto antioxidante en la carne molida .....	60
6. Conclusiones.....	65
Referencias.....	66
ANEXOS.....	75

# **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la realización de la tesis.

Se agradece el apoyo y confianza de los técnicos y encargados de los laboratorios L-314, L-323 del conjunto E y del laboratorio 4C del Edificio A de la facultad de química, por permitirme el uso de materiales y equipo.

A mis compañeros de laboratorio L-314 del conjunto E, que me asesoraron y me apoyaron en la parte experimental de este proyecto.

A mi familia que en todo momento me apoyó en esta etapa de estudio y preparación profesional, en especial a mi madre que me brinda su amor incondicional.

# RESUMEN

El consumo de carne en el mundo ha ido en incremento en los últimos años y junto con este incremento también lo ha hecho la necesidad de desarrollar tecnología para preservarlos por más tiempo al llevarlo a grandes distancias, razón por la cual es necesario, analizar, estudiar y plantear mejores estrategias de preservación.

En este trabajo se busca probar la actividad antioxidante del poli (ácido gálico) (PGAL) en carne de res como una alternativa menos tóxica a los antioxidantes sintéticos, dada sus características, su origen natural (ácido gálico) y las condiciones suaves de síntesis.

Se empleó un antioxidante sintético de referencia (BHT) para evaluar y comparar la actividad antioxidante del PGAL. Para esto se trabajaron dos experimentos o variantes en la forma de aplicar los antioxidantes en la carne. El primer experimento o variante consistió en preparar diferentes soluciones acuosas a distintas concentraciones de PGAL y una con BHT, en las cuales se dejaron sumergidas muestras de carne en cada una de ellas, por otra parte el segundo experimento consistió en moler la carne y aplicar directamente el PGAL y el BHT hasta llevarlos a una cierta concentración en masa.

Para estudiar el efecto antioxidante del PGAL en la carne, se midieron dos variables de respuesta, para cada uno de los experimentos durante 7 días de prueba y con mediciones cada segundo día. Estas variables fueron:

- Índice de peróxidos
- Substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) .

Se encontró que la actividad antioxidante del PGAL y el BHT cambian dependiendo de la forma en que son aplicados en la carne. Sin embargo, el polímero de ácido gálico, demostró tener características antioxidantes que compiten con el antioxidante sintético BHT en carne de bovino.

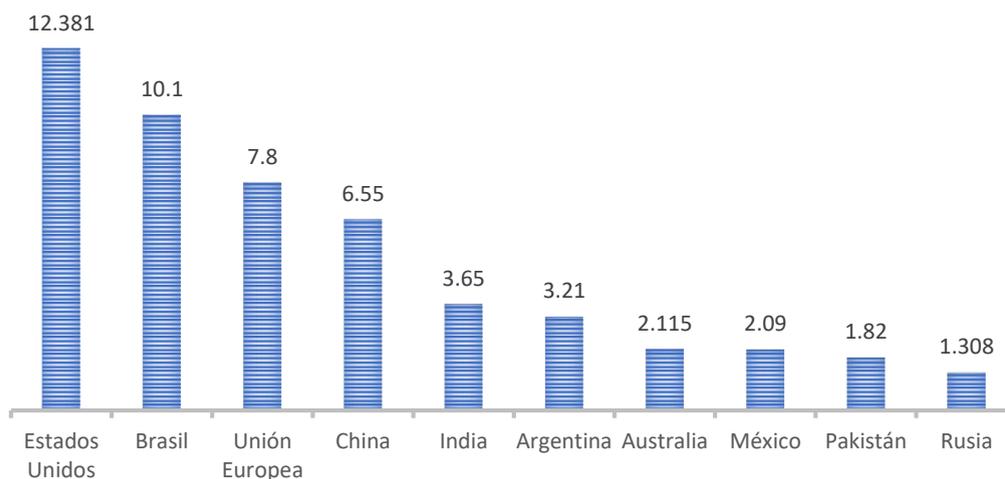
# 1.Introducción

## 1.1. Producción y consumo industrial de la carne

El consumo de carne en el mundo ha ido en incremento en los últimos años y México no es la excepción. De acuerdo con el compendio estadístico 2021 del Consejo Mexicano de la Carne, para el año 2021 se estimó un consumo mundial de 264.4 millones de toneladas, 3.2% mayor en comparación al año anterior. De este consumo mundial, México ocupa el 6º lugar de los países que más consume carne a nivel mundial, a pesar de que la industria de los alimentos fue afectada por la pandemia de COVID-19.

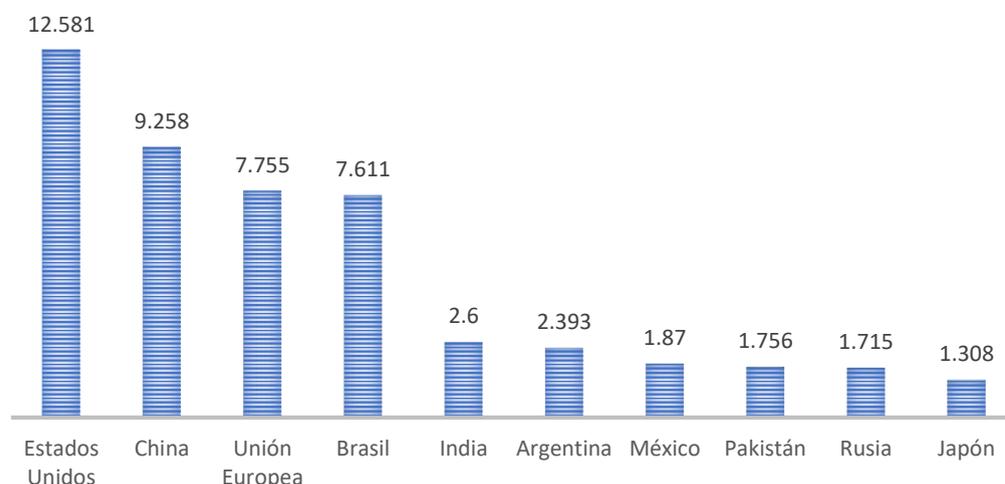
El comportamiento en el incremento de consumo de carne también se ve demostrada en la producción histórica Nacional, según datos del SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) 2021, la producción anual de carne en México pasó de 6.25 millones de toneladas en el 2015 a 7.4 millones de toneladas en el 2020, es decir hubo un incremento del 19% en 5 años, esta producción de carne tiene un valor económico aproximado de 350.4 millones de pesos, según datos del SIAP. De este total de carne producido, COMECARNE (2021) indica que 2.09 millones de toneladas corresponden a carne de bovino, de la cual México ocupa el octavo lugar a nivel mundial.

A nivel mundial 10 países concentran el 85% de la producción de carne de bovino, de la cual México representa el 3.47% de la producción mundial, como se observa en la gráfica 1.1 (COMECARNE, 2021).



**Gráfica 1.1** Principales países productores de carne de bovino en el mundo en 2020. Cifras en millones de toneladas. Datos obtenidos de Comecarne (2021).

Los principales países consumidores de carne se presentan en la gráfica 3.2, los cuales concentran el 83% del consumo mundial. De este porcentaje México representa el 3.17% con un total de 1.87 millones de toneladas de carne al año, colocándolo en el séptimo lugar de los principales países consumidores de carne de bovino en el mundo (COMECARNE, 2021).



**Gráfica 1.2** Principales países consumidores de carne de bovino en el mundo en 2020. Cifras en millones de toneladas. Datos obtenidos de Comecarne (2021).

El sector cárnico representa cerca del 2% del Producto Interno Bruto Nacional de acuerdo con Datos de INEGI. Debido al incremento en la

demanda de consumo de carne a nivel nacional e internacional se vuelve cada vez más necesario implementar y mejorar las técnicas de conservación de la carne para su distribución y almacenamiento, minimizando y controlando su deterioro.

## **1.2 Características de la carne**

La carne es conocida comúnmente como la parte suave y fibrosa del animal usada como alimento, siendo el músculo esquelético el constituyente de mayor proporción producido y consumido en todo el mundo. En algunos países también se consumen, producen y exportan algunos órganos y menudencias de los animales, por lo tanto, la definición de “carne” puede variar de un país a otro e incluso en una misma región (Savell, 2017). Para evitar ambigüedades, en este trabajo se hará uso de la definición de carne descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-030-ZOO-1995, la cual la describe como “la estructura compuesta por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conjuntivo elástico, grasa, hueso, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos de las especies animales autorizadas para consumo humano”.

### 1.2.1 Del músculo a la carne

El músculo es un tejido vivo diseñado principalmente para la producción de fuerzas y movimientos en el cuerpo del animal. El número de músculos presentes en las especies de animales cárnica (incluidos el bovino) es de aproximadamente 300, las cuales tienen diferente tamaño, forma, estructura y composición debido a que cada una de ellas realiza una función diferente (Purslow, 2017).

Cuando en el músculo existe una falta de flujo sanguíneo, el metabolismo cambia de aerobio a anaerobio, ya que el tejido trata de mantener la homeostasis para mantener la producción de energía. A pesar de que en ambas vías se produce Adenosín trifosfato (ATP), ésta es más eficiente por

medio del metabolismo aerobio produciendo 35 moléculas de ATP en comparación con 5 moléculas de ATP producidas en el metabolismo anaerobio. Cuando los niveles de oxígeno disminuyen, la molécula de ATP se consume más rápido de lo que puede ser producida, por lo tanto, el tejido ya no puede mantener la homeostasis y el lactato se acumula junto con nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) en el tejido y a medida que continúa la glicólisis se acumularán iones de hidrógeno y el pH del tejido disminuirá (Ramanathan, y otros, 2020).

De acuerdo con López-Bote (2017), la composición de la carne es de aproximadamente 75 % de agua, 19 % de proteínas, 3.5 % de sustancias solubles no proteínicas, incluidos los compuestos inorgánicos, y 2.5 % de grasas. Dentro de las sustancias solubles no proteínicas se encuentran los carbohidratos, compuestos nitrogenados (aminoácidos, creatinina, entre otros.), compuestos inorgánicos y vitaminas. Se tratarán los contenidos de agua y lípidos por separado.

#### 1.2.2. Contenido de humedad

El agua es el componente de mayor proporción presente en la carne y tiene una influencia significativa en algunas de sus cualidades sensoriales como son la ternura, jugosidad y la calidad del procesamiento de la carne (Warner, 2017). Debido a que la molécula del agua es dipolar, puede interactuar con proteínas o con otras moléculas cargadas, por lo tanto el agua en la carne puede encontrarse ligada e inmovilizada en las estructuras celulares y en forma libre (López-Bote, 2017). El agua ligada a las proteínas forma parte del 13% de la cantidad total de agua presente en la carne, la cual difícilmente se mueve, siendo resistente a la congelación y a ser expulsada por calor. Esta inmovilización del agua es debido a la fuerza que las mantiene unidas a las proteínas, siendo necesario desnaturalizarlas para poder liberar el agua retenida en ellas, ya sea disminuyendo el pH o cambiando la temperatura de su entorno. El agua libre o absorbida en comparación con el agua ligada, se mueve con mayor facilidad y puede ser

liberada en procesos de liofilización o secado al vacío a bajas temperaturas (López-Bote, 2017; Hart, 1991).

La mayor parte del agua contenida en las células musculares vivas se encuentra dentro de la miofibrilla, se estima hasta en un 85%. Esta se encuentra retenida por fuerzas capilares debido a la disposición de los filamentos dentro de las miofibrilla (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005).

### 1.2.3 Grasa Intramuscular

La grasa intramuscular está compuesta de fosfolípidos y triglicéridos principalmente, los cuales tienen carga positiva y neutra correspondientemente. La membrana celular está compuesta de una bicapa formada de fosfolípidos que sirve de barrera estructural y regula a las células vivas. Estos fosfolípidos que constituyen la membrana celular incluyen fosfoglicéridos, plasmalógenos y esfingomielina (López-Bote, 2017). Los fosfolípidos pueden formar estas estructuras gracias a su característica anfifílica, los ácidos grasos hidrofóbicos se acomodan en el extremo opuesto de la parte hidrofílica del fosfato terminal. La proporción de ácidos grasos insaturados esenciales presentes en la membrana está por arriba del 30% incluido los ácidos grasos que tienen más de 20 átomos de carbono en su cadena. Para que las funciones estructurales y reguladoras de la célula sean adecuadas, se debe mantener una proporción de diferentes clases de ácidos grasos insaturados (n-6 y n-3) (Cava y otros, 1997).

Existe un tipo de célula, especializada en almacenar energía acumulando ácidos grasos en forma de acilgliceroles, esta célula se le conoce como adipocito. Los acilgliceroles se caracterizan por no tener carga y en su estructura molecular existen tres ácidos grasos que la vuelven altamente hidrofóbica. Estos adipocitos forman estructuras visibles o manchas blancas que se distribuyen a lo largo del músculo y cerca de los vasos sanguíneos principales (Faucitano y otros, 2005).

Las propiedades de la carne como, la distribución de sales, la migración de agua y reológicas, pueden verse afectadas por la composición de los ácidos grasos presentes, así como del tejido adiposo. En una cadena de ácido graso, todos los enlaces de carbono están orientados alternativamente en una configuración cis, para producir una estructura lineal. Cuando hay un doble enlace, dos enlaces cis están orientados consecutivamente de la misma manera para producir una estructura curva, mucho más difícil de arreglar en una estructura cristalina organizada. Sin embargo, la cantidad de energía necesaria para derretir la grasa es menor conforme el número de insaturaciones presentes en ella incrementa. El punto de fusión de la grasa presente en la carne le confiere diferentes características, cuando la grasa está en estado líquido a temperatura ambiental, la consistencia es baja y la apariencia es aceitosa (López-Bote, 2017). También afecta el color de la grasa, la grasa sólida tiene una coloración blanquecina, mientras que la grasa líquida o derretida tiene un aspecto gris oscuro debido a que al ser transparente permite que sean vistos los tubos capilares y el tejido conectivo (Zhou, y otros, 1993).

Entre los lípidos presentes en la carne se encuentran principalmente ácidos grasos monoinsaturados y saturados, también están presentes ácidos grasos poliinsaturados pero estos se encuentran en menor proporción. Los ácidos grasos saturados predominantes son el ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0). El ácido graso monoinsaturado más prominente es el ácido oleico (C18:1) y en el caso de los ácidos grasos poliinsaturados los predominantes son el ácido linoleico (C18:2) y  $\alpha$ -linolénico. Los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados son considerados generalmente beneficiosos para la salud humana (Abbas, y otros, 2009).

#### 1.2.4 Proteínas musculares

El contenido de proteínas totales en la carne es de aproximadamente el 20%. Del porcentaje total de proteínas, el 12% corresponde a las proteínas estructurales, principalmente actina y miosina, las cuales son proteínas que

se encuentran en forma de miofibrillas relacionadas con el movimiento muscular. El 6% corresponde a enzimas sarcoplasmáticas solubles, las cuales se encuentran presentes en los fluidos musculares y el 2% restante corresponde a las proteínas que se encuentran formando tejido conectivo intramuscular, los cuales encierran la proteína estructural. A estas proteínas se les conoce como colágeno y elastina (López-Bote, 2017; Bender, 1992). De esta manera el contenido proteico de una carne rica en tejido conectivo es menor que otra pobre en tejido conectivo. En consecuencia, la presencia de este tejido en la carne la vuelve dura y reduce su calidad alimentaria y su costo en el mercado (Soren & Biswas, 2020).

#### 1.2.5 Vitaminas

La vitamina es un nutriente vital que el organismo necesita en cantidades limitadas y no todas son sintetizadas en cantidades adecuadas en el organismo, por eso es necesario obtenerlas a través de la dieta. La carne aporta vitaminas del complejo B como Tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6 y vitamina B12. La carne no es una buena fuente de folacina pero contiene biotina y ácido pantoténico, además se sabe que el hígado es una buena fuente de vitamina D y K (Soren & Biswas, 2020).

#### 1.2.6 Minerales

La carne tiene una amplia variedad de minerales entre los que se encuentran el hierro, cobre, zinc, potasio, fósforo, sodio, cloruro, magnesio y calcio. Estos minerales pueden ser cuantificados por medio de la incineración de la carne a altas temperaturas, entre 500-600 °C, en presencia de un agente oxidante. El proceso de incineración remueve el agua y la materia orgánica de la carne para dejar únicamente ceniza que es donde se encuentran los minerales y puede ser cuantificado gravimétricamente. El contenido de ceniza en la carne fresca es de aproximadamente 1% (Soren & Biswas, 2020).

### 1.3 Deterioro de la carne

El deterioro de la carne es provocado por factores como la oxidación de lípidos y proteínas, la autólisis, el crecimiento de microorganismos en su superficie y la contaminación microbiológica (Borch y otros, 1996; Falowo y otros, 2014 y Morrissey y otros, 1998) que afectan su calidad, manifestándose por cambios en sus propiedades organolépticas como: decoloración, malos olores, sabor desagradable, entre otros. También se puede manifestar por cambios en sus valores nutricionales y en la liberación de compuestos tóxicos (Gray y otros, 1996).

#### 1.3.1 Oxidación lipídica

Los lípidos, así como los ácidos grasos que lo componen, son constituyentes clave en la carne que influyen en su cantidad y calidad, como las propiedades sensoriales (sabor, jugosidad, ternura, etc.) y en sus valores nutritivos (Gandemer, 2002). Los lípidos participan en una serie de reacciones, siendo la oxidación de los ácidos grasos la más destacada que se manifiesta por cambios adversos en el sabor, color, textura, valor nutritivo y la formación de compuestos tóxicos (Gray y otros, 1996). Según Morrissey y otros, (1998) Este daño oxidativo a los lípidos ocurre incluso cuando el animal está vivo, debido a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y los mecanismos de defensa animal. También afirma que la alimentación baja en nutrientes y rica en ácidos grasos poliinsaturados en la dieta animal, es un factor importante que interviene en este desequilibrio permitiendo el daño oxidativo a los lípidos, la cual se acentúa en períodos posteriores al sacrificio del animal, debido al manejo y daño de los tejidos musculares.

La oxidación lipídica de los tejidos musculares inicia en la membrana celular de dichos tejidos donde se encuentra la fracción de fosfolípidos que constituyen la bicapa lipídica, ya que, de acuerdo con algunos estudios mencionados por Min & Ahn (2005) los fosfolípidos tienen una participación importante en la peroxidación de lípidos debido a que ésta peroxidación

está más influenciada por la estabilidad oxidativa de los componentes de la membrana que los componentes del citosol, así como de la tendencia de algunas especies animales a almacenar ácidos grasos en los fosfolípidos de la membrana.

Como su nombre lo indica la oxidación lipídica es inducida por el oxígeno, llevada a cabo en presencia de iniciadores de reacción; de acuerdo con Laguerre y otros, (2007) estos iniciadores pueden ser calor, luz, radicales libres, pigmentos fotosensibilizantes e iones metálicos. Además menciona que ésta ocurre a través de tres vías de reacción: autooxidación de cadena no enzimática mediada por radicales libres, fotooxidación no enzimática y no radical, y oxidación enzimática. Sin embargo, esta llamada fotooxidación no radical parece ser una reacción menor en comparación con la autooxidación de cadena de radicales inducida por  $^3\text{O}_2$ .

#### *1.3.1.1 Mecanismo de oxidación*

La oxidación lipídica se desarrolla como en muchos de los compuestos orgánicos mediado por radicales libres que puede ser descrito en términos de iniciación, propagación y terminación. Este mecanismo consiste en una serie de reacciones secuenciales complejas y superpuestas. A continuación se describirán cada una de las etapas de la oxidación lipídica de acuerdo a lo descrito por Frankel, (2005) y Laguerre y otros, (2007).

##### 1) Iniciación

La fase de inicio implica la degradación homolítica del hidrógeno en una posición relativa al doble enlace de la cadena de ácidos grasos LH. Es poco probable que la reacción (1) se produzca espontáneamente con  $^3\text{O}_2$  debido a la muy alta energía de activación que surge de la barrera de espín entre los lípidos y el  $^3\text{O}_2$ . Los lípidos en estado fundamental de multiplicidad singlete tienen una dirección de giro opuesta a la del oxígeno de multiplicidad triplete.



Sin embargo, esta barrera de espín puede superarse por medio de iniciadores de reacción. Estos iniciadores de reacción pueden ser agentes físicos externos como calor, radiación ionizante o un impacto fotónico en el espectro ultravioleta, y también agentes químicos como iones metálicos, radicales libres y metaloproteínas, como se muestra en la siguiente reacción general:



Esto da como resultado la formación de un radical  $\text{L}_1\dot{\text{C}}$  altamente inestable que se estabiliza abstrayendo un hidrógeno de otra especie química o puede dar inicio a la propagación de la auto oxidación lipídica.

De acuerdo con Frankel, (2005) existen diferentes mecanismos por los cuales se producen radicales iniciadores de la oxidación lipídica. Esto puede ser a través de una disociación térmica de hidroperóxidos, los cuales están presentes en la carne como impurezas (3).



También se pueden producir a través de la descomposición de hidroperóxidos, catalizada por metales de valencia variable (4) y (5).



Incluso algunos sensibilizadores presentes en la carne, al estar expuestos a la luz, se descomponen para formar radicales libres, por ejemplo las cetonas (6).



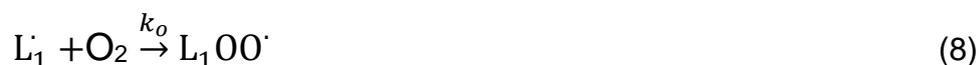
Como se mencionó anteriormente, se requiere de iniciadores de reacción para llevar a cabo la reacción entre el oxígeno triplete ( $^3\text{O}_2$ ) y los lípidos insaturados a través de una reacción tipo radical. Sin embargo, el oxígeno en estado singulete ( $^1\text{O}_2$ ), al encontrarse activado por excitación electrónica, reacciona a una tasa mayor y directamente con los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados (7) mediante un mecanismo concertado de adición de "eno" (Van Dyck, 2010).



Por lo tanto, los hidroperóxidos que se forman a partir de la reacción directa del oxígeno singulete y los ácidos grasos insaturados, pueden servir como importantes iniciadores de radicales libres por las reacciones (3), (4) y (5).

## 2) Propagación

En ambientes aerobios los radicales  $\text{L}_1^\cdot$  que contienen un hidrógeno lábil, reaccionan rápidamente ( $k_o$ ) con oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) para generar diferentes especies de radicales, incluyendo a los peroxirradicales, como se muestra en la siguiente ecuación:

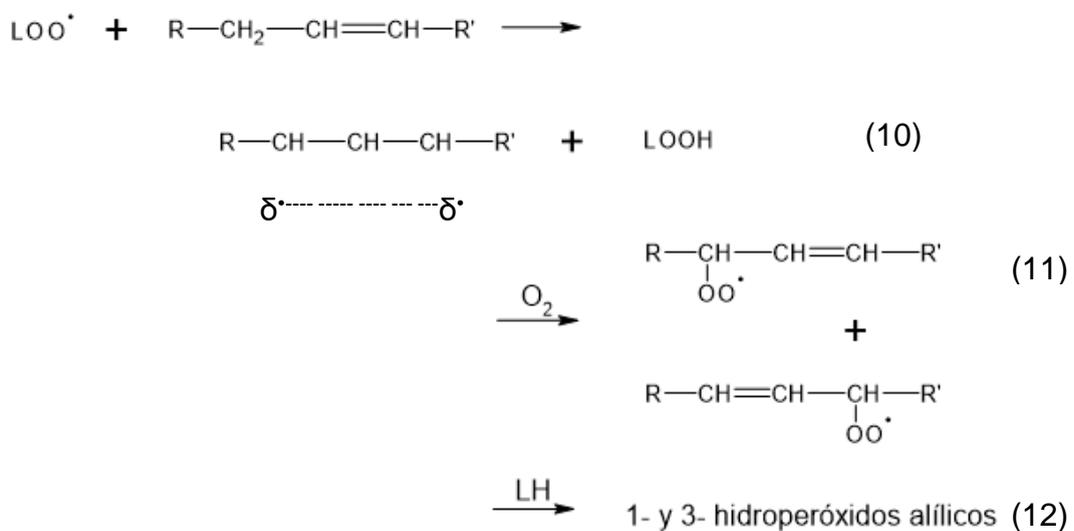


El peroxirradical luego abstrae un átomo de hidrógeno de otra molécula de lípido insaturado para formar hidroperóxido, a los cuales se les conoce como productos de oxidación primaria, y otro radical alquilo lipídico, como se muestra en la ecuación 4. Estos radicales alquilo lipídicos catalizan la reacción de oxidación, y la auto oxidación se denomina reacción en cadena de radicales libres.



La reacción entre el radical alquilo lipídico y el oxígeno se lleva a cabo con mayor rapidez ( $k_o$ ) que la siguiente reacción de transferencia de hidrógeno ( $k_p$ ) con lípidos insaturados, en consecuencia, la concentración de radicales alquilo lipídicos es menor en comparación con la concentración de radicales peroxi lipídicos (Aidos y otros, 2002).

La reacción de propagación depende de la disponibilidad de hidrógenos alílicos y de su facilidad para reaccionar con radicales peroxilo. Una vez que el hidrógeno alílico reacciona con el radical peroxilo (10), se forma un radical híbrido ( $\delta\cdot$ ), con un radical libre parcial en cada extremo del sistema alílico. Posteriormente el oxígeno molecular ataca en cada extremo del sistema alílico para producir una mezcla de hidroperóxidos alílicos con los grupos funcionales en los carbonos 1 y 3 como se observa en la Figura 1.1:



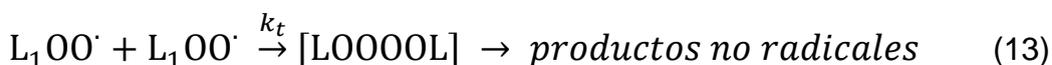
**Figura 1.1.** Esquema general de autooxidación de lípidos insaturados hasta la formación de hidroperóxidos. Obtenido de Frankel, 2005.

Los radicales peroxilo resultantes de la reacción 11 pueden asumir diferentes conformaciones estereoquímicas que determinan su configuración geométrica (cis y trans) de los hidroperóxidos, por lo tanto, se forman muchos isómeros de hidroperóxido durante esta fase. La formación de hidroperóxido a partir de ácidos grasos insaturados suele ir acompañada de la estabilización del estado radical mediante reordenamiento de doble enlace (deslocalización de electrones), que da lugar a dienos y trienos conjugados.

Los productos de oxidación primaria (hidroperóxidos), son relativamente estables a temperatura ambiente, sin embargo, de acuerdo con Domínguez y otros, (2019), en presencia de altas temperaturas o de metales, se descomponen fácilmente formando compuestos de oxidación secundaria e incluso en estados más avanzados de oxidación se vuelven más inestables, haciendo que el proceso de su descomposición sea mayor que el de su formación, esto resulta en una disminución del contenido de hidroperóxidos. Por lo tanto, un valor bajo de peróxidos puede representar una oxidación temprana o avanzada.

### 3) Terminación

Una forma en la que la reacción de autooxidación de lípidos termina es por medio de la reacción entre radicales para formar productos estables que ya no forman parte de las reacciones en cadena de lípidos. Ejemplo de esto es en la acumulación de los radicales peroxilo los cuales interactúan, debido a que se encuentran en niveles relativamente altos, para formar productos no radicales. La terminación ( $k_t$ ) ocurre primero por la combinación de los radicales peroxilo a un tetróxido intermedio inestable que luego se descompone rápidamente, por el mecanismo de Russell, para producir productos no radicales.



Otra forma en la que los radicales peroxilo pueden terminar la reacción de autooxidación es por medio de su combinación para formar dímeros (LOOL) y oxígeno. Esto se lleva a cabo a bajas temperaturas.



También los radicales alcoxilo y alquilo pueden dar reacciones de terminación combinándose entre ellos para formar dímeros que contienen éter y enlace carbono-carbono como se observa en las siguientes ecuaciones:



Los productos de oxidación primaria o hidroperóxidos, en presencia de metales o a altas temperaturas, se descomponen fácilmente en radicales alcoxilo, lo que conduce a la formación de hidrocarburos, aldehídos, alcoholes y cetonas volátiles. (productos de oxidación secundarios). También se forman otros compuestos secundarios no volátiles, incluidos aldehídos no volátiles, triacilgliceroles oxidados y sus polímeros.

La descomposición de los compuestos de oxidación primaria es un mecanismo complejo en el que un solo hidroperóxido puede generar varios tipos de moléculas volátiles o no volátiles. De acuerdo con Hiatt y otros, (1968) es más probable que el hidroperóxido se descomponga por una vía de escisión homolítica entre el oxígeno y el enlace de oxígeno (17), en la que se producen radicales alcoxilo e hidroxilo. La energía de activación para romper este enlace es menor que la energía de enlace entre el oxígeno e hidrógeno. Posteriormente los radicales alcoxilo pueden reaccionar con un lípido insaturado para formar alcoholes (18b) o se pueden fragmentar en aldehídos insaturados y otros productos inestables (18a), como se observa en la figura 1.2, causando ranciedad en los lípidos poliinsaturados.



cuales juegan un rol importante en la estabilidad de la carne, principalmente durante su almacenamiento.

Existen varios métodos de preservación de la carne, los cuales pueden catalogarse en cinco grupos: el primer grupo consiste en el control de la temperatura, ya sea altas o bajas temperaturas, el segundo grupo consiste en tecnologías no térmicas, el tercer grupo consiste en técnicas de procesamiento de la carne, el cuarto grupo consiste en técnicas de empaquetamiento de la carne y el quinto grupo consiste aplicar aditivos químicos con diferentes propósitos (Ledward, 2003, Xiong, 2017 y Toldrá, 2017). En algunos países utilizan una combinación de varias técnicas de preservación, siempre evitando que tengan un efecto en la apariencia y el sabor de la carne o por lo menos que este efecto sea mínimo (Xiong, 2017).

#### 1.4.1 Técnicas de control de la temperatura

Estas técnicas consisten en reducir o incrementar la temperatura de la carne, con el objetivo de prevenir el crecimiento de microorganismos o retardar reacciones químicas indeseables como el caso de la oxidación lipídica (Ledward, 2003).

De forma general, Las técnicas de control de temperatura pueden clasificarse en dos grupos, refrigeración y tratamientos térmicos. Las técnicas de refrigeración son aquellas donde se utilizan temperaturas por debajo de los 10 °C y los tratamientos térmicos son aquellas donde se utilizan temperaturas por arriba de los 35 °C (Xiong, 2017 y Ledward, 2003).

Las técnicas de refrigeración a su vez, pueden clasificarse en procesos de enfriamiento y congelación, en los cuales se utilizan diferentes intervalos de temperatura. En el caso del proceso de enfriamiento, como su nombre lo dice, se enfría la carne por debajo de su temperatura ambiente pero sin llegar a congelarla y esto se realiza con diferentes objetivos, por ejemplo para conservar la calidad de la carne y evitar la proliferación de

microorganismos, justo después de la muerte del animal, es necesario enfriar rápidamente las canales de la res. Incluso después de un tratamiento térmico o de haber cocinado la carne de res, es necesario comenzar a enfriar la carne bajo condiciones controladas, con corrientes de aire humedecidas, evitando la desecación y el congelamiento de la carne (Ledward, 2003). Por el contrario, la congelación se lleva a cabo a temperaturas más bajas a las utilizadas en el proceso de enfriamiento, esto depende en gran parte al tipo de carne que se desea congelar y a sus propiedades, además depende de la temperatura del entorno de refrigeración y el método de aplicación de la refrigeración (Xiong, 2017).

Los tratamientos térmicos principalmente, están dirigidos a eliminar microorganismos indeseables en la carne y de esta manera evitar su deterioro o retardar su deterioro. Sin embargo y en la actualidad estas técnicas se han convertido en un tratamiento secundario para preservar la carne y su uso en la industria de los alimentos se ha limitado a los alimentos enlatados o los alimentos listos para comer, principalmente en alimento para perros. Existen dos niveles de calentamiento por las cuales se puede someter a la carne. El primer nivel es la pasteurización, donde la carne es envasada y se le aplica calor hasta que ésta alcance una temperatura de entre 70-80 °C con el objetivo de detener el crecimiento de microorganismos y evitar dañar lo menos posible a la carne. Por otro lado, el segundo nivel consiste en esterilizar por completo a la carne o por lo menos eliminar la mayor cantidad posible de microorganismos, sin importar alterar las propiedades de la carne. Esto se logra al exponer la carne a temperaturas cercanas entre los 100-120 °C (Xiong, 2017 y Ledward, 2003).

#### 1.4.2 Tecnologías no térmicas

Estas tecnologías están enfocadas en eliminar microorganismos patógenos o desalentar el crecimiento de microorganismos no patógenos al crear entornos desfavorables para su crecimiento en la carne. Consisten en tres

tecnologías: ionización, procesamiento de alta presión y deshidratación por congelación (Ahn y otros, 2017).

De las tres tecnologías no térmicas no disponibles la más eficiente es la irradiación, pero tiene efectos negativos sobre la calidad de la carne, ya que ésta cambia le cambia el color y promueve la formación de malos olores. Estos efectos negativos se producen, debido a que esta técnica de irradiación acelera la oxidación lipídica al formar radicales libres ( $\text{HO}\cdot$ ) en la carne, que es el principal producto radiolítico del agua al ser irradiada (Nam y otros, 2002).

El proceso de procesamiento de alta presión ha demostrado ser capaz de preservar los alimentos por medio de la destrucción de microorganismos transmitidos por los alimentos, ya que a diferentes niveles de presión se ha observado que las células microbianas se ven severamente dañadas y por esta razón los alimentos pueden ser sometidos a presiones en el rango de entre 100MPa - 800MPa. Sin embargo esta técnica puede alterar las propiedades sensoriales de la carne ya que las altas presiones desnaturalizan a las proteínas de la carne y pueden dar paso a la formación de geles y aglomeraciones en la carne, además las altas presiones pueden acelerar la oxidación lipídica y alterar un poco su coloración, aunque esto va a depender del tipo de carne y del nivel de presión que se aplique (Rivalain y otros, 2010; Hsiao-Wen y otros, 2014).

La deshidratación por congelamiento podría catalogarse como tecnología térmica, sin embargo su objetivo no es el de preservar el alimento debido a su congelamiento sino por deshidratación con el objetivo de prevenir el crecimiento de microorganismos y eliminarlos de la carne. El principio de esta técnica consiste en llevar el estado del agua de la carne a su punto triple o cercano a este punto, con el objetivo de sublimar el agua de la carne, esto se logra sometiendo la carne congelada a presiones por debajo del punto triple del agua y luego calentándola para provocar la sublimación del hielo en vapor. A este proceso también se le conoce como liofilización y consiste en tres etapas. En la primera etapa la carne es congelada para

cristalizar el agua. En la segunda etapa la carne congelada es sometida a presiones por debajo de 610 Pa, que es la presión del punto triple del agua, y luego es calentada para provocar la sublimación del hielo en vapor. En la última etapa se elimina el agua ligada a la carne, elevando la temperatura de los estantes donde se encuentran las cámaras (Rahman & Rerera, 2007).

#### 1.4.3 Técnicas de procesamiento de la carne

Estas técnicas tienen su origen en tiempos donde la civilización buscaba preservar por más tiempo el consumo seguro de la carne y no contaba con tecnologías de refrigeración ni de envasado que permitiera preservar a los alimentos. Las técnicas utilizadas abarcan procesos de deshidratación de la carne, técnicas de curado, fermentación y ahumado (Toldrá, 2017).

Existen varias maneras de deshidratar la carne y aunque la técnica varíe, el objetivo es el mismo en cada una de ellas el cual consiste en prevenir el crecimiento de microorganismos o eliminarlos. Además de la técnica de liofilización, que se discutió en la subsección 3.4.1, existen técnicas como la exposición al sol de tiras de carne magra o salar ligeramente la carne y luego secarla al aire en cuartos de secado, donde las condiciones del entorno se encuentran controladas como el flujo de aire, temperatura y humedad (Grau y otros, 2015).

En la técnica de curado se utiliza una sal de curado o también llamada cura, la cual consiste en una mezcla de cloruro de sodio con nitrato y/o nitrito la cual contribuye a desarrollar un color y sabor característico rosa/rojizo curado en la carne, además de que esta mezcla tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de microorganismos indeseables en la carne, debido a la presencia de la sal de nitrito (Flores & Toldrá, 1993; Sebranek, y otros, 2012). Además se ha visto que el nitrito tiene un efecto antioxidante, inhibiendo la oxidación de las grasas en los embutidos, debido a que éstos tienen un efecto de bloqueo de la acción pro oxidante del hierro hemo (Morrisey & Tichvayana, 1985). Sin embargo las sales de nitrito puede

formar nitrosaminas cancerígenas (*N*-Nitrosaminas) en las carnes curadas y esto debido a la reacción producida entre una amina secundaria con nitrito a altas temperaturas y pH bajo (Pegg & Honikel, 2015).

El ahumado consiste en exponer la carne al humo generado por la combustión lenta de aserrín dentro de un horno y mediante la deposición electrostática de partículas de humo de leña. El objetivo de hacer esto es inhibir el crecimiento de microorganismos, retardar la oxidación de grasas y dar sabor a los alimentos curados. Aunque actualmente se realiza esta práctica para dar sabor a la carne, más que como una técnica de preservación (Lawrie & Ledward, 2006).

La técnica de fermentación de la carne tiene por objetivo permitir o desarrollar el crecimiento de microorganismos autóctonos deseables, principalmente bacterias de ácido láctico, las cuales llevan a cabo el proceso de fermentación, convirtiendo los carbohidratos de la carne en ácido láctico. Esto provoca que el pH disminuya, dependiendo de la cantidad de ácido láctico producido, y a su vez este ambiente bajo en pH inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos en la carne (Demeyer y otros, 2014).

#### 1.4.4 Tecnologías de empaquetamiento de la carne

Estas tecnologías consisten en utilizar sistemas de empaque con materiales apropiados, con el objetivo de aislar la carne de su entorno y de esta manera mantener por más tiempo sus características y consumo seguro. En la mayoría de los casos se utiliza esta técnica en combinación con otras técnicas de preservación, que se discuten en el sección 3.4, con el objetivo de maximizar y prolongar sus efectos de preservación, siempre y cuando se utilicen los materiales adecuados para cada una de las técnicas de preservación (Kerry & Tyuftin, 2017).

Existe una gran variedad de tecnologías disponibles en el mercado para preservar alimentos, dentro de las cuales podemos encontrar tecnologías

basadas en empaques al vacío o envasado de atmósfera modificada, e incluso algunos empaques con propiedades antimicrobianas añadidas. En principio los empaques al vacío tienen la función de aislar a la carne de los componentes gaseosos del aire, principalmente O<sub>2</sub> y en cierta medida la humedad, esto con el fin de alargar el consumo seguro de carne además de evitar interacciones entre la carne y los componentes del aire. Por otro lado, el empaquetamiento con atmósfera modificada, también tiene la función de aislar la carne, pero en este caso, este aislamiento se lleva a cabo, modificando los gases del envase y el entorno en el que se encuentra la carne, que en muchas ocasiones se utiliza el gas N<sub>2</sub> para desplazar al O<sub>2</sub> y en algunos casos se utiliza el CO<sub>2</sub>. El CO<sub>2</sub> también tiene una propiedad bacteriostática selectiva, es decir que retrasa o previene el crecimiento de bacterias aeróbicas (Kerry & Tyuftin, 2017; Vermeulen y otros, 2013).

#### 1.4.5 Aditivos en la carne

Dentro de las definiciones dadas por la FAO (La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) en el Codex Alimentarius se da una definición de aditivo alimentario como “cualquier sustancia que normalmente no se consume como alimento o que no se usa como cualquier ingrediente alimentario básico, que puede o no tener valor nutritivo, cuya adición intencional a los alimentos con fines tecnológicos (incluidos organolépticos) en la fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, embalaje, transporte o almacenamiento de dichos alimentos resulte, o pueda esperarse razonablemente resultar (directa o indirectamente) en que él o sus subproductos se conviertan en un componente o afecten de otro modo las características de dichos alimentos”.

En la actualidad la OMS (Organización Mundial de la Salud), en cooperación con la FAO, es responsable de evaluar la seguridad de los aditivos alimentarios a nivel mundial junto con las respectivas organizaciones nacionales de cada país. En México la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios) es la

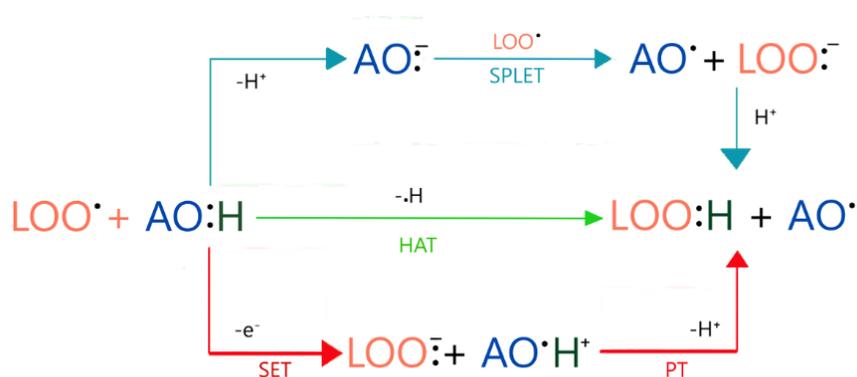
autoridad competente para el ejercicio de las atribuciones que le corresponden a la Secretaría de Salud en materia de regulación y control sanitario de productos, de su importación y exportación. Siempre acorde con las leyes y normativa vigente (COFEPRIS, 2016).

Los aditivos comunes en la carne incluyen antioxidantes, aglutinantes, emulsionantes, antimicrobianos, agentes de curado y aceleradores de curado, agentes saborizantes y colorantes (Nair y otros, 2020). Cada uno de los aditivos cumple una función específica en la carne, por ejemplo, los aglutinantes se utilizan para mantener una dispersión uniforme de la grasa en todo el producto y para conservar el agua durante las diferentes etapas de procesamiento, calentamiento, cocción, almacenamiento y enfriamiento (Devadason y otros, 2010). Los agentes emulsionantes actúan como una interfaz entre los componentes inmiscibles y forma emulsiones más estables en la carne, lo que aumentan su textura y solubiliza o dispersa mejor el sabor (Santhi y otros., 2017). Los agentes de curado se utilizan para proporcionar y mantener el color rojo característico que hace atractiva a la carne y los aceleradores de curado, como su nombre lo indica, aceleran este proceso (Sindelar & Milkowski, 2011). Los antioxidantes se tratarán en un siguiente subcapítulo.

#### *1.4.5.1 Antioxidantes*

Los antioxidantes son sustancias que se agregan a la carne para prevenir la oxidación lipídica y los efectos relacionados a la rancidez de los lípidos, los sabores desagradables y estabilizar el color. Éstos pueden ser de origen natural o sintéticos (Nair y otros, 2020). Incluso los animales producen o generan antioxidantes de forma natural, in situ como un mecanismo para actuar frente al estrés oxidativo, por ésta razón los antioxidantes en la carne los podemos encontrar también como antioxidantes endógenos y no sólo como antioxidantes exógenos (Yehye y otros, 2015), los cuales pueden retardar la oxidación lipídica en la carne (Decker y otros, 2005).

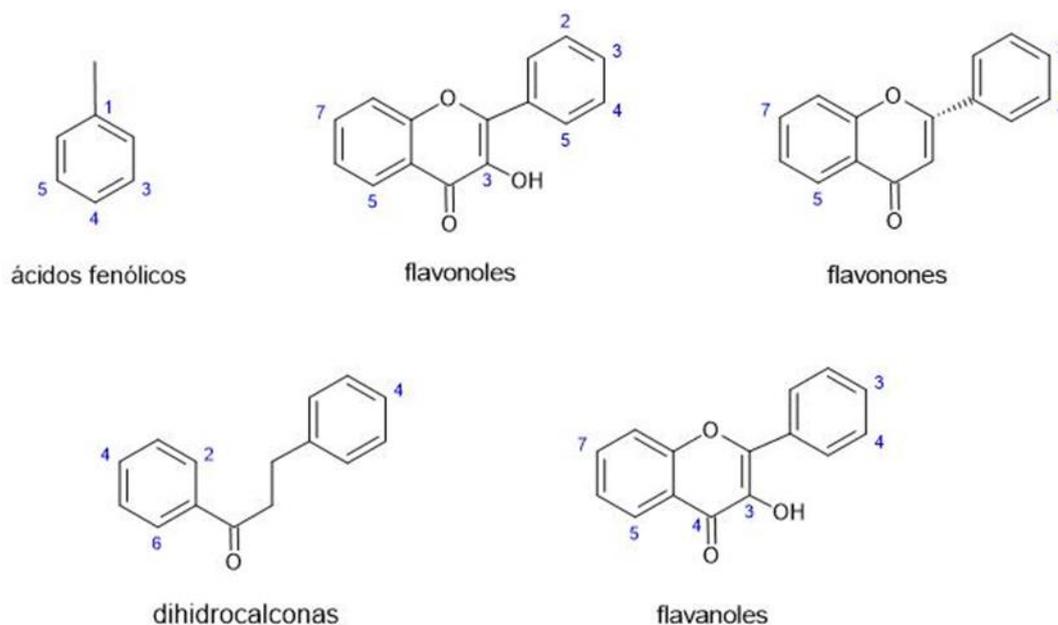
Ya sea de manera endógena o exógena, en la carne podemos encontrar antioxidantes de naturaleza primaria o secundaria. Los antioxidantes primarios o también conocidos como antioxidantes rompe cadena, son aquellos que neutralizan o interceptan a los radicales libres, responsables de propagar la oxidación lipídica., ya sea a través del mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno, (HAT, por sus siglas en inglés), por el mecanismo de transferencia de un solo electrón (SET-PT, por sus siglas en inglés) o por transferencia de electrones seguida de pérdida de protones (por sus siglas en inglés SPLET), los cuales se discutirán más adelante (ver figura 1.3). Los antioxidantes secundarios o antioxidantes preventivos, son aquellos que neutralizan a los catalizadores prooxidantes, también conocidos como iniciadores de la autoxidación lipídica, dificultando así la formación de especies reactivas al oxígeno. Ejemplo de estos antioxidantes podemos encontrar a agentes quelantes de iones metálicos, como por ejemplo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico, polifosfatos, ácido fosfórico, etc. También se encuentran los antioxidantes que desactivan especies reactivas como el oxígeno singulete, por ejemplo:  $\beta$ -caroteno, y  $\alpha$ -tocoferol. Los antioxidantes también pueden actuar por una vía de mecanismos mezclados, es decir pueden comportarse como antioxidantes primarios y secundarios. (Shahidi, 2015; Laguerre, Lecomte, & Villeneuve, 2007).



**Figura 1.3:** Representación esquemática de los mecanismos antioxidantes por transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT), transferencia de un solo electrón seguida de una transferencia de protones (SET-PT) y transferencia secuencial de electrones con pérdida de protones (SPLET). (reproducido de Liang & Kitts (2014) con algunas modificaciones)

### a) Antioxidantes rompe cadena

Los antioxidantes primarios o rompe cadena están conformados principalmente por compuestos fenólicos, los cuales pueden encontrarse en plantas como metabolitos secundarios. Según su estructura química se dividen en varias familias principales (ver figura 1.4) (D'Archivio, y otros, 2007).



**Figura 1.4:** Resumen de las familias principales de los compuestos fenólicos según su estructura. Los carbonos enumerados corresponden a los grupos laterales.

Estos antioxidantes fenólicos (AH) actúan inhibiendo o retardando la oxidación de los lípidos al interferir con la propagación en cadena al transferir un átomo de hidrógeno a los radicales lipídicos (peróxilos, alcoxilos y alquilo) (Shahidi, 2015). Como se mencionó anteriormente esto puede llevarse a cabo a través de 2 mecanismos distintos, siendo el segundo subdividido en otros 2. El primero de ellos llamado mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno (por sus siglas en inglés HAT) consiste en la liberación de un átomo de hidrógeno, en forma de radical, por parte del antioxidante que luego reacciona con un radical lipídico. La energía de activación para llevar a cabo este mecanismo, depende de la energía de disociación de los enlaces A-H y L-H, esto quiere decir que la efectividad del antioxidante aumenta con la disminución de la fuerza del

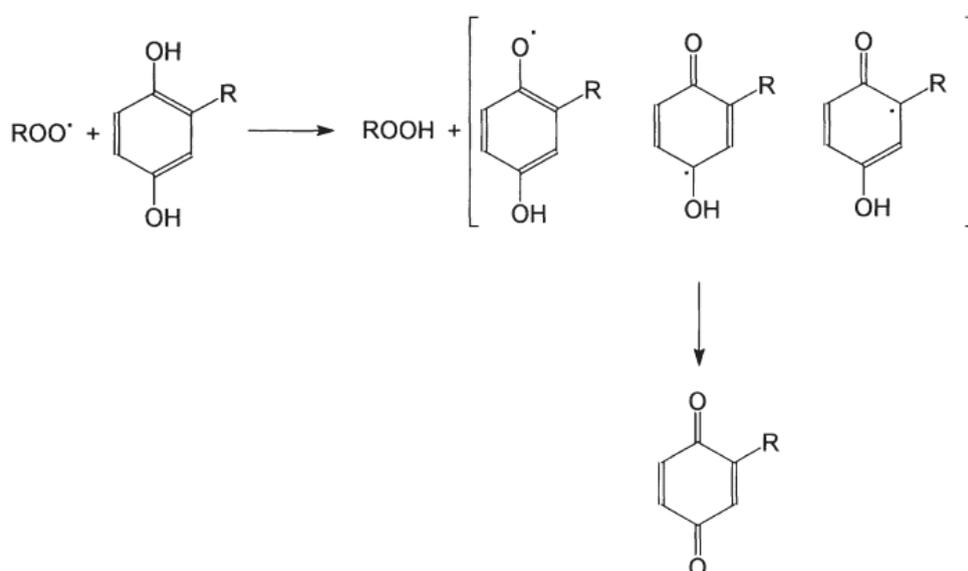
enlace A-H. El segundo mecanismo consiste en la liberación de un electrón al radical lipídico, a través de la transferencia de un solo electrón (SET) seguido de la transferencia de un protón H<sup>+</sup> (PT) ó a través de la pérdida inicial de un protón H<sup>+</sup> del antioxidante, seguido de la transferencia del anión (AO<sup>-</sup>) al radical lipídico, que luego reacciona con el protón H<sup>+</sup>, previamente liberado (SPLET) (ver figura 1.3). El mecanismo SET-PT depende del potencial de ionización necesario para transferir el electrón, y de la energía de disociación del protón necesaria para transferirlo, por lo tanto los antioxidantes que son fácilmente ionizables y desprotonados, son altamente reactivos. (Shahidi, 2015; Lemanska, y otros, 2001; Di Meo, y otros, 2013)

Independientemente del mecanismo (SET o HAT), los antioxidantes rompe cadena pierden un radical hidrógeno y generalmente son transferidos a los radicales peróxilo (19) pero bajo condiciones especiales también son capaces de transferírseles a los radicales alcoxilo y alquilo (20, 21). De acuerdo con Frankel, (2005) los radicales alquilo reaccionan fácilmente con el oxígeno presente para convertirse en radicales peróxilo, por lo que la reacción 20 difícilmente puede llevarse a cabo a presión atmosférica, pero en ausencia de oxígeno y a altas temperaturas, ésta reacción se vuelve significativa. También menciona que el radical antioxidante puede reaccionar nuevamente con un radical peróxilo (22) o puede dimerizarse con otro radical antioxidante (23).



Los radicales antioxidantes intermedios (A<sup>·</sup>) son poco reactivos para propagar la cadena de auto oxidación lipídica, pero son más reactivos con los radicales propagadores de cadena (19), incluso pueden competir con el

sustrato lipídico que se encuentra en mayor concentración. Esto se debe al diseño de los radicales fenoxilo, en donde el electrón desapareado se deslocaliza alrededor de la estructura aromática, el cual se estabiliza debido a la alta energía de resonancia (Figura 1.5), además de la falta de sitios adecuados para el ataque del oxígeno molecular (Shahidi & Zhong, 2010). Esta estabilización es más efectiva cuando los sustituyentes donantes de electrones se encuentran en las posiciones *orto* y *para* en comparación con aquellos que tienen los sustituyentes en las posiciones *meta* (Frankel, 2005).



**Figura 1.5:** Estabilización de una hidroquinona alquilada por deslocalización de electrones (Recuperado de Frankel, (2005)).

## b) Antioxidantes preventivos

Dentro de este grupo se encuentran los antioxidantes inactivadores de iones metálicos, los cuales son capaces de iniciar el proceso de autooxidación y descomponer los hidroperóxidos. Estos antioxidantes forman compuestos de coordinación con los metales, cambiando el potencial de estos al suprimir las reacciones redox que producen radicales alcoxilo y peroxilo o bloqueando la formación de complejos con

hidroperóxidos, previniendo de esta manera la descomposición de los hidroperóxidos (Laguerre y otros, 2007; Frankel, 2005).

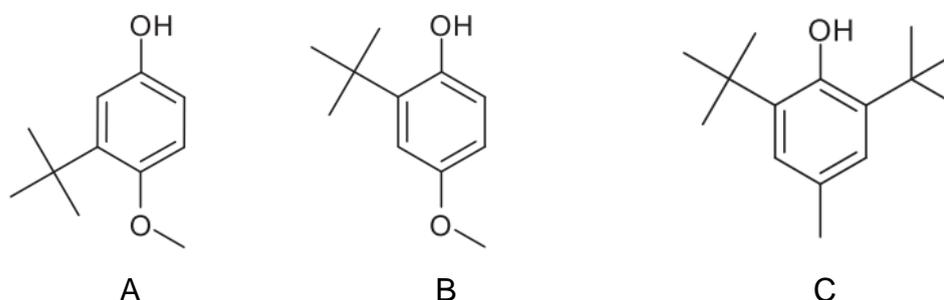
También existen antioxidantes destructores de hidroperóxidos los cuales inhiben la oxidación lipídica al inducir la descomposición de los hidroperóxidos y formando a su vez alcoholes estables o productos inactivos por procesos no radicales. Existen diferentes vías por las que se puede inhibir las reacciones de descomposición, puede ser por donación de hidrógeno que dan paso a la formación de compuestos hidroxil estables (18) o atrapando radicales alcoxilo con radicales antioxidantes (19) (Frankel, 2005).



Existen antioxidantes que previenen la oxidación lipídica, eliminando el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) por medio de la desactivación de su estado excitado. Ejemplo de estos antioxidantes se encuentran algunos carotenoides como el  $\beta$ -caroteno, también el  $\alpha$ -tocoferol, al igual que la quercetina y el ácido ascórbico (Fatima y otros, 2016). La desactivación puede ocurrir a través de dos métodos: El método físico, en la cual el antioxidante entra en un estado excitado vibratorio electrónico y no hay consumo de oxígeno ni formación de productos. Y el método químico, en el cual existe una interacción entre el oxígeno singlete (deficiente en electrones) y el antioxidante (donantes de electrones) formando un complejo de transferencia de carga conocido como extinción de la transferencia de carga o pueden extinguir la transferencia de energía al invertir la reacción de producción de oxígeno singlete. (Wilkinson y otros, 1995).

Los antioxidantes sintéticos como el Hidroxitolueno Butilado (BHT) y el Hidroxianisol Butilado (BHA), se utilizan comúnmente en los alimentos, para inhibir la oxidación de lípidos y el desarrollo de la rancidez, ya sea como eliminadores de radicales libres o sustancias inhibidoras (Nair y otros, 2020;

Madsen & Bertelsen, 1995). Debido a su estructura fenólica (ver figura 1.4), son efectivos como antioxidantes primarios, además de que son altamente liposolubles e ideales para preservar alimentos.



**Figura 1.6:** Estructura química de isómeros de BHA (A y B) y BHT (C)

Los antioxidantes BHA y BHT, contienen grupos *di-terc*-butilo como grupos laterales en el anillo fenólico (Reische y otros, 1998). Estos antioxidantes poseen la característica de ser térmicamente estables, incluso en condiciones donde los alimentos se someten a un proceso de horneado, además han mostrado tener propiedades antimicrobianas y su efectividad antioxidante es tan alta que pueden ser aplicados en los alimentos a bajas concentraciones en comparación a los antioxidantes naturales y mantener la misma actividad antioxidante o incluso más alta (Sahidi & Zhong, 2005). A pesar de que estos antioxidantes son eficientes, relativamente económicos y ampliamente usados por la industria de la carne, en los últimos años se ha prestado mayor interés al uso de antioxidantes naturales en la carne, debido a la creciente preocupación por el uso de antioxidantes sintéticos que presentan efectos tóxicos y dañinos a la salud (Chattopadhyay, 2003). Estos antioxidantes naturales se encuentran como compuestos fenólicos y son los constituyentes principales de extractos obtenidos de fuentes naturales como cereales, semillas, especias, oleaginosas, frutas y verduras (Frankel, 2005). Los antioxidantes naturales y sintéticos presentan ventajas y desventajas uno frente al otro, (Frankel, 2005; Isaza Maya y otros., 2013; Bush & Taylor, 1998) como se resume en la tabla 1.1:

**Tabla 1.1** Tabla comparativa entre antioxidantes naturales y sintéticos.

Naturales	Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>-baja citotoxicidad.</li> <li>-ampliamente aceptados por consumidores.</li> <li>-efectos positivos a la salud.</li> </ul>
	Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>-baja estabilidad térmica y lumínica.</li> <li>-afecta las cualidades organolépticas de los alimentos.</li> <li>-variación en la concentración de componentes activos.</li> </ul>
	Ejemplos	Flavonoides, polifenoles, tocoferoles.
Sintéticos	Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>-bajo costo de producción.</li> <li>-alta estabilidad térmica y lumínica.</li> <li>-no modifica las cualidades organolépticas de los alimentos.</li> </ul>
	Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>-efectos negativos a la salud.</li> <li>-no son ampliamente aceptados por consumidores y su uso se encuentra regulado.</li> </ul>
	Ejemplos	Butilhidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT).

En los últimos años se han reportado estudios sobre la actividad antioxidante en carne de res, de extractos de origen natural, como una alternativa a los antioxidantes sintéticos. Estos extractos se caracterizan por contener principalmente compuestos fenólicos, los cuales son considerados como antioxidantes naturales y brindan una alternativa a los antioxidantes convencionales sintéticos utilizados actualmente por la industria cárnica (Reddy y otros, 2018).

En estos estudios se ha reportado que muchos antioxidantes naturales, como el romero, los extractos de especias, la granada, el extracto de

corteza de pino, la canela y el clavo son más activos que los antioxidantes sintéticos usados en la industria cárnica. A pesar de esto, muchos de estos extractos, como se menciona en la tabla 1.1, modifican las características organolépticas de la carne (Karre y otros, 2013). En el año 2010, la Unión Europea autorizó el uso de extractos de romero como nuevos aditivos alimentarios para uso en alimentos bajo la Directiva 95/2/EC, modificada por la Directiva 2010/69/EU en la que se le asignó un número E al extracto de romero y bajo la directiva 2010/67/UE, se establecen sus criterios específicos de pureza.

También se ha reportado el uso de propóleo microencapsulado como antioxidante natural en carne de hamburguesa y se encontró que es tan efectivo como el antioxidante sintético eritorbato de sodio (Reis, y otros, 2017).

### 1.5 Características y propiedades del PGAL

El PGAL es un polifenol no tóxico polimerizado por la Lacasa de *Trametes Versicolor* (LTV) a partir de GA, una molécula fenólica no tóxica y naturalmente abundante, en condiciones de reacción suaves (López, y otros, 2013). Las cadenas poliméricas están formadas por unidades repetitivas de ácido gálico en forma de radical, como se observa en la figura 4, tiene una masa molar promedio aproximado de 6000Da y es soluble en agua, ionizándose parcialmente en forma de sal de carboxilato de sodio (Romero-Montero, y otros, 2017).

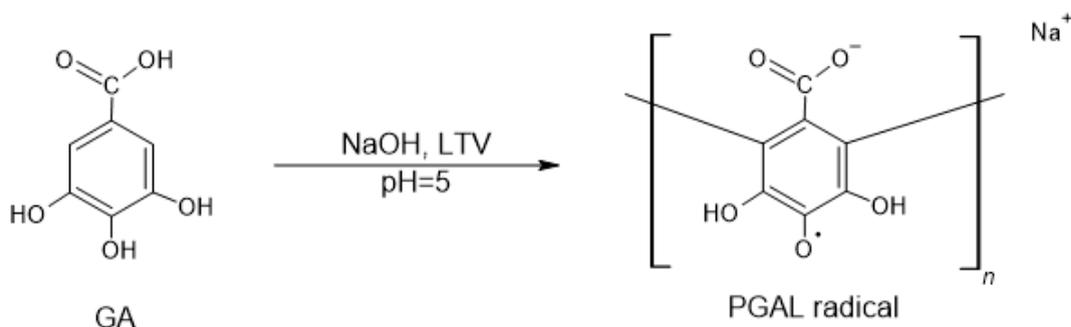
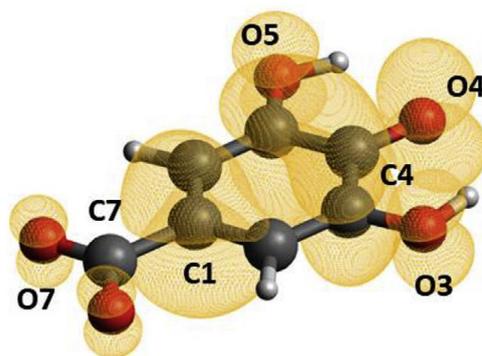


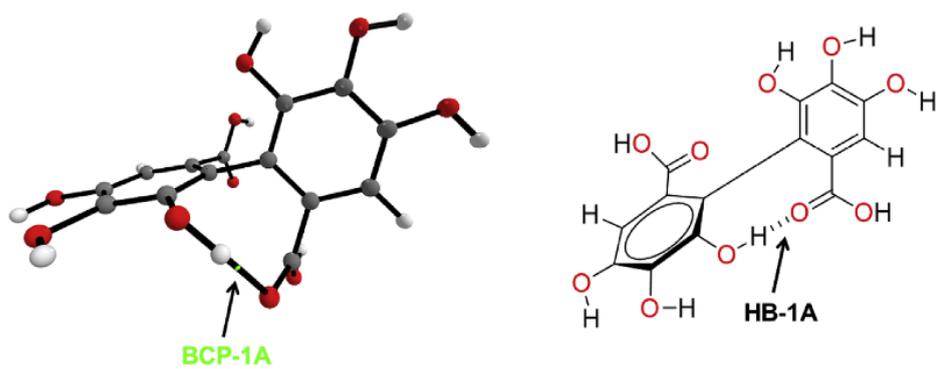
Fig. 1.7 Polimerización del Ácido Gálico mediado por la enzima LTV

El polímero de PGAL ha demostrado tener capacidad antioxidante en ensayos *in vitro* por eliminación o inhibición de radicales DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) medidos en espectroscopia de resonancia paramagnética de electrones, además ha mostrado tener efecto citoprotector en células de fibroblasto dérmico (Sánchez-Sánchez, y otros, 2017). Esta característica de mostrar actividad antioxidante es debido a la naturaleza polianiónica y multirracial del polímero, de acuerdo con (Romero-Montero, y otros., 2019) la razón de esta naturaleza multirradical se encuentra dentro del anillo aromático de cada monómero, las cargas electrónicas se encuentran deslocalizadas, teniendo una mayor distribución de densidad electrónica en los carbonos del 3 a 5 como se observa en la figura 1.8. Esta deslocalización de las cargas electrónicas en las unidades monoméricas da como resultado la formación de puentes de hidrógeno intramolecular (ver figura 1.9) en la cadena de polímero.



**Fig. 1.8** Distribución de densidad de espín. Recuperado de Romero-Montero, et al( 2019)

Estas interacciones tienen un efecto en las cadenas de polímero, por ejemplo, los enlaces de hidrógeno intramolecular indicados como HB-1A Y HB-1B, mostrados en la Figura 1.9, intervienen en la conformación y configuración de las cadenas de polímero, dando como resultado estructuras helicoidales. Además, estos enlaces intervienen en la estabilidad electrónica del polímero que le da esa característica de ser multirracial y estable a temperatura ambiente sin necesidad de protegerlo de la luz.



**Fig. 1.9** EHI dentro de modelos reducidos de PGAL radical. Recuperado de Romero-Montero, et al; 2019

También se ha demostrado que el PGAL actúa como antioxidante por medio del mecanismo de transferencia de un solo electrón (SET) (Romero-Montero, y col., 2019).

## **2. Objetivo**

Comprobar la actividad antioxidante del PGAL enzimático como aditivo en la carne de res y determinar su capacidad antioxidante, en diferentes formas de aplicarlo en la carne, frente a un antioxidante sintético de referencia y un sistema control.

### **2.1 Objetivos particulares**

1. Caracterizar la actividad antioxidante del PGAL en la carne de res, comparando y midiendo la aparición de compuestos de oxidación primaria (valor de peróxidos) y compuestos de oxidación secundaria (TBARS) con un compuesto de referencia (BHT) y un sistema control.
2. Determinar la concentración de PGAL con mayor actividad antioxidante, comparando Valor de Peróxidos y TBARS en las muestras de carne, a diferentes concentraciones de PGAL.
3. Estandarizar las técnicas de valor de peróxidos y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) para medir compuestos de oxidación primaria y secundaria respectivamente en las muestras de carne.
4. Desarrollar un procedimiento donde el antioxidante se encuentra en solución acuosa y se aplique directamente a la carne y compararlo con otro procedimiento donde el antioxidante se aplique en carne de res molida, para determinar su efectividad antioxidante.

### **3. Hipótesis**

- 1.- El PGAL mostrará actividad antioxidante en los experimentos en la carne de res.
- 2.- Se determinará el mecanismo antioxidante del PGAL como rompe cadena, similar al que muestra el BHT, debido a que ambos antioxidantes eliminan radicales libres demostrado en ensayos in vitro.

## 4. Metodología

En este trabajo se desarrollaron dos procedimientos, en el primer procedimiento se utilizó carne de res en filete y en el segundo procedimiento se utilizó carne de res molida. Esta carne se adquirió de un supermercado local. Se seleccionaron cortes de carne provenientes de la sección dorsal de la res, debido a que estos cortes tienen menor porcentaje de grasa en comparación a otros cortes provenientes de otras secciones de la res (Lukic, y otros, 2019), ubicándose entre 2 y 5% de grasas totales, consideradas como carnes magras. A estos cortes de carne se les recortó el tejido adiposo para eliminar toda la grasa externa, además se eliminó parte del tejido fibroso. Posteriormente las muestras de carne se almacenaron a -70 °C hasta la toma de muestra para su análisis. Se utilizó esta misma muestra de carne para ambos procedimientos. El primer procedimiento consistió en dejar sumergidas las muestras de carne fileteadas dentro de los tratamientos y en el segundo procedimiento se utilizó carne molida y los tratamientos se mezclaron directamente en la carne molida. Cada experimento contempla un tratamiento con un antioxidante sintético y un control, esto para poder comparar y comprender la actividad antioxidante del PGAL en la carne. Los detalles del manejo de las muestras en cada procedimiento se detallan en el subcapítulo 4.3.

### 4.1 Diseño experimental.

Para medir el avance de la oxidación lipídica en la carne se utilizaron 2 estrategias de medición que implicaron medir: formación de productos de oxidación primaria (valor de peróxidos) y formación de compuestos de oxidación secundaria (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico). Para esto se realizó un diseño por bloques aleatorizados completos, considerando al factor tratamiento como factor principal con 5 niveles, cada uno por duplicado, y al factor días como factor de bloqueo. Las variables de respuesta son: valor de peróxidos (VP) y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). El modelo se resume en la tabla 4.1.

**Tabla 4.1** Diseño experimental resumido para las muestras sumergidas en solución

Muestras en solución										
Tratamientos (Bloque A)	Días (Bloque B)									
	Día 0		Día 1		Día 3		Día 5		Día 7	
BHT 100 mg/L	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
PGAL 100 mg/L	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
PGAL 500 mg/L	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
PGAL 1000 mg/L	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
control	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS

VP, valor de Peróxidos. TBARS, Sustancias Reactivas al ácido Tiobarbitúrico

Este diseño se aplicó para dos experimentos diferentes, uno para la carne sumergida y otra para la carne molida mezclada con los tratamientos como se describe en la sección 4.2. Se realizaron dos repeticiones por cada medición de VP y TBARS.

**Tabla 4.2** Diseño experimental resumido para las muestras molidas.

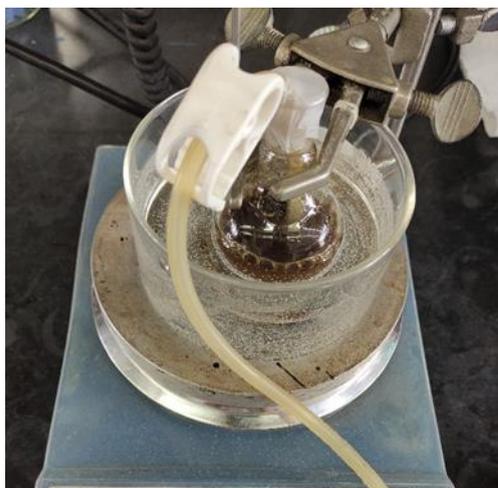
Muestras molidas										
Días (Factor B)	Tratamientos (Factor A)									
	BHT 100 mg/Kg		PGAL 100 mg/Kg		PGAL 500 mg/Kg		PGAL 1000 mg/Kg		control	
Día 1	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
Día 2	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
Día 3	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
Día 4	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
Día 5	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS
	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS	VP	TBARS

VP, valor de Peróxidos. TBARS, Sustancias Reactivas al ácido Tiobarbitúrico

Es importante medir los productos de oxidación (primaria y secundaria) para tener un panorama amplio sobre el mecanismo antioxidante del PGAL, de acuerdo con Laguerre et. al., 2007, es posible encontrarse con dos escenarios: en el primero la adición de antioxidantes puede aumentar el nivel de productos de oxidación primaria mediante la cesión de un átomo de hidrógeno a un peroxirradical para formar un hidroperóxido lipídico. En consecuencia, la concentración del producto de oxidación secundaria disminuye. Si solo se mide los productos de oxidación primaria, se podrá concluir que está involucrado un efecto prooxidante, a pesar de que la molécula probada ha actuado como antioxidante. De manera similar, algunos agentes prooxidantes como los metales de transición pueden acelerar la cinética de la descomposición del hidroperóxido en productos de oxidación secundarios. Si estos hidroperóxidos son los únicos compuestos de oxidación medidos, entonces una muestra con un alto contenido de hierro podría aparecer como antioxidante, mientras que en realidad provocará una reacción de oxidación en etapas de oxidación más avanzadas.

#### **4.2 Síntesis de PGAL.**

La síntesis del PGAL se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por (López, y otros, 2013). Para este procedimiento se disolvieron 8.5 g de AG en 250 mL de solución tampón de acetato (pH 5, 250 mM) y se vertió en un matraz de fondo redondo de 500 mL, como se observa en la figura 4.1. Se añadieron 20 mL de NaOH (2 M) a la mezcla de reacción y se mantuvo bajo agitación constante a 25 °C en un baño de aceite (IKA RCT basic, EE. UU.). Una vez homogenizada la solución, se añadió Lacasa de *Trametes versicolor* suficiente para alcanzar una concentración de 1 U/mL. Se agitó durante 24 h y se oxigenó durante toda la reacción usando una bomba de aire. La mezcla de reacción se le añadió gota a gota a 2.5 L de etanol frío (5 ° C) y el precipitado se filtró y se secó al vacío con una bomba de aceite ( $1.0 \times 10^{-4}$  mbar) hasta que se obtuvo un polvo negro.



**Figura 4.1** Polimerización del ácido gálico. Controlando la temperatura en un baño de agua, con agitador magnético y bombeo de aire.

### **4.3 Preparación de muestras.**

Se realizaron dos experimentos diferentes, como se describe en el capítulo 4.1. En cada experimento se aplicaron diferentes tratamientos a la carne, las cuales se describirán en los siguientes subcapítulos.

#### 4.3.1 Carne sumergida en los tratamientos (experimento 1)

En este primer experimento, se utilizó una técnica similar al marinado, la cual está basada en el trabajo reportado por Vaithyanathan, y otros., 2011, que consiste en sumergir las muestras directamente en las soluciones que contienen los tratamientos. Para esto se tomaron las muestras de carne previamente almacenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Más adelante la carne se cortó en piezas individuales de 10 g, utilizando una misma herramienta de corte para evitar contaminación. Estas piezas se sumergieron en 60mL (1:2 m/v; músculo:líquido) de los siguientes tratamientos: solución de BHT 100 mg/L, solución de PGAL 100 mg/L, solución de PGAL 500 mg/L, solución de PGAL 1000 mg/L y agua destilada. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un cuarto frío, protegidas de la luz. Se tomaron muestras cada segundo día a partir del día 1 durante 7 días de prueba. Las

muestras se mantuvieron sumergidas durante los 7 días que duró el tratamiento, en recipientes de plástico, abiertos.



**Figura 4.2** Muestras de carne cortadas en piezas de 10 gramos, sumergidas en solución PGAL a distintas concentraciones.

#### 4.3.2 Carne molida con los tratamientos homogenizados (experimento 2)

Para la segunda técnica se tomó una muestra de carne, previamente almacenada a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se molió en una licuadora de cocina hasta obtener una masa uniforme. A partir de esa masa se elaboraron 5 piezas de carne de 100 g cada una a las cuales se les agregó 5mL de diferentes tratamientos, se homogenizaron hasta formar una masa uniforme obteniendo las siguientes concentraciones en masa: 100 mg de BHT/Kg de muestra, 100 mg de PGAL/Kg de muestra, 500 mg de PGAL/Kg de muestra, 1000 mg de PGAL/Kg de muestra y muestra control. De cada una de las albóndigas tratadas se recolectaron muestras para su análisis cada segundo día a partir del primer día de prueba. Las concentraciones de PGAL y BHT que se utilizaron en esta prueba están basados en las cantidades mínimas utilizadas en la industria de la carne para el BHT, indicadas en la norma oficial mexicana (NOM-213-SSA1-2002) para productos cárnicos procesados. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un cuarto frío, protegidas de la luz, durante los 7

días que duró el experimento, las mismas condiciones que las muestras tratadas en el procedimiento anterior.



**Figura 4.3** Muestras de carne molidas en piezas de 100 gramos, cada una mezclada con un tratamiento distinto.

## **4.4 Caracterización de la carne**

### 4.3.1 Contenido de humedad y materia volátil

Para determinar el contenido de humedad en la carne se realizó el método gravimétrico por secado en estufa de vacío. Para esta técnica se pesó una muestra de 5 g de carne en un plato de humedad de aluminio con una tapa deslizante previamente llevada a peso constante. Posteriormente se secó la muestra hasta peso constante en una estufa de vacío llevada a 60 °C y a una presión de 100 mm de Hg, como se observa en la figura 4.4. Luego la muestra se dejó enfriar en un horno de secado al vacío durante 30 min y se pesó. Se logró un peso constante cuando los períodos de secado sucesivos de 1 h mostraron una pérdida adicional de peso de  $\leq 0.05\%$ . El porcentaje de pérdida de peso es informado como humedad y materia volátil. Este procedimiento se realizó por triplicado. El contenido de humedad y material volátil de la carne fue de un  $73\% \pm 0.98\%$ , valor cercano a lo que indica la literatura, de acuerdo con López-Bote, (2017) este valor es de aproximadamente 75%.



**Figura 4.4** Muestras de carne secadas en horno al vacío y a 60°C.

#### 4.3.2 Contenido total de lípidos

El contenido total de lípidos se realizó por el método de extracción y cuantificación de Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957. Se pesó una muestra de 1 g por triplicado en tubos de vidrio con tapa de rosca de 30 mL. Después se le agregó la solución de cloroformo con metanol (2:1) hasta llegar a un volumen de 20 mL previamente marcado en los tubos. Una vez agregada la solución hasta la marca de 20 mL, se agitó la mezcla con ayuda de un vortex durante 1 min. La mezcla luego se filtró en papel filtro Whatman no. 1, al filtrado se le agregó 1 mL de agua destilada y se agitó nuevamente con ayuda del vortex hasta observar una mezcla uniforme. La mezcla se dejó reposar durante 5 min hasta que se observó la formación de dos fases, la fase superior se descartó y la fase inferior, que es donde se encuentran las grasas, se colocó en un matraz bola previamente llevada

a peso constante. Posteriormente se colocó el matraz con la muestra en un rotavapor para separar el disolvente de las grasas por evaporación a una temperatura de 50 °C y al vacío. Después de evaporación, se colocó el matraz bola que contiene las grasas en un desecador al vacío y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se pesó el matraz para conocer el contenido de grasa de la muestra.

El contenido de grasa fue de 1.35% ± 0.35%, valor por debajo a lo reportado en la literatura, que de acuerdo con López-Bote, (2017) es de 2.5%. Quizá esto se deba a que se eliminó todo el tejido adiposo o gran parte de él, dejando únicamente el tejido muscular.

#### **4.5 Protocolo para medir oxidación de la carne**

##### 4.5.1 productos de oxidación primaria

Para medir la concentración de productos de oxidación primaria en la carne, se utilizó una técnica de cuantificación de hidroperóxidos por el método de oxidación ferrosa/naranja de Xilenol (FOX) descrita por Hermes-Lima, (1995), la cual se basa en la oxidación de Fe(II) por los hidroperóxidos en un medio con pH ácido y en presencia del colorante complejante de Fe(III), naranja de xilenol (XO) (ecuaciones 20 y 21) que absorbe fuertemente la luz, entre 540-600 nm.



Sin embargo, existe una influencia del pH en la absorbancia del complejo Fe-XO, de acuerdo con Gay, y otros., (1999) para desarrollar el máximo color, cada ácido requiere un pH óptimo, para el ácido sulfúrico acuoso el pH óptimo se encuentra en un rango de 1.7 a 1.8. Incluso en un trabajo reportado por Gay & Gebicki, (2002) encontraron que la concentración a la que se desarrolla la coloración máxima es a 36 mM de ácido sulfúrico,

distinta a la metodología descrita por Hermes-Lima, (1995) donde la concentración de ácido sulfúrico descrita es de 25 mM

#### 4.5.1.1 *Construcción de la curva patrón (VP)*

En tubos de vidrio de 10 mL con tapa de rosca se agregaron 1.9 mL de la solución de naranja de xilenol a cada uno. La solución de naranja de xilenol estaba compuesta de los los siguientes reactivos: 1.2 mL de metanol grado HPLC, 0.5 mL de una solución de 0.25 mM de sulfato amónico ferroso disuelto en ácido sulfúrico 36 mM y y 0.2 mL de naranja de xilenol a una concentración de 0.1mM en metanol. A cada tubo se le agregó 0.1mL de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con concentraciones que fueron de 2 µM hasta 10µM, con el objetivo de construir una curva estándar, y poder calcular la concentración de peróxidos en las muestras. Después se dejaron reaccionar durante 30 minutos en un cuarto oscuro y se midieron sus absorbancias a 560 nm en un espectrofotómetro de la marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S UV-Vis.

En esta técnica se decidió utilizar 36 mM de ácido sulfúrico en lugar de 25 mM que es lo que se indica en el procedimiento descrito por Hermes-Lima, (1995), esto debido a las observaciones dadas por Gay & Gebicki, (2002) donde reportan que la concentración final de ácido sulfúrico de 25 mM en medios acuosos, no garantiza que el pH se mantenga en el rango óptimo para desarrollar la máxima coloración, sobretodo en presencia de muestras de origen biológico, mientras que una concentración de ácido sulfúrico de 36 mM parece ser más apropiada para mantener el pH en el rango óptimo. Para comprobar estas observaciones, se elaboraron dos curvas estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes concentraciones de ácido sulfúrico. una se elaboró a una concentración de 25 mM y la otra a una concentración de 36 mM y se midieron sus absorbancias en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S UV-Vis.

Los resultados de comparar el desarrollo de la coloración máxima a 560 nm de dos curvas estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a distintas concentraciones de ácido sulfúrico (25mM y 36mM), se muestran en el anexo 1. Se puede observar que las absorbancias medidas en medio ácido a 36 mM son ligeramente mayores a las medidas a 25 mM, esto confirma que se desarrolla la máxima coloración a una concentración de 36 mM en lugar de 25 mM, por lo tanto, se tomó como referencia la curva estándar de 36 mM para cuantificar el valor de hidroperóxidos en las muestras de carne.

El análisis de regresión lineal nos muestra que los datos medidos en la curva de calibración se ajustan al modelo lineal en un 99.6% dado por el coeficiente de determinación R<sup>2</sup>, por lo tanto fue posible cuantificar los hidroperóxidos presentes en las muestras con esta técnica y a partir de la curva estándar mostrada en la gráfica 5.2 del anexo 1.

#### *4.5.1.2 procedimiento para medir peróxidos en las muestras*

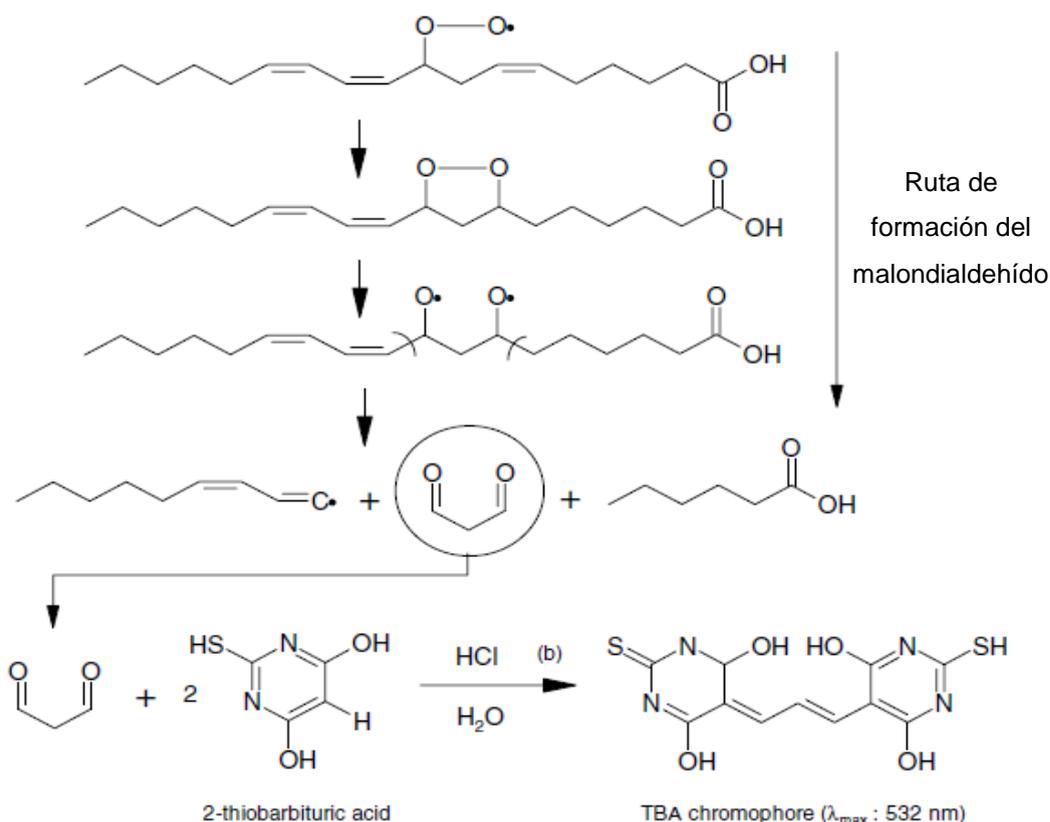
Para esta técnica se pesó una muestra de 3 g de carne en un tubo falcon de 50 mL, por triplicado y para cada tratamiento incluyedo , posteriormente se le agregaron 15 mL de metanol a 4 °C grado HPLC y se agitó con ayuda de un vórtex durante 30 segundos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 4 °C y a 3000 rpm durante 4 minutos y se tomaron 100 µL de sobrenadante colocándolo en un tubo de vidrio de 10 mL que contenía 1.9 mL de la solución de naranja de xilenol compuesta por: 1.2 mL de metanol grado HPLC, 0.5 mL de una solución de 0.25mM de sulfato amónico ferroso disuelto en ácido sulfúrico 36 mM y y 0.2 mL de naranja de xilenol a una concentración de 0.1mM en metanol. Se dejó reaccionar por 15 minutos en un cuarto oscuro y posteriormente se midieron las absorbancias a 560 nm. Los resultados se reportaron como µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equivalentes, comparándola con la curva estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 4.5** Cambios de color producidos en la prueba FOX para medir valor de peróxidos.

#### 4.5.2 Productos de oxidación secundaria

Para esta prueba se utilizó el método de extracción del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) descrita por Salih, y otros., (1987) y Witte, y otros., (2006), la cual consiste en la reacción de ácido tiobarbitúrico (TBA) con malondialdehído (MDA), para formar un cromóforo rojo con un pico de absorbancia a 532 nm. El MDA es un dialdehído de tres carbonos, producido a través de la descomposición de los hidroperóxidos formados a partir de ácidos grasos poliinsaturados, se le considera un producto de oxidación secundaria. El complejo coloreado de MDA y TBA es el resultado de la condensación de 2 moles de TBA y 1 mol de malondialdehído (Fig. 4.6), bajo el efecto conjunto de la temperatura del medio y el pH. TBA se define como la cantidad de malondialdehído (en mg) presente en 1 kg de muestra.



**Fig. 4.6** Vía de formación de malondialdehído a partir del radical peroxilo de ácido graso C18 triinsaturado (a) y formación de cromóforo de TBA a partir de TBA y malondialdehído(b).

Recuperado de Laguerre et. al., 2007.

Se seleccionó esta técnica debido a la facilidad y rapidez de procesar un gran número de muestras que ha mostrado esta técnica frente a otras, como el método de destilación. Adicionalmente produce menos ruido o turbidez en el filtrado al procesar muestras de carne con bajos porcentajes de grasa (%5<), como la carne de res, y al no utilizar altas temperaturas, se producen menos reacciones que puedan seguir descomponiendo a los hidroperóxidos presentes en las muestras (Salih y otros, 1987).

#### 4.5.2.1 Construcción de la curva patrón (MDA)

En esta prueba se utilizó 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) como precursor de MDA. Para esto se tomaron tubos de vidrio de 25 mL cada uno con tapa de rosca. A cada tubo se le agregaron 5 mL de una solución de ácido tiobarbiturico 0.005M. Posteriormente se preparó una solución estándar de TEP a una concentración de  $1 \times 10^{-8}$  mol/mL, a partir de la cual se tomaron

volúmenes para construir la curva patrón a concentraciones que iban desde  $1 \times 10^{-8}$  hasta  $5 \times 10^{-8}$  moles en 5mL, los cuales fueron agregados a los tubos que contenían 5mL de ácido tiobarbitúrico 0.005M. Se dejaron reaccionar durante 18 h en la oscuridad y se midieron sus absorbancias a 532nm.

La curva estándar de MDA, construida a partir de 1,1,3,3-Tetraetoxipropano se puede observar en la gráfica 5.3 en el anexo 1.

El análisis de regresión lineal nos muestra que los datos medidos en la curva de calibración se ajustan a la curva de regresión en un 99.7% dado por el coeficiente de determinación  $R^2$ , por lo tanto, la predicción con esta técnica tiene un porcentaje del 99.7%.

#### *4.5.2.2 Procedimiento para medir MDA en las muestras*

Para esto se pesó una muestra de 5 g de carne y se colocó en un vaso de licuadora de vidrio. Posteriormente se le agregó 35mL de una solución de extracción de ácido tricloroacético (TCA) al 5% y ácido fosfórico 2M, la mezcla se licuó durante 2 minutos hasta observar una mezcla homogénea. Una vez obtenida la mezcla, esta se filtró a través de papel filtro Whatman número 1, se tomó una alícuota de 5 mL del filtrado y se colocó en un tubo de vidrio de 30 mL con tapa que contenía 5 mL de una solución de ácido tiobarbitúrico 0.005M y se dejó reaccionar en la oscuridad durante 18 h a temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 532 nm frente a un blanco que contenía 5 mL de agua destilada y 5 mL de solución de TBA 0.005 M.

Para calcular la cantidad de MDA en la muestra, se multiplicó la absorbancia por el valor del coeficiente de extracción ( $K_{ext}$ ), el cual se calculó a partir de curvas estándar y diluciones conocidas de la siguiente manera:

$$K_{ext} = \frac{S}{A} \times 72.063 \times \frac{10^6}{E} \times \frac{100}{P}$$

Donde  $S$  es la concentración estándar de MDA realizada a partir de la reacción de 5 mL de una solución de  $1 \times 10^{-8}$  moles de 1,1,3,3-Tetraetoxipropano con 5 mL de una solución de ácido tiobarbitúrico 0.005M.  $A$  es la absorbancia del estándar de MDA. El valor de 72.063 es el peso molecular del MDA.  $E$  es el equivalente de la muestra, el cual su valor, para una muestra de 5 g, fue de 0.56 (5 g diluidos en 45 mL de TCA y 5 mL analizados).  $P$  es el porcentaje de recuperación, la cual a la misma concentración de estándar añadido a muestras de carne fue del 92.5%. Estas constantes dieron como resultado un valor  $K_{ext}$  de 6.13. Por lo tanto, los valores de TBA en las condiciones utilizadas se calcularon multiplicando la absorbancia por 6.13. Los valores de TBA se expresaron como mg de malondialdehído por Kilogramo de muestra (mg MDA/Kg).



**Figura 4.6** Tubos protegidos de la luz, para realizar prueba de TBARS.

#### 4.6 Análisis Estadísticos

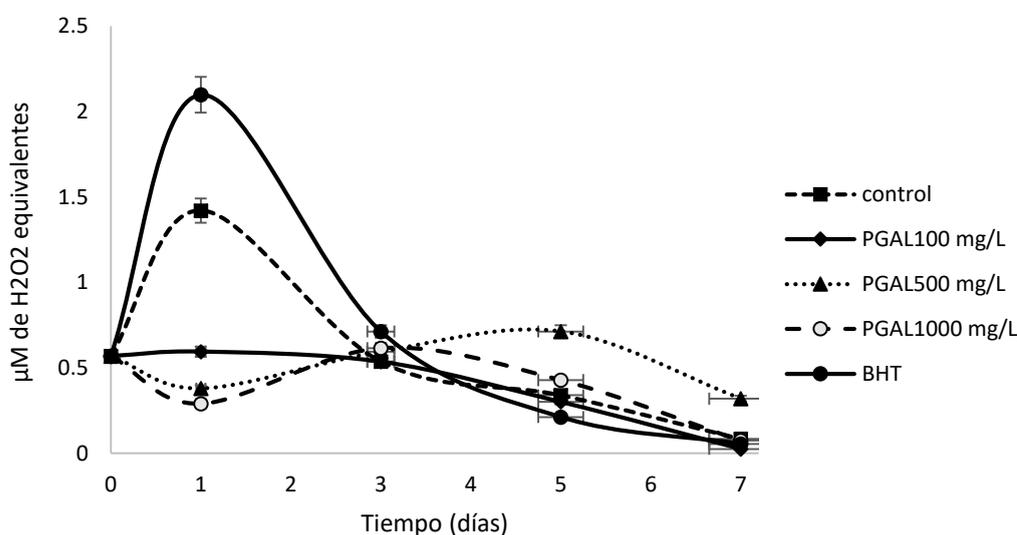
Los resultados de las mediciones de compuestos de oxidación primaria y secundaria se presentaron como el valor medio  $\pm$  DE (desviación estándar). Los datos fueron procesados por análisis de varianza de una vía o de un solo factor (ANOVA). Los promedios se compararon mediante la prueba de

Fisher y la prueba t, considerando el nivel de significancia del 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando el programa Minitab versión 11 (StatSoft, EE. UU.)

## 5. Resultados

### 5.1 Efecto antioxidante del PGAL en la carne sumergida en solución

El valor inicial de peróxidos fue el mismo para todos los tratamientos, debido a que se tomaron muestras de carne de cada uno y se homogenizaron, siendo éste un valor de 0.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  equivalentes, lo que indica que la carne tenía un proceso de descomposición inicial. Los resultados se muestran en la gráfica 5.4. En la tabla 5.1 y 5.2 del anexo 2, se resumen las diferencias estadísticas por día y por tratamiento para las pruebas de VP y TBARS.



**Gráfica 5.4** Valor de peróxidos, expresados como  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de cada tratamiento durante los 7 días de prueba.

En el primer día de almacenamiento se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en los valores de peróxidos de la muestra control y la muestra tratada con BHT, siendo además significativamente mayores a las medias de las muestras tratadas con PGAL. Una posible explicación a este comportamiento es que el BHT pudo tener un efecto pro oxidante, viéndose reflejado en el incremento de la concentración media del valor de peróxidos en el día 1, sin embargo la media de la muestra tratada con BHT no fue estadísticamente diferente a la media de la muestra control, por lo tanto es

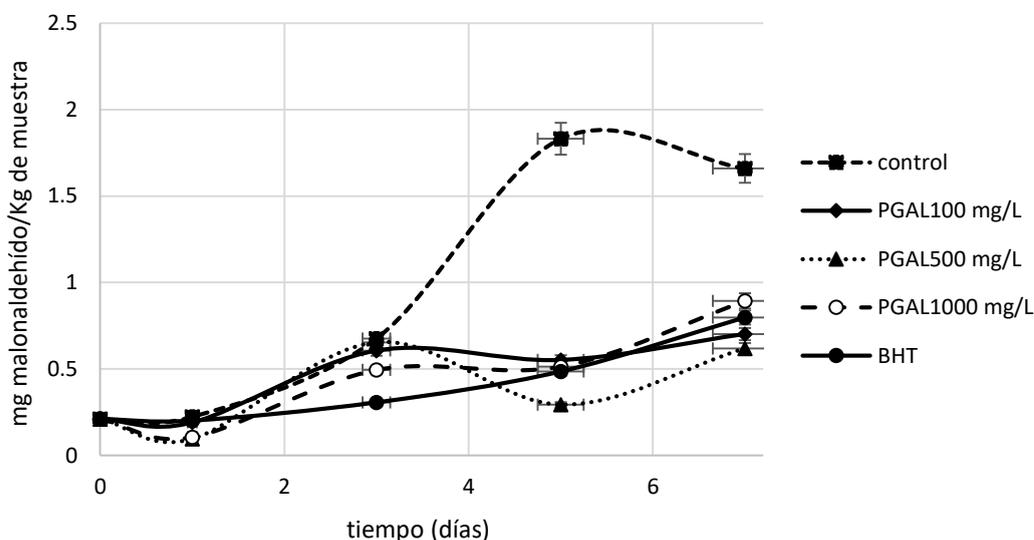
más probable que este comportamiento pueda deberse a la dificultad del BHT en disolverse o actuar directamente en la muestra, dado que no es soluble en agua, lo cual limita su actividad antioxidante.

Las muestras de carne sumergidas en solución de PGAL a una concentración de 100 mg/L y 500 mg/L no tuvieron diferencias estadísticas significativas con respecto a las muestras control en el primer día de prueba, sin embargo las muestras sumergidas en PGAL a una concentración de 1000 mg/L, mostraron una media significativamente menor a la media de las muestras control, lo que indica que a mayor concentración de PGAL, mayor será su actividad antioxidante, es decir que la concentración de PGAL es significativa en los primeros tres días de prueba y desplazan la degradación del peróxido a partir del tercer día de prueba, es decir la retrasan y la atenúan en comparación con las muestras de BHT y control.

La media de las muestras tratadas con PGAL (100, 500 y 1000 mg/L) se mantuvieron sin variaciones significativas ( $p < 0.05$ ) durante los 7 días de prueba en comparación a las muestras tratadas con BHT y las muestras control, las cuales mostraron los valores significativamente más altos en el primer día de prueba, como se observa en la tabla 5.1. Esto demuestra la actividad antioxidante del PGAL en la carne, cuando se encuentra en solución acuosa, la cual mantiene los valores de peróxidos estables. A partir del tercer día de prueba se puede observar una reducción significativa en el valor de peróxidos de las muestras control y las muestras tratadas con BHT, esto es debido a que los hidroperóxidos son inestables después de su formación y es posible que estuvieran presentes iniciadores de reacción en las muestras de carne, que son capaces de descomponer los hidroperóxidos.

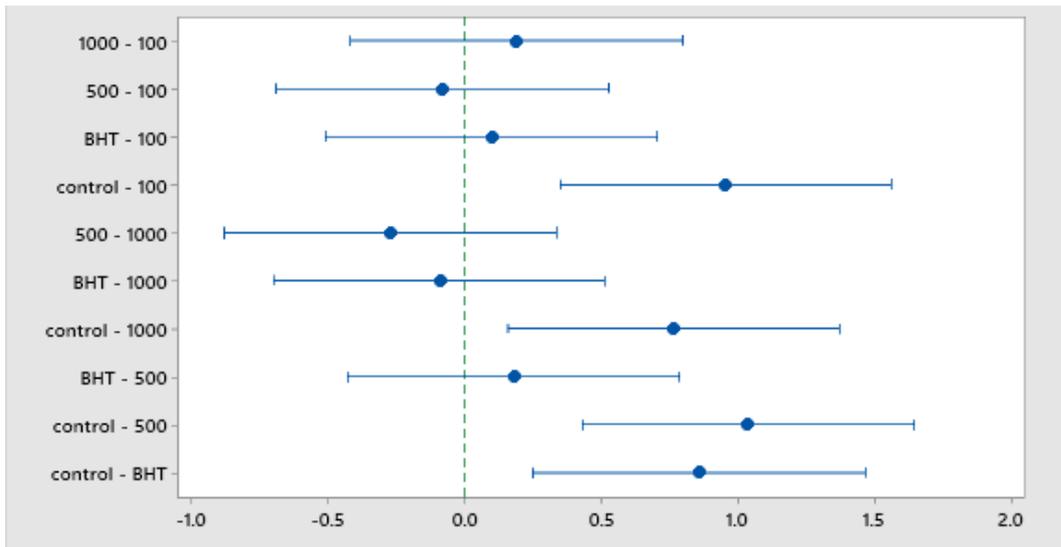
En cuanto al valor de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el día 0 se tomaron muestras de todos los tratamientos, incluida la muestra control, se homogenizaron para obtener la media de TBARS representativa de todos los tratamientos, este valor fue de 0.21 mg MDA

por Kg de muestra, lo que indica que la carne ya tenía un proceso de oxidación lipídica antes de la prueba. Los valores obtenidos de las mediciones de TBARS se encuentran representados en la gráfica 5.6



**Gráfica 5.6** Concentración de Substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresadas como mg malonaldehído/Kg de muestra mostradas durante los 7 días de prueba.

Durante los primeros 3 días de prueba no se observaron diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tratamientos, a excepción de las muestras tratadas con BHT, como se observa en la tabla 5.2. En el quinto y séptimo día de la prueba se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la media de las muestras control con respecto a las muestras tratadas con PGAL y BHT, lo que indica que hubo un efecto antioxidante por parte del PGAL y el BHT, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre la media de las muestras tratadas con PGAL (100, 500 y 1000 mg/L) y las muestras tratadas con BHT en el séptimo día de prueba, como se observa en la gráfica 5.7, lo que indica que para esta prueba, la actividad antioxidante, tanto del PGAL como del BHT mantienen los valores de TBARS estables o por debajo de las muestras control.

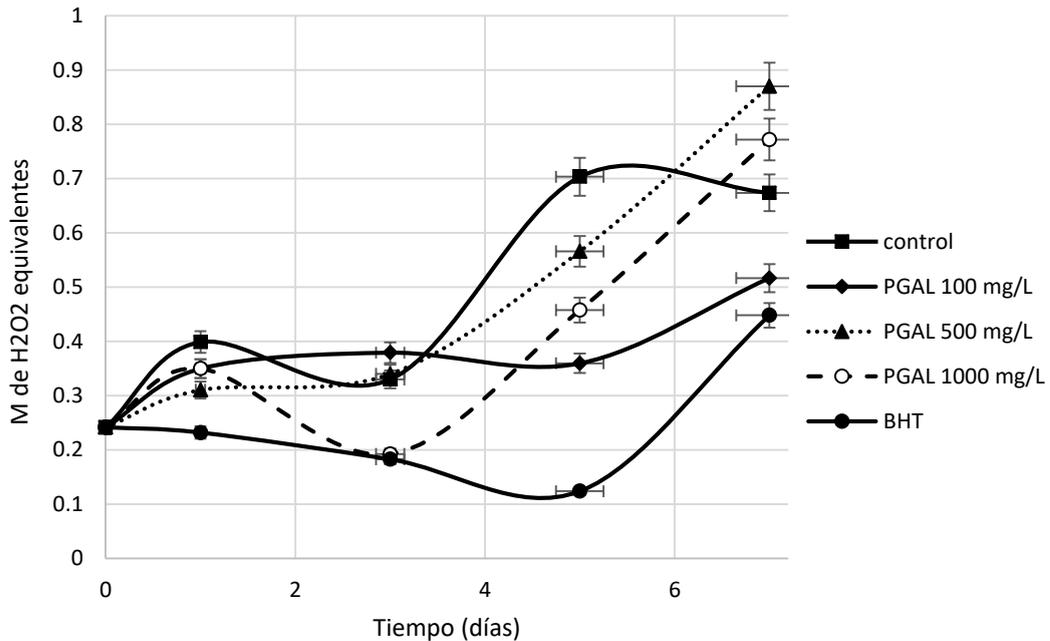


**Gráfica 5.7** Intervalos de Confianza Simultáneos individuales de 95% por prueba de Fisher en el séptimo día de prueba. Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

Comparando las medias de cada tratamiento con respecto a los días de prueba, se encontró que las muestras tratadas con PGAL a una concentración de 500 mg/L mostraron mayor variación en sus valores de peróxidos, en comparación al resto de los tratamientos, como se observa en la gráfica 5.6 y en la tabla 5.2. En las muestras tratadas con BHT también se observó un incremento significativo en el valor de TBARS a partir del día 3 de prueba. Las muestras tratadas con PGAL también mostraron diferencias significativas entre los días de prueba, sin embargo las muestras tratadas con PGAL a una concentración de 100 mg/L no mostraron diferencias significativas entre los días de prueba. En el caso de las muestras tratadas a una concentración de 500 mg/L Y 1000 mg/L mostraron un aumento significativo en el valor promedio de TBARS siendo más notorio en el día 7 de prueba. A pesar de este incremento, los valores de TBARS se mantuvieron significativamente por debajo de la media de la muestra control, lo que indica que el tratamiento con PGAL tuvo un efecto significativo en los valores de TBARS, comprobando así su efecto antioxidante.

## 5.2 Efecto antioxidante en la carne molida

Se realizó un segundo experimento para comprobar si existe una diferencia en el efecto antioxidante cuando se homogeniza directamente el antioxidante con la muestra. Bajo las mismas condiciones que en el primer experimento, se obtuvieron los siguientes resultados:



**Gráfica 5.8** Concentración de Hidroperóxidos expresados como  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la carne molida mostradas durante los 7 días de prueba.

El valor inicial de peróxidos de todas las muestras fue de  $0.242 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  lo que indica que la carne tenía un proceso temprano oxidativo de la carne. Esto se comprueba al comparar este valor con el valor de peróxidos del experimento 1 en el día 0, siendo mayor en el experimento 1 con un valor de  $0.57 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  equivalentes en comparación.

En la gráfica 5.8 se puede observar una fase de latencia desde el día 0 hasta el día 3 en el caso de las muestras control y la carne tratada con PGAL a una concentración de  $500 \text{ mg/Kg}$ , en el resto de las muestras esta fase se extendió hasta el día 5. Esto puede comprobarse de acuerdo a los análisis estadísticos mostrados en la tabla 5.3 del anexo 3, comparando

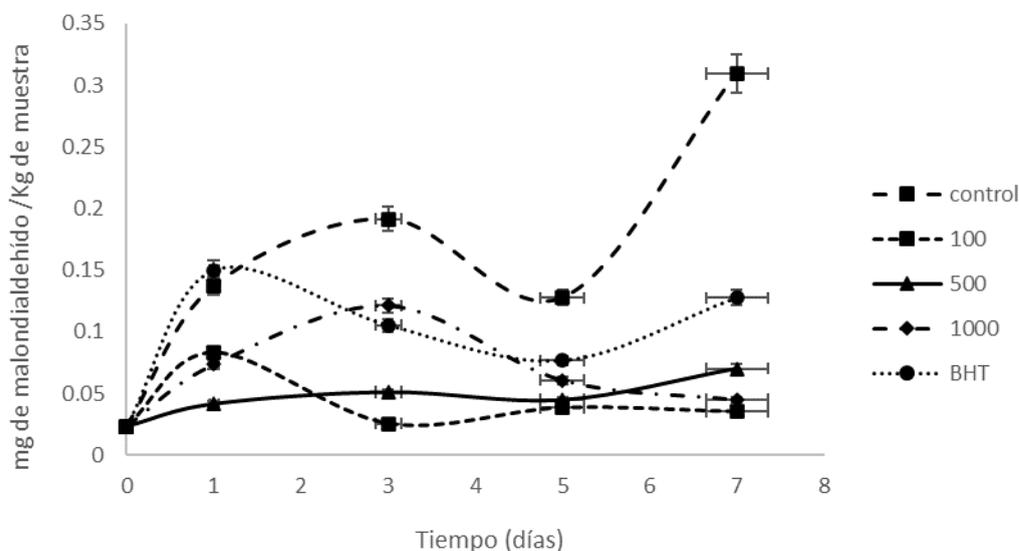
diferencias estadísticas significativas entre los días de prueba en cada uno de los tratamientos. Este comportamiento coincide con lo reportado por Decker y otros., 2005, donde se menciona que el deterioro oxidativo de la carne se ve retrasado, debido a la presencia de antioxidantes endógenos en las muestras de carne molidas teniendo un incremento significativo a partir del día 5.

A pesar de que los tratamientos mostraron una fase de latencia, las muestras tratadas con BHT mostraron los valores significativamente más bajos de peróxidos de todos los tratamientos, durante los 7 días de prueba. Esto demuestra la actividad antioxidante del BHT en prevenir la formación de compuestos de oxidación primaria y la eficacia antioxidante preventiva del BHT frente al PGAL cuando se aplica en carne molida. Comparando este resultado con los obtenidos en el experimento 1, se observa que el BHT tiene un mayor efecto antioxidante cuando se homogeniza directamente con la muestra molida a diferencia de cuando se aplica en solución.

Ahora bien, no hubo diferencias significativas entre las muestras tratadas con PGAL y las muestras tratadas con BHT en el primer día de prueba, las diferencias comenzaron a notarse a partir del tercer día de prueba, a excepción de la muestra tratada con PGAL a una concentración de 1000 mg/Kg. De acuerdo con estas observaciones, se puede demostrar que la actividad antioxidante del PGAL se ve afectada por su concentración, mientras que en los primeros días de prueba previenen o retrasan la autooxidación lipídica, previniendo la formación de hidroperóxidos, en los siguientes días funcionan como pro oxidantes, incrementando la cantidad de hidroperóxidos en la carne y esta es más notoria conforme incrementa la concentración de PGAL en la muestra y los valores se mantienen estables a menor concentración de PGAL. Además esto demuestra el efecto de la forma de la carne sobre la difusión del antioxidante tanto del PGAL como del BHT, ya que en la prueba 1 se vio el efecto contrario mostrado en la gráfica 5.4.

El mecanismo preventivo es más notorio en las muestras tratadas con BHT, porque su valor de peróxidos se mantiene por debajo del valor de las muestras control, sin embargo en el séptimo día este valor incrementa significativamente, lo cual puede ser un indicador de un efecto prooxidante, que trae como consecuencia un incremento en la cantidad de hidroperóxidos en la muestra.

Los resultados obtenidos en la medición de TBARS se muestran en la gráfica 5.8. Los valores de TBARS en el día 0 fueron de 0.023 mg de MDA/Kg de muestra, lo que indica que la carne no tenía un proceso de oxidación lipídica avanzado o este se encontraba en su etapa inicial, lo cual se puede comprobar al comparar este valor con el obtenido en el experimento 1, siendo mayor en este con un valor de 0.21 mg de MDA/Kg de muestra en comparación.



**Gráfica 5.9** Concentración de Substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en la carne molida, expresadas como mg de malonaldehído/Kg de muestra mostradas durante los 7 días de prueba.

El tratamiento con PGAL a 500 mg/kg de muestra, fue el único que mostró valores de TBARS significativamente ( $p < 0.05$ ) por debajo de la media de

las muestras control durante los 7 días de prueba como se observa en la gráfica 5.8. Los valores de TBARS en las muestras tratadas con BHT tuvieron un comportamiento similar al reportado por Zahid , y otros, 2019, manteniéndose sin variaciones significativas, a partir del primer día de prueba, e incluso retrasaron la formación de compuestos de oxidación secundaria. Este comportamiento también puede observarse con las muestras tratadas con PGAL a una concentración de 100 mg/kg.

En el primer día de prueba se observa un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el valor de TBARS de todos los tratamientos, a excepción de la muestra tratada con PGAL a una concentración de 500 mg/kg. En este mismo día, la media de la muestra tratada con BHT fue significativamente mayor a las muestras tratadas con PGAL, lo que confirma el mecanismo antioxidante preventivo del BHT el cual es más evidente en los primeros días de prueba. Al descomponer los hidroperóxidos es más probable que se incremente la cantidad de compuestos de oxidación secundaria en la muestra y por lo tanto incrementa la concentración de MDA. Incluso en el tercer día de prueba se mantiene significativamente por arriba de la media de las muestras de PGAL a 500 mg/kg y 100 mg/kg. El PGAL también actúa mediante el mecanismo antioxidante preventivo, solo cuando se aplica a altas concentraciones en la carne, puede promover la descomposición de hidroperóxidos e incrementar al mismo tiempo la concentración de MDA en la muestra. Esto se ve demostrado por el incremento significativo de la media de TBARS en la muestra tratada con PGAL a una concentración de 1000 mg/kg en el tercer día de prueba, la cual coincide con la reducción significativa en el valor de peróxidos de esta misma muestra, en el mismo día.

A partir del quinto día de prueba, tanto las muestras tratadas con PGAL como las muestras tratadas con BHT, mantuvieron su valor de TBARS significativamente por debajo de la muestra control (ver gráfica 5.9), resultado de la actividad antioxidante de ambos, al inactivar los radicales libres lipídicos en la carne se promueve la formación de hidroperóxidos, en consecuencia se reduce la concentración de MDA en la muestra. Incluso

este comportamiento coincide con el incremento en el valor de peróxidos a partir del quinto día de prueba, tanto en las muestras tratadas con PGAL como las muestras tratadas con BHT, como se observa en la gráfica 5.8. Aunque es más notorio en las muestras tratadas con PGAL, dado que los valores de TBARS de las muestras tratadas con PGAL a una concentración de 500 y 100 mg/Kg de muestra, se mantuvieron significativamente por debajo de los valores de TBARS de la muestra control durante los 7 días de prueba.

Estos resultados demuestran que la formación de peróxidos y de TBARS depende de la forma en que se apliquen los antioxidantes a la carne y de la carga o naturaleza del antioxidante. Por un lado las cadenas poliméricas de PGAL tienen la característica de ser multirradical y polianiónica, que le permiten ser solubles en agua. Al aplicarse directamente en filetes de carne, estas se mantienen cerca de su superficie, puesto que tienen una mayor afinidad por las paredes celulares de fosfolípidos que mantienen la región polar de las moléculas en el exterior de la pared celular, permitiendo que las cadenas de polímero se mantengan más cerca de ellas. Por este motivo mantienen estables la formación de hidroperóxidos, en los primeros días de prueba. Esto dio como resultado una reducción y menor producción de compuestos de oxidación secundaria, como se observa en la gráfica 5.9, para todas las muestras tratadas con PGAL. Por otro lado, el BHT difícilmente tendrá actividad antioxidante al aplicarse directamente a la carne en solución acuosa, por lo menos durante los primeros días, debido a que no es soluble en agua. No obstante, al aplicarse directamente en la carne molida, se notará mejor su actividad antioxidante al no estar presente el agua en mayor proporción, que le impida o limite su difusión en la muestra.

## 6. Conclusiones

1. En ambos experimentos, tanto en la carne molida, como en la carne fileteada, se pudo comprobar el efecto antioxidante del PGAL. Sin embargo es necesario hacer mediciones más precisas, para conocer concentraciones más exactas, como las técnicas de cromatografía líquida o de gases. Sin embargo este trabajo da un panorama amplio y un punto de partida para futuros trabajos.
2. Se presenta el análisis sobre el nivel de oxidación lipídica en la carne al estar tratada o expuesta frente a un antioxidante con características naturales y sintéticas, comparando además la actividad antioxidante en solución acuosa con la carne sumergida y mezclada directamente en carne molida. En consecuencia, se obtiene un estudio que permite observar la actividad antioxidante del PGAL en la carne.
3. La actividad antioxidante del PGAL y del BHT son similares, varían dependiendo de la forma y la concentración en la que éstas son aplicadas a la carne. Cuando la carne se deja sumergida en solución acuosa con los antioxidantes, El PGAL atenúa y retrasa la formación de peróxidos en comparación con el BHT durante los primeros días de prueba. Cuando el antioxidante se aplica de forma homogénea en carne molida, el PGAL muestra un efecto prooxidante, es decir promueve la formación de hidroperóxidos, en comparación con el BHT que los retrasa.
4. El polímero de ácido gálico, demostró tener características antioxidantes que compiten con el antioxidante sintético BHT en carne de bovino, por lo que puede ser considerado como una alternativa al uso de antioxidantes sintéticos en la carne.

## Referencias

- Abbas, K. A., Jamilah, B., & Mohamed, A. (2009). Fatty acids in fish and beef and their nutritional values: A review. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7, 37-42.
- Ahn, D. U., Mendonça, A. F., & Feng, X. (2017). The Storage and Preservation of Meat: II-Nonthermal Technologies. En F. Toldrá, *Lawrie's Meat Science* (págs. 231-262). Iowa: Woodhead Publishing.
- Aidos, I., Lourenco, S., Van der Padt, A., Luten, J. B., & Boom, R. M. (2002). Stability of crude herring oil produced from fresh byproducts: influence of temperature during storage. *J Food Sci*(67), 3314–3320.
- Bender, A. (1992). Meat and meat products in human nutrition in developing countries. *FAO food and nutrition paper*, 1-91.
- Borch, E., Kant Muermans, M. L., & Blixt, Y. (Noviembre de 1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 103-120.
- Bush, R. K., & Taylor, S. L. (1998). Adverse reactions to food and drug additives. *Allergy: principles and practice*, 1183.
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G.-J., Villani, F., & Ercolini, D. (Febrero de 2015). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiology*, 45, 83-102.
- Cava, R., Ruiz, J., López-Bote, C., Martín, L., García, C., Ventanas, J., & Antequera, T. (1997). Influence of finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscles of the Iberian pig. *Meat Science*, 263-270.
- Chattopadhyay, M. K. (2003). Adverse effects of antioxidants. *Current Science*, 85, 121.
- COFEPRIS. (25 de Octubre de 2016). *Certificación de alimentos*. Recuperado el 22 de Abril de 2022, de <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/certificacion-de-alimentos-76095>
- COMECARNE. (2021). *Compendio Estadístico 2021 del Consejo Mexicano de la Carne*. Ciudad de México: CoMeCarne.

- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masaella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*, 43, 348-61.
- Decker, A. E., Warner, K., Richards, M. P., & Shahidi, F. (2005). Measuring Antioxidant Effectiveness in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4303-4310.
- Demeyer, D. I., Leory, F., & Toldrá, F. (2014). Fermentation. En W. Jensen, & M. Dikemann, *Encyclopedia of Meat Sciences* (2 ed., Vol. 2, págs. 1-7). London, UK: Elsevier Science Ltd.
- Devadason, I. P., Anjaneyulu, A., & Babji, Y. (2010). Effect of Different Binders on the Physico-Chemical, Textural, Histological, and Sensory Qualities of Retort Pouched Buffalo Meat Nuggets. *Journal of Food Science*, 75(1), S31-S35.
- Di Meo, F., Lemaur, V., Cornil, J., Lazzaroni, R., Duroux, J.-L., Olivier, Y., & Trouillas, P. (2013). Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols: Atom versus Electron Transfer. *J. Phys. Chem*, 117, 2082–2092.
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2019). A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products. *Antioxidants*, 429-460.
- Falowo, A. B., Fayemi, P. O., & Muchenje, V. (Octubre de 2014). Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 64, 171-181.
- Fatima, K., Masood, N., & Luqman, S. (2016). Quenching of singlet oxygen by natural and synthetic antioxidants and assessment of electronic UV/Visible absorption spectra for alleviating or enhancing the efficacy of photodynamic therapy. *Biomedical Research and Therapy*, 3(8), 514-527.
- Faucitano, L., Huff, P., Teuscher, F., Garipey, C., & Wegner, J. (2005). Application of computer image analysis to measure pork marbling characteristics. *Meat Science*, 537-543.
- Flores, J., & Toldrá, F. (1993). Curing: processes and applications. En R. Macrae, R. Robinson, M. Sadle, & G. Fullerlove, *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and* (págs. 1277-1282). London, UK: Academic Press.

- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Frankel, E. N. (2005). *Lipid Oxidation* (segunda ed.). California: Woodhead Publishing Limited.
- Gandemer, G. (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, 309-321.
- Gay, C. A., & Gebicki, J. M. (2002). Perchloric Acid Enhances Sensitivity and Reproducibility of the Ferric–Xylenol Orange Peroxide Assay. *Anal. Biochem.*, 42-46.
- Gay, C., Collins, J., & Gebicki, J. M. (1999). Determination of Iron in Solutions with the Ferric-Xylenol Orange Complex. *Analytical Biochemistry*, 143-148.
- Grau, R., Andrés, A., & Barat, J. M. (2015). Principles of drying. En F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasarán, J. G. Sebranek, & R. Talón, *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (second ed., págs. 31-38). Iowa, USA: Blackwell Pub.
- Gray, J. I., Gomaa, E. A., & Buckley, D. J. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43, 111-123.
- Hart, F. (1991). *Análisis moderno de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W. G., & Storey, K. B. (1995). QUANTIFICATION OF LIPID PEROXIDATION IN TISSUE EXTRACTS. *Free Radical Biology & Medicine*, 19(3), 271-280.
- Hiatt, R., Mill, T., Irwin, K. C., Mayo, T. R., Gould, C. W., & Castleman, J. K. (1968). Homolytic decomposition of hydroperoxides. *J Org Chem*(33), 1416-1441.
- Hsiao-Wen, H., Hsiang-Mei, L., Binghuei, B. Y., & Chung-Yi, W. (2014). Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*, 250-259.
- Huff-Lonergan, E., & M. Lonergan, S. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71(1), 194-204.
- Isaza Maya, Y. L., Restrepo Molina, D. A., & López Vargas, J. H. (2013). Oxidación Lipídica y antioxidantes naturales en derivados cárnicos. *Journal of Engineering and Technology*, 50-66.

- Karre, L., Lopez, K., & Getty, K. J. (2013). Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*, *94*, 220-227.
- Kerry, J. P., & Tyuftin, A. A. (2017). Storage and Preservation of Raw Meat and Muscle-Based Food Products: IV Storage and Packaging. En F. Toldrá, *Lawrie's Meat Science* (8 ed., págs. 297-327). Duxford: Woodhead Publishing.
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, *46*, 244-282.
- Lawrie, R. A., & Ledward, D. A. (2006). *Lawrie's Meat Science*. Cambridge, UK: Woodhead Pub.
- Ledward, D. A. (2003). MEAT | Preservation. En B. Caballero, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (págs. 3772-3776). USA: Academic Press.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffers, A. E., & Rietjens, I. M. (2001). The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*, *31*, 869-881.
- Liang, N., & Kitts, D. (2014). Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules*, *19*, 19180-19208.
- López, J., Hernández-Alcántara, J. M., Roquero, P., Montiel, C., Shirai, K., Gimeno, M., & Bázquez, E. (2013). Trametes versicolor laccase oxidation of gallic acid toward apolyconjugated semiconducting material. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 100-105.
- López-Bote, C. (2017). Chemical and Biochemical Constitution of Muscle. En F. Toldrá, *Lawrie's Meat Science* (págs. 99-158). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Lukic, M., Trbovic, D., Petronijevic, R., Djordjevic, V., Karan, D., Babic, J., & Petrovic, Z. (2019). Chemical composition and fatty acid profile of the longissimus dorsi muscle in Simmental bulls. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 1-6.
- Madsen, H. L., & Bertelsen, G. (1995). Spices as antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, *6*, 271-277.

- Min, B., & Ahn, D. U. (2005). Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products -A Review. *Food Science and Biotechnology*, 14, 152-163.
- Morrissey, P. A., & Tichvayana, J. Z. (1985). The antioxidant activities of nitrite and nitrosylmyoglobin in cooked meats. *Meat Science*, 175-190.
- Morrissey, P. A., Sheehy, P. J., Galvin, K., Kerry, J. P., & Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, S73-S68.
- Nair, M. S., Nair, D. V., Johny, A. K., & Venkitanarayanan, K. (2020). Use of food preservatives and additives in. En A. K. Biswas, & P. K. Mandal, *Meat Quality Analysis. Advanced Evaluation Methods, Techniques*, (págs. 187-213). London: Academic Press.
- Nam, K. C., Hur, S. J., Ismail, H., & Ahn, D. U. (2002). Lipid Oxidation, Volatiles, and Color Changes in Irradiated Raw Turkey Breast During Frozen Storage. *Journal of Food Science*, 67(6), 2061e2066.
- Norma Oficial Mexicana. (17 de Abril de 1996). Especificaciones y procedimientos para la verificación de carne, canales, vísceras y despojos de importacion en puntos de verificación Zoonanitaria. *NOM-030-ZOO-1995 Especificaciones y procedimientos para la verificación de carne, canales, vísceras y despojos de importacion en puntos de verificación Zoonanitaria*. Diario Oficial de la Fderación.
- Pegg, R. B., & Honikel, K. O. (2015). Principles of curing. En F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Asistasarán, J. G. Sebranek, R. Talon, & F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (segunda ed., págs. 19-30). Iowa, USA: Blackwell Pub.
- Pikul, J., Leszczynski, D. E., & Kummerow, F. A. (1989). Evaluation of Three Modified TBA Methods for Measuring Lipid Oxidation in Chicken Meat. *J. Agríc. Food Chem.*, 1309-1313.
- Purslow P., P. (2017). The Structure and Growth of Muscle. En T. Fidel, *Lawrie's Meat Science* (págs. 49-97). Cambridge: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Rahman, M. S., & Rerera, C. O. (2007). Drying and food preservation. En M. S. Rahman, *Handbook of Food Preservation* (págs. 403-432). Florida: Taylor & Francis Group.
- Ramanathan, R., Mafi, G. G., Yoder, L., Perry, M., Pfeiffer, M., VanOverbeke, D. L., & Maheswarappa, N. B. (2020). Biochemical changes of postmortem

- meat during the aging process and strategies to improve the meat quality. En A. K. Biswas, & P. K. Mandal, *Meat Quality Analysis* (págs. 67-80). London: Academic Press.
- Reddy, M. D., Reddy, V. B., & Mandal, P. K. (2018). Application of Natural Antioxidants in Meat and Meat Products-A Review. *Food and Nutrition*, 3(173), 1-12.
- Reis, A. S., Diedrich, C., Moura, C., Pereira, D., Almeida, J. F., Silva, L. D., . . . Carpes, S. T. (2017). Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at -15 oC. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 306-313.
- Reische, D., Lillard, D., & Eitenmiller, R. (1998). Antioxidants. En C. Akoh, & D. Min, *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. (págs. 423-448). Forth Worth, Texas, USA.: Marcel Dekker Inc.
- Rivalain, N., Roquain, J., & Demazeau, G. (2010). Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. *Biotechnology Advances*, 659-672.
- Romero-Montero, A., Gimeno, M., Farfán, N., & Labra-Vázquez, P. (2019). Enzymatic poly(gallic acid): A stable multiradical polyanion. *Journal of Molecular Structure*, 326-335.
- Romero-Montero, A., Tecante, A., García-Arrazola, R., Montiel, C., Del Valle, L., Puiggali, J., & Miquel, G. (2017). Growth of epithelial cells on films of enzymatically synthesized poly(gallic acid) crosslinked to carboxymethylcellulose. *RSC Adv*, 7, 17660-17669.
- Sahidi, F., & Zhong, Y. (2005). Antioxidants: Regulatory Status. En F. Sahidi, *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (págs. 491-512). John Wiley & Sons, Inc.
- Salih, A. M., Smith, D. M., Price, J. F., & Dawson, L. E. (1987). Modified Extraction 2-Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Oxidation in Poultry. *Poultry Science*, 66, 1483-1488.
- Salud, S. d. (11 de Julio de 2005). NOM-213-SSA1-2018, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a su proceso. *NORMA Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2018, Productos y*

*servicios. Productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a su proceso.* México: Diario Oficial de la Federación.

- Sánchez-Sánchez, R., Romero-Montero, A., Montiel, C., Melgarejo-Ramírez, Y., Sánchez-Ortega, C., Lugo-Martínez, H., . . . Gimeno, M. (2017). Cytoprotective effect of the enzyme-mediated polygallic acid on fibroblast cells under exposure of UV-irradiation. *Materials Science and Engineering C*(76), 417–424.
- Sanitarios, C. F. (25 de Octubre de 2016). Obtenido de Certificación de alimentos: <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/certificacion-de-alimentos-76095>
- Santhi, D., Kalaikannan, A., & Sureshkumar, S. (2017). Factors influencing meat emulsion properties and product texture: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(10), 2021-2027.
- Savell, W. J. (2017). The Structure and Growth of Muscle. En F. Toldrá, *Lawrie's Meat Science* (págs. 1-18). Cambridge: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Sebranek, J. G., Jackson-Davis, A. L., Myers, K. L., & Lavieri, N. A. (2012). Beyond celery and starter culture: advances in natural/organic curing processes in the United States. *Meat Science*, 267-273.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pequera. (2020). *Anuario Estadístico de la producción ganadera*. Ciudad de México: SIAP.
- Shahidi, F. (2015). Antioxidants: principles and applications. En F. Shahidi, *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (págs. 1-14). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem Soc Rev*, 39, 4067-79.
- Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2011). Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: A review. (W. P. Series, Ed.) *American Meat Science Association*, 3, 1-14.
- Soren, N., & Biswas, A. (2020). Methods for nutritional quality analysis. En A. Biswas, *Meat Quality Analysis* (págs. 21-34). United Kingdom: Academic Press.
- Toldrá, F. (2017). *Lawrie's Meat Science*. Duxford: Woodhead Publishing.

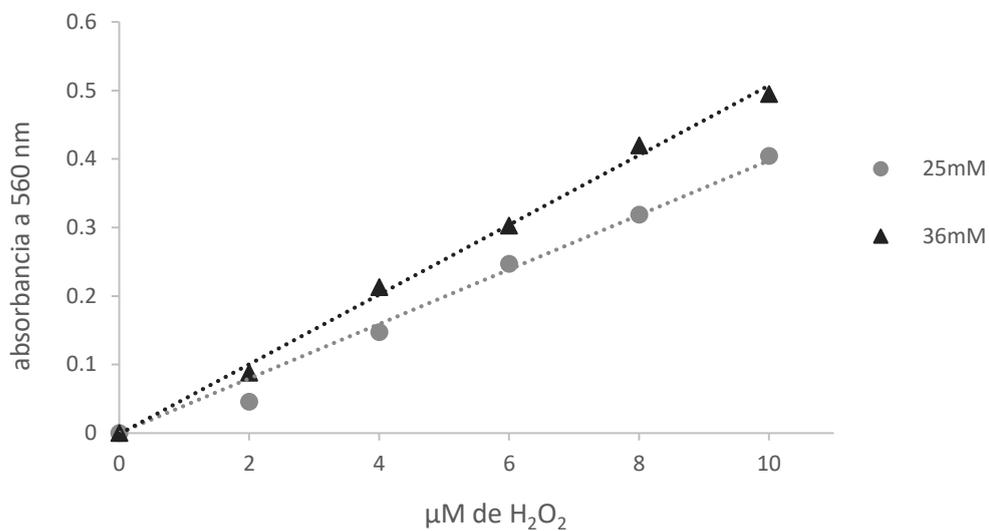
- Toldrá, F. (2017). The Storage and Preservation of Meat: III-Meat Processing. En F. Toldrá, *Lawrie's Meat Science* (págs. 265-296). Duxford: Woodhead Publishing.
- Vaithiyathan, S., Naveena, B. M., Muthukumar, M., Girish, P. S., & Kondaiah, N. (2011). Effect of dipping in pomegranate (*Punica granatum*) fruit juice phenolic solution on the shelf life of chicken meat under refrigerated storage (4 °C). *Meat Science*, 409-414.
- Van Dyck, S. (2010). The impact of singlet oxygen on lipid oxidation in foods. En E. A. Decker, *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications* (págs. 57-75). Witney: Woodhead Publishing.
- Vermeulen, A., Ragaert, P., Rajkovic, A., Samapundo, S., Lopez-Galvez, F., & Devlieghere, F. (2013). New research on modified atmosphere packaging and pathogen behaviour. En J. Sofos, *Advances in Microbial Food Safety* (págs. 340-354). UK: Woodhead Publishing Series in Food Science Technology and Nutrition.
- Warner, D. R. (2017). The Eating Quality of Meat—IV Water-Holding Capacity and Juiciness. En F. Toldrá, *Lawrie's Meat Science* (8 ed., págs. 419-459). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Wilkinson, F., Helman, W. P., & Ross, A. B. (1995). Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 24(2), 664-911.
- Witte, V. C., Krause, G. F., & Bailey, M. E. (2006). A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *Journal of Food Science*, 35(5), 582 - 585.
- Xiong, Y. L. (2017). The Storage and Preservation of Meat: I-Thermal Technologies. En F. Toldrá, & F. Toldrá (Ed.), *Lawrie's Meat Science* (octava ed., págs. 205-230). Duxford, Inglaterra: Woodhead Publishing.
- Yehye, W. A., Rahman, N. A., Ariffin, A., Abd Hamid, S., Alhadi, A., Kadir, F., & Yaeghoobi, M. (2015). Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 295-312.
- Zahid, M. A., Seo, J. K., Parvin, R., Ko, J., & Yang, H. S. (2019). Comparison of Butylated Hydroxytoluene, Ascorbic Acid, and Clove Extract as

Antioxidants in Fresh Beef Patties at Refrigerated Storage. *Food Sci Anim Resour*, 768–779.

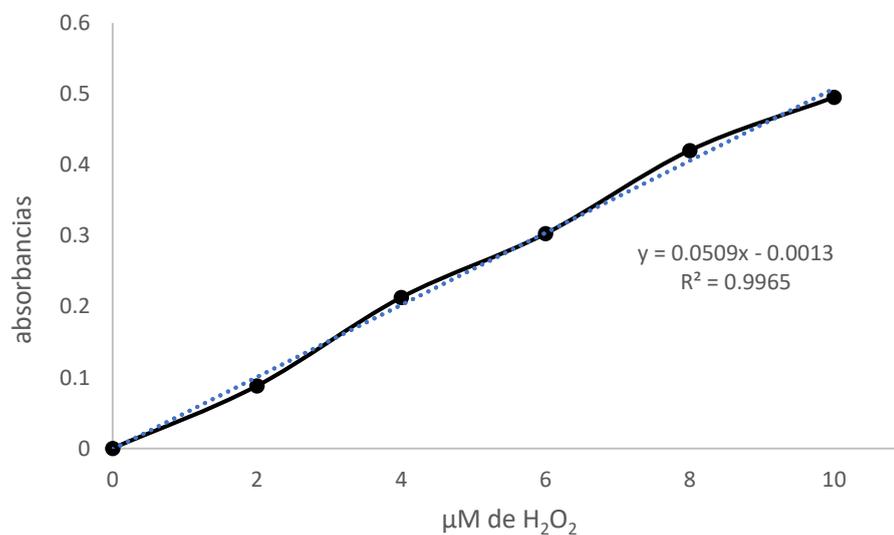
Zhou, G., Yang, A., & Tume, R. (1993). A relationship between bovine fat color and fatty-acid. *Meat Science*, 205-212.

# ANEXOS

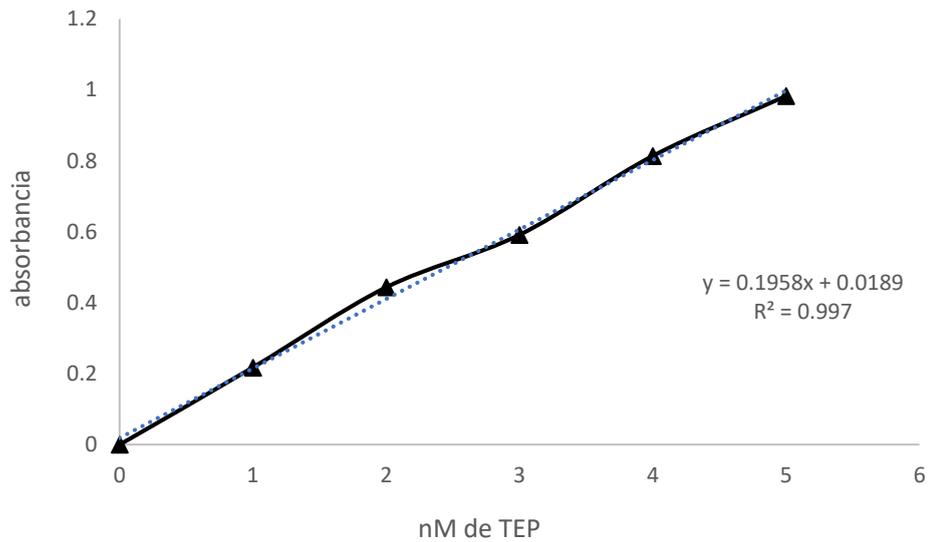
## Anexo 1 Resultados de la estandarización de las técnicas de medición



**Gráfica 5.1** Comparación de dos curvas de calibración a diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 25mM y 36mM.

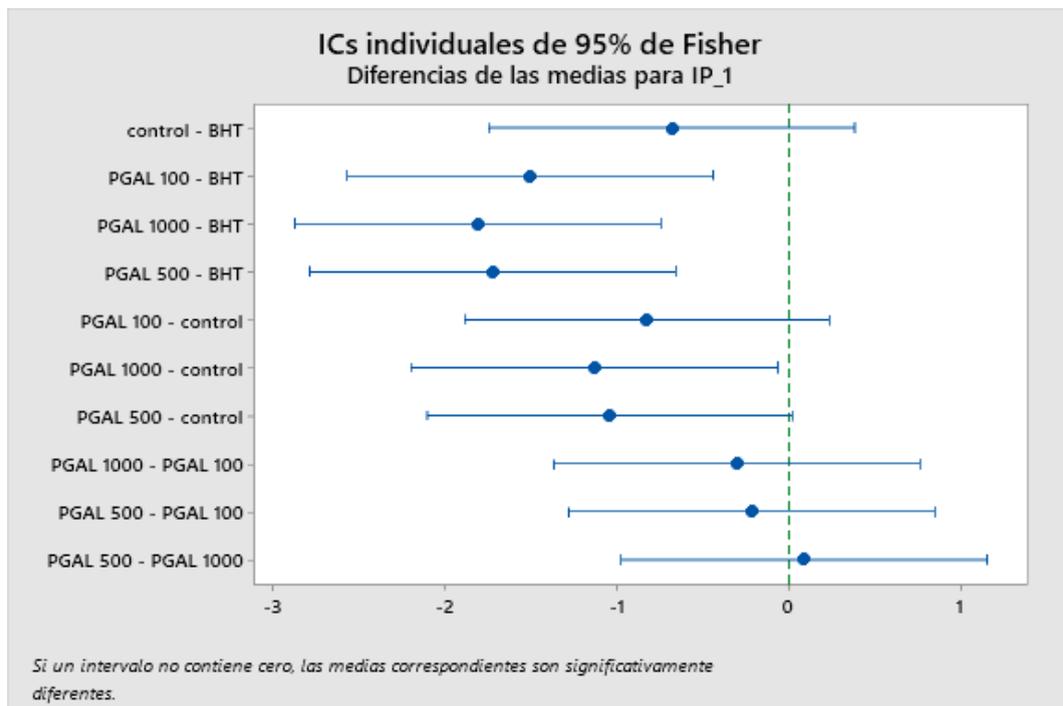


**Gráfica 5.2** Curva estándar de referencia en 36mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .



**Gráfica 5.3** Curva estándar de MDA en 36mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Anexo 2 gráficas y tablas sobre análisis estadísticos de resultados del procedimiento con las muestras sumergidas en los tratamientos



**Gráfica 5.5.** Intervalos de Confianza Simultáneos individuales de 95% de confianza por prueba de Fisher para el primer día de prueba. Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

**Tabla 5.1** Valores medios de Índice de peróxidos ( $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  equivalentes) en las muestras de carne durante su almacenamiento a 4 °C. Distintas letras minúsculas en la misma columna indican diferencia significativa ( $p<0.05$ ) por la prueba de Fisher. Letras mayúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencia significativa ( $p<0.05$ ) por la prueba de Fisher.

tratamientos	día 0	día 1	día 3	día 5	día 7
control	0.57 <sup>A</sup>	1.42±0.056 <sup>abB</sup>	0.54±0.1 <sup>aA</sup>	0.34±0.03 <sup>aA</sup>	0.085±0.056 <sup>aA</sup>
BHT 100 mg/L	0.57 <sup>BC</sup>	2.1±0.043 <sup>aA</sup>	0.54±0.056 <sup>abB</sup>	0.3±0.14 <sup>abC</sup>	0.026±0.001 <sup>aC</sup>
PGAL 100 mg/L	0.57 <sup>A</sup>	0.6±0.053 <sup>bcA</sup>	0.6±0.022 <sup>aA</sup>	0.71±0.25 <sup>aA</sup>	0.32±0.083 <sup>aA</sup>
PGAL 500 mg/L	0.57 <sup>A</sup>	0.38±0.01 <sup>bcA</sup>	0.615±0.14 <sup>aA</sup>	0.43±0.35 <sup>aa</sup>	0.075±0.014 <sup>ba</sup>
PGAL 1000 mg/L	0.57 <sup>A</sup>	0.3±0.03 <sup>ca</sup>	0.713±0.19 <sup>aA</sup>	0.21±0.07 <sup>aA</sup>	0.056±0.042 <sup>aA</sup>
promedio	0.21	0.96±0.077	0.6±0.07	0.4±0.19	0.11±0.011

**Tabla 5.2** Comparación entre las medias de TBARS en las muestras de carne durante su almacenamiento a 4 °C. Distintas letras minúsculas en la misma columna indican diferencia significativa ( $p<0.05$ ) por la prueba de Fisher. Letras mayúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencia significativa ( $p<0.05$ ) por la prueba de Fisher.

tratamientos	día 0	día 1	día 3	día 5	día 7
control	0.21 <sup>A</sup>	0.22±0.09 <sup>aA</sup>	0.68±0.014 <sup>aAB</sup>	1.83±0.75 <sup>aB</sup>	1.66±0.36 <sup>aB</sup>
BHT 100 mg/L	0.21 <sup>A</sup>	0.2±0.041 <sup>aA</sup>	0.31±0.01 <sup>bB</sup>	0.5±0.01 <sup>bB</sup>	0.8±0.009 <sup>bC</sup>
PGAL 100 mg/L	0.21 <sup>A</sup>	0.19±0.054 <sup>aA</sup>	0.61±0.045 <sup>abA</sup>	0.55±0.19 <sup>ba</sup>	0.7±0.027 <sup>ba</sup>
PGAL 500 mg/L	0.21 <sup>AB</sup>	0.096±0.019 <sup>aA</sup>	0.65±0.068 <sup>aC</sup>	0.29±0.054 <sup>bb</sup>	0.62±0.045 <sup>bC</sup>
PGAL 1000 mg/L	0.21 <sup>A</sup>	0.1±0.02 <sup>aA</sup>	0.49±0.068 <sup>abAB</sup>	0.51±0.24 <sup>baB</sup>	0.9±0.27 <sup>bb</sup>
promedio	0.21	0.16±0.052	0.55±0.14	0.73±0.05	0.93±0.03

Anexo 3 Gráficas y tablas sobre análisis estadísticos de resultados con las muestras molidas.

**Tabla 5.3** Valores medios de Índice de peróxidos ( $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  equivalentes) en las muestras de carne molidas, durante su almacenamiento a 4 °C. Distintas letras minúsculas en la misma columna indican diferencia significativa ( $p<0.05$ ) por la prueba de Fisher. Letras mayúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencia significativa ( $p<0.05$ ) por la prueba de Fisher.

tratamientos	día 0	día 1	día 3	día 5	día 7
control	0.24 <sup>A</sup>	0.4±0.06 <sup>aB</sup>	0.33±0.042 <sup>aAB</sup>	0.7±0.07 <sup>aC</sup>	0.68±0.06 <sup>bcC</sup>
BHT 100 mg/Kg	0.24 <sup>A</sup>	0.23±0.042 <sup>ba</sup>	0.16±0.083 <sup>ba</sup>	0.12±0.06 <sup>ca</sup>	0.45±0.07 <sup>db</sup>
PGAL 100 mg/Kg	0.24 <sup>A</sup>	0.35±0.014 <sup>abAB</sup>	0.38±0.03 <sup>aAB</sup>	0.36±0.042 <sup>bcAB</sup>	0.52±0.083 <sup>cdB</sup>
PGAL 500 mg/Kg	0.24 <sup>A</sup>	0.31±0.042 <sup>abA</sup>	0.34±0.08 <sup>aA</sup>	0.57±0.042 <sup>abB</sup>	0.87±0.03 <sup>aC</sup>
PGAL 1000 mg/Kg	0.24 <sup>BC</sup>	0.35±0.014 <sup>abBC</sup>	0.19±0.013 <sup>bC</sup>	0.43±0.24 <sup>abB</sup>	0.8±0.11 <sup>abA</sup>
promedio	0.24	0.33±0.06	0.3±0.08	0.44±0.2	0.66±0.16

**Tabla 5.4** Comparación entre las medias de TBARS en las muestras de carne molida durante su almacenamiento a 4 °C. Distintas letras minúsculas en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) por la prueba de Fisher. Letras mayúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) por la prueba de Fisher.

tratamientos	día 0	día 1	día 3	día 5	día 7
<b>control</b>	0.023 <sup>A</sup>	0.14±0.023 <sup>abB</sup>	0.19±0.001 <sup>aB</sup>	0.13±0.01 <sup>aB</sup>	0.31±0.077 <sup>aC</sup>
<b>BHT 100 mg/Kg</b>	0.023 <sup>A</sup>	0.15±0.05 <sup>aB</sup>	0.105±0.023 <sup>bB</sup>	0.077±0.03 <sup>bAB</sup>	0.13±0.03 <sup>bB</sup>
<b>PGAL 100 mg/Kg</b>	0.023 <sup>A</sup>	0.083±0.01 <sup>bcB</sup>	0.04±0.022 <sup>cAB</sup>	0.054±0.023 <sup>bAB</sup>	0.035±0.02 <sup>bA</sup>
<b>PGAL 500 mg/Kg</b>	0.023 <sup>A</sup>	0.041±0.013 <sup>cA</sup>	0.051±0.01 <sup>cA</sup>	0.051±0.01 <sup>bAB</sup>	0.09±0.03 <sup>bB</sup>
<b>PGAL 1000 mg/Kg</b>	0.023 <sup>A</sup>	0.073±0.018 <sup>bcAB</sup>	0.06±0.02 <sup>bB</sup>	0.06±0.023 <sup>bA</sup>	0.045±0.04 <sup>bA</sup>
<b>promedio</b>	0.023	0.097±0.041	0.1±0.055	0.074±0.028 <sup>b</sup>	0.121±0.99 <sup>b</sup>