



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**“DESARROLLO DE UN RECUBRIMIENTO
COMESTIBLE DE QUITOSANO Y TÉ VERDE PARA
CONSERVAR LA CALIDAD DE LA CARNE DE
CERDO EN REFRIGERACIÓN”**

Por:

Eduardo Montaña Sánchez

TESIS APROBADA POR LA

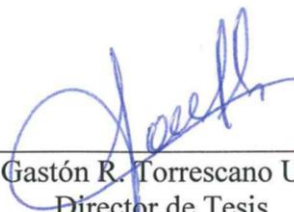
COORDINACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN


Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Eduardo Montaña Sánchez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Gastón R. Torrescano Urrutia
Director de Tesis



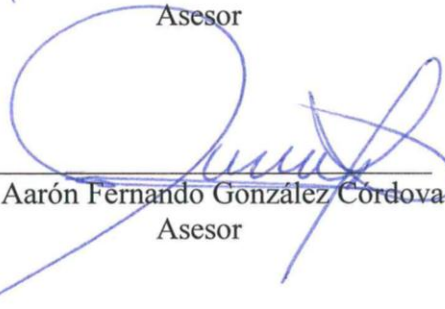
Dra. Armida Sánchez Escalante
Asesor



Dr. Jaime Lizardi Mendoza
Asesor



Dr. Tomás Jesús Madera Santana
Asesor



Dr. Aarón Fernando González Córdova
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo para la realización de este proyecto, y por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por brindarme la oportunidad de realizar la Maestría en Ciencias.

A mi Director de tesis Dr. Gastón R. Torrescano Urrutia, por ser una guía y un apoyo fundamental para la elaboración de este proyecto. Pero sobre todo por ser un buen amigo y una gran persona.

A la Dra. Armida Sánchez Escalante, por su disposición y por todos los buenos consejos profesionales y personales. Así como por todos los esfuerzos realizados para que nunca me hicieran falta materiales o equipos para realizar este proyecto.

A mi comité de tesis, Dr. Gastón R. Torrescano Urrutia, Dra. Armida Sánchez Escalante, Dr. Jaime Lizardi Mendoza, Dr. Tomás Jesús Madera Santana, Dr. Aarón Fernando González Córdova, por sus acertadas observaciones y por las facilidades proporcionadas para la realización de este trabajo.

A Livier Zavala Cárdenas, por su guía en el trabajo de laboratorio y por su apoyo en los asuntos administrativos, gracias por tus consejos y tus críticas, las seguiré tomando en cuenta. Gracias Livier.

A los MC Rey David Vargas Sánchez y Margarita I. Ramírez Rojo, por el apoyo brindado en el tema de antioxidantes y el tiempo dedicado a la enseñanza de técnicas y sus fundamentos.

A mis compañeras Lic. en Biología Rosario Elizabeth y Rosario Guadalupe Cota Verdugo, por su disposición para apoyar en el trabajo de laboratorio de microbiología. Y por siempre tener una sonrisa en el rostro y estar dispuestas a levantarme el ánimo.

Al Dr. Adrián Hernández Mendoza y al Laboratorio de Productos Lácteos, por permitirme hacer uso de las instalaciones de microbiología, y por sus buenos consejos para hacer buen uso del mismo.

A la Dra. Maricarmen Thalía Recillas Mota y a su esposo MC Alfonso Martínez Borraz por recibirme con los brazos abiertos desde el primer día, y gracias por todo el apoyo y las buenas vibras.

A la MC. Carolina I. Hernández Álvarez por hacer que mi estancia en Hermosillo fuera de los mejores años de mi vida y por compartir conmigo un poquito de su inagotable alegría y su amor por la vida. Gracias por todo Caro.

Al MC. Edwin A. Ávila Espinoza por su grata e inspiradora compañía durante el trabajo de laboratorio, por amenizar los días tan cortos y las noches tan largas de laboratorio. Gracias Yuyo.

A la MC. Priscilia I. Saavedra Peiro, por su amistad y apoyo durante cada etapa de los estudios de Maestría, y por siempre tener una sonrisa para regalar. Gracias Pris.

A la Ing. Katty G. Gómez Valenzuela por su apoyo en el trabajo de laboratorio, pero sobre todo, por su amistad, su cariño y su alegría. Gracias Katty.

A todas las personas que conocí durante mi estancia en Hermosillo y que por entrar en mi vida la hicieron mejor. ¡Gracias!

DEDICATORIA

A mi mamá, porque le debo más que darme la vida, por enseñarme lo que vale el cariño, el valor y el trabajo. A mi papá por contagiarme un poco de su locura y su perseverancia. Les dedico esta tesis a ustedes porque sé que este logro se los debo a ustedes y porque siempre han sido mi mejor ejemplo.

A mis hermanos, que siempre han sido mis mejores compañeros, amigos, cómplices y todo. Y de paso a mi sobrina Sarita, por cada sonrisa que me ha regalado.

A mi abuelo, a mi tía Lola y a mi prima Ceci, me disculpo por no poder haber podido estar con ustedes. Descansen en paz.

A los amigos que me han hecho compañía de lejos o de cerca, por todas las risas y afectos que me han robado, a ustedes mis buenos amigos con quienes he dejado pedazo a pedazo el corazón.

¿Qué tal si deliramos por un ratito?
¿Qué tal si clavamos los ojos más allá de la infamia
para adivinar otro mundo posible?
El aire estará limpio de todo veneno
que no provenga de los miedos humanos
y de las humanas pasiones.
En las calles,
los automóviles serán aplastados por los perros.
La gente no será manejada por el automóvil,
ni será programada por la computadora,
ni será comprada por el supermercado,
ni será tampoco mirada por el televisor.
El televisor dejará de ser
el miembro más importante de la familia
y será tratado como la plancha o el lavarropas.
Se incorporará a los códigos penales el delito de estupidez
que cometen quienes viven por tener o por ganar
en vez de vivir por vivir no más
como canta el pájaro sin saber que canta
y como juega el niño sin saber que juega.
En ningún país irán presos los muchachos
que se nieguen a cumplir el servicio militar
sino los que quieran cumplirlo.
Nadie vivirá para trabajar
pero todos trabajaremos para vivir.
Los economistas no llamarán “nivel de vida”
al nivel de consumo
ni llamarán calidad de vida
a la cantidad de cosas.
Los cocineros no creerán que a las langostas
les encanta que las hiervan vivas.
Los historiadores no creerán que a los países
les encanta ser invadidos.
Los políticos no creerán que a los pobres
les encanta comer promesas.
La solemnidad se dejará de creer que es una virtud
y nadie, nadie tomará en serio a nadie
que no sea capaz de tomarse el pelo.
La muerte y el dinero perderán sus mágicos poderes
y ni por defunción ni por fortuna
se convertirá el canalla en virtuoso caballero.
La comida no será una mercancía
ni la comunicación un negocio,
porque la comida y la comunicación
son derechos humanos.
Nadie morirá de hambre
porque nadie morirá de indigestión.

Los niños de la calle no serán tratados como si fueran basura
porque no habrá niños de la calle.
Los niños ricos no serán tratados como si fueran dinero
porque no habrá niños ricos.
La educación no será el privilegio de quienes puedan pagarla
y la policía no será la maldición de quienes no puedan comprarla.
La justicia y la libertad, hermanas siamesas,
condenadas a vivir separadas
volverán a juntarse bien pegaditas espalda contra espalda.
En Argentina, las locas de plaza de mayo
serán un ejemplo de salud mental
porque ellas se negaron a olvidar
en los tiempos de la amnesia obligatoria.
La santa madre iglesia corregirá algunas erradas
de las tablas de Moisés
y el sexto mandamiento ordenará
festejar el cuerpo.
La iglesia también dictará otro mandamiento
que se le había olvidado a Dios:
“Amarás a la naturaleza de la que formas parte”.
Serán reforestados los desiertos del mundo
y los desiertos del alma.
Los desesperados serán esperados
y los perdidos serán encontrados
porque ellos se desesperaron de tanto esperar
y ellos se perdieron por tanto buscar.
Seremos compatriotas y contemporáneos
de todos los que tengan
voluntad de belleza y voluntad de justicia
hayan nacido cuando hayan nacido
y hayan vivido donde hayan vivido
sin que importe ni un poquito
las fronteras del mapa ni del tiempo.
Seremos imperfectos porque la perfección
seguirá siendo el aburrido privilegio de los dioses,
Pero en este mundo,
en este mundo chambón y jodido
seremos capaces de vivir cada día como si fuera el primero
y cada noche como si fuera la última.

Eduardo Galeano

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABLAS	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Situación Actual de la Producción, Consumo y Comercialización de la Carne de Cerdo.....	3
2.2 Alcance del Concepto de Calidad.....	8
2.3. Parámetros de Calidad de la Carne de Cerdo	9
2.3.1 Estructura y Composición de la Carne de Cerdo	12
2.3.2 Calidad Microbiológica de la Carne de Cerdo.....	14
2.3.3 Oxidación de Lípidos.....	20
2.3.4 Color de la Carne	23
2.3.5 Deterioro de la Calidad de la Carne por Oscurecimiento del Hueso ..	28
2.4. Aditivos Antioxidantes y Antimicrobianos	30
2.4.1 Propiedades del Té Verde	33
2.4.2 Propiedades del Quitosano.....	36
2.5. Envasado de la Carne Como Medio de Conservación	38
2.5.1. Empaques Empleados Tradicionalmente.....	38
2.5.2. Materiales de origen biológico para empaques.....	40
2.6. Recubrimientos Comestibles	41
2.6.1 Cubiertas Comestibles de Quitosano	41
2.6.2 Cubiertas Comestibles de Quitosano Adicionadas con Té Verde	42
III. HIPÓTESIS.....	46
OBJETIVOS	47
Objetivo General	47
Objetivos Específicos	47

CONTENIDO (continuación)

	Página
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	48
4.1. Etapa I.....	51
4.1.1 Elaboración del Extracto Experimental	51
4.1.2 Desarrollo de Películas y Recubrimientos	51
4.1.3 Capacidad Antioxidante de Extractos y Recubrimientos	53
4.1.4 Capacidad Antimicrobiana de Extractos y Recubrimientos	55
4.1.5 Medición de Color de las Películas.....	56
4.2.6 Propiedades Mecánicas de las Películas	58
4.2 Etapa II	58
4.2.1 Aplicación del Recubrimiento en Carne de Cerdo y Almacenamiento	58
4.2.2 Medición del Color de la Carne y Médula Ósea.....	59
4.2.3 Medición del pH de la Carne	59
4.2.4 Evaluación de Oxidación (TBARS) en la Carne de Cerdo.....	61
4.2.5 Evaluación Microbiológica de la Carne.....	61
4.3 Diseño Experimental y Análisis estadístico	62
4.3.1 Etapa I.....	62
4.3.2 Etapa II.....	63
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
ETAPA I.....	64
Capacidad Antioxidante de los Extractos	64
Color de las Películas.....	68
Propiedades Mecánicas de las Películas	70
Capacidad Antioxidante de las Películas	74
Capacidad Antibacteriana de los Extractos de Té Verde.....	78
Capacidad Antibacteriana de los Recubrimientos	81
ETAPA II.....	85
pH de la Carne Durante su Almacenamiento.....	85
Oxidación de Lípidos.....	87

CONTENIDO (continuación)

	Página
Evaluación Microbiológica de la Carne.....	89
Color de la Carne	92
Color del Hueso	96
Correlaciones de Pearson entre Variables	99
VI. CONCLUSIONES	103
VII. LITERATURA CITADA	105
ANEXO 1	113

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Consumo aparente (en millones de ton) de carne de cerdo (C), pollo (P), res (R) y otras carnes (O) durante el 2011, por continente. Elaboración propia con datos del FAOSTAT (2014).	4
Figura 2. Consumo aparente (en millones de ton) de carne por especie animal, a nivel mundial. Elaboración propia con datos del FAOSTAT (2014).	4
Figura 3. Principales países productores de carne de cerdo a nivel mundial durante el 2011. Elaboración propia con datos del FAOSTAT (2014).	6
Figura 4. Principales países exportadores de carne de cerdo a nivel mundial durante el 2011. Elaboración propia con datos del FAOSTAT (2014).	6
Figura 5. Principales países importadores de carne de cerdo a nivel mundial durante el 2011. Elaboración propia con datos del FAOSTAT (2014).	6
Figura 6. Exportaciones de carne de cerdo en México, durante el periodo 1990-2011 (miles de ton) (FAOSTAT, 2014).	7
Figura 7. Exportaciones de carne de cerdo de México, durante el periodo 1997-2007. Elaboración propia con datos del SIAP (2012).	7
Figura 8. Modelo multidisciplinario de los principales factores que influyen en el comportamiento del consumidor en el campo de los alimentos de Font-i-Furnols y Guerrero (2014).	11
Figura 9. Proceso de autoxidación de los lípidos (Rojano <i>et al.</i> , 2008).	21
Figura 10. a) molécula de mioglobina mostrando al grupo hemo, b) vista frontal del grupo hemo, c) vista lateral del grupo hemo, incluyendo vista de la histidina (His) proximal y distal, d) grupo hemo de la desoximioglobina y e) grupo hemo de la oximioglobina (Averill y Eldredge, 2011).	24
Figura 11. Clasificación de los flavonoides (elaboración propia).	32
Figura 12. Principales Flavan-3-oles presentes en el té.	34
Figura 13. Estructura de la glucosamina, monómero del quitosano (a) y representación química de la estructura de la quitina y el quitosano (b) (Pillai <i>et al.</i> , 2009).	43

LISTA DE FIGURAS (continuación)

	Página
Figura 14. Evolución de la carga microbiológica de salchichas de cerdo sin recubrimiento (sin), con recubrimiento de quitosano (qui) y con recubrimiento de quitosano y té verde (qyt) a los 0, 4, 8, 12, 16 y 20 días de almacenamiento a 4 °C (Siripatrawan y Noipha, 2012).....	45
Figura 15. Evaluación sensorial de salchichas de cerdo sin recubrimiento (sin), con recubrimiento de quitosano (qui) y con recubrimiento de quitosano y té verde (qyt) a los 0, 4, 8, 12, 16 y 20 días de almacenamiento a 4 °C (Siripatrawan y Noipha, 2012).	45
Figura 16. Esquema de trabajo y parámetros a medir.	49
Figura 17. Películas desarrolladas con diferentes concentraciones de té verde (de menor a mayor concentración de izquierda a derecha).	52
Figura 18. Esquema de microplaca de 96 pocillos.....	57
Figura 19. Aplicación del recubrimiento por inmersión en la solución del recubrimiento, empaque e identificación de las muestras.	60
Figura 20. Inhibición del crecimiento de las bacterias Gram positivas <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213B (SA) y <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 (LI), empleando dos tipos de extracto de té verde, el extracto experimental (EE) y el extracto industrial (EI).	79
Figura 21. Inhibición del crecimiento de las bacterias Gram negativas <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 (EC) y <i>Salmonella choleraesuis</i> . ATCC10708 (SC), empleando dos tipos de extracto de té verde, el extracto experimental (EE) y el extracto industrial (EI)	80
Figura 22. Inhibición del crecimiento de las bacterias Gram positivas <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213B (SA) y <i>Listeria innocua</i> ATCC33090 (LI) empleando el recubrimiento de quitosano al 1% adicionado con dos tipos de extracto de té verde, el extracto experimental (EE) y el extracto industrial (EI).	82
Figura 23. Inhibición del crecimiento de las bacterias Gram negativas <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 (EC) y <i>Salmonella choleraesuis</i> . ATCC10708 (SC), empleando el recubrimiento de quitosano al 1% adicionado con dos tipos de extracto de té verde, el extracto experimental (EE) y el extracto industrial (EI).	83

LISTA DE FIGURAS (continuación)

	Página
Figura 24. Concentración de TBARS (mg MA/kg) de los diferentes tratamientos a lo largo de 25 días de almacenamiento.	88
Figura 25. Cuenta total de mesófilos aerobios expresados como \log_{10} UFC/g de carne .	91
Figura 26. Cuenta en placa de bacterias psicrófilas aerobias totales expresados como \log_{10} UFC/g de carne.....	93

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición nutricional de las carnes y otras fuentes de alimento.	13
Tabla 2. Perfil de ácidos grasos (%) de grasa intramuscular de cerdos, machos castrados y hembras, de craza York, antílope eland (<i>Taurotragus oryx</i>) y ganado vacuno fleckvieh (<i>Bos taurus</i>). (Mas <i>et al.</i> , 2011; Bartoñ <i>et al.</i> , 2014)	15
Tabla 3. Límites máximos permitidos por la normatividad mexicana vigente, del contenido microbiano en carne cruda. (Secretaría de Salud, 2014).....	19
Tabla 4. Color típico de la carne procedente de diversas especies. Fuente: (Forrest <i>et al.</i> , 1979)	26
Tabla 5. Componentes principales del extracto industrial del laboratorio REDSA.....	50
Tabla 6. Formulación de soluciones de quitosano y té verde para recubrimientos.....	52
Tabla 7. Tratamientos y número de muestras para la aplicación en carne.....	60
Tabla 8. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de los extractos de té verde	65
Tabla 9. Contenido de compuestos fenólicos en los extractos de té verde	67
Tabla 10. Color de las películas	69
Tabla 11 . Propiedades mecánicas de las películas.....	71
Tabla 12. Inhibición (%) del radical DPPH (Promedio \pm D.E.) de las películas disueltas en ácido acético.	75
Tabla 13. Contenido de compuestos fenólicos en las películas diluidas al 1%.	77
Tabla 14. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el pH de la carne con aplicación de recubrimientos de quitosano y té verde.....	86
Tabla 15. Valores de L*, a*, b*, C* y H* para la carne con aplicación del recubrimiento.	95
Tabla 16. Valores de L*, a*, b*, C* y H* para el hueso con aplicación del recubrimiento.	98
Tabla 17. Cuadro de correlación de Pearson de variables cuantificadas en la aplicación del recubrimiento	100

RESUMEN

A partir de la década de 1990, las exportaciones de carne de cerdo mexicana se incrementaron de forma acelerada, desde 494 hasta 64,464 toneladas en 2011, las cuales están dirigidas principalmente al continente asiático, particularmente a Japón. Sin embargo, debido a que la carne es un alimento altamente perecedero y susceptible a deteriorarse, se hace necesario buscar nuevas formas de conservación para prolongar su vida útil. Por lo anterior, se elaboraron y evaluaron recubrimientos comestibles a base de quitosano y extractos de té verde, para aplicarse en carne de cerdo. Se evaluaron dos recubrimientos elaborados a base de quitosano y extractos de té verde [industrial (EI) y experimental (EE)], a diferentes concentraciones (0.05, 0.1, 0.5 y 1%, p/p). Los recubrimientos fueron evaluados de acuerdo a sus propiedades mecánicas y de color, además de la capacidad antioxidante, al igual que a los extractos. Los resultados muestran que el EI presentó mayor contenido de flavonoides que EE (15.20 y 6.49%), así como de fenoles totales (58.26 y 43.31%). Respecto a la capacidad antioxidante, el EI demostró inhibir en mayor medida al radical DPPH, observándose el mismo comportamiento en los recubrimientos. Los tratamientos con adición de 0.05 y 0.1% de ambos extractos, mostraron mayores porcentajes de elongación, mientras que respecto al color, los valores de a^* y b^* aumentaron conforme se incrementó la concentración de los extractos; aunque L^* disminuyó por la adición del EI en el recubrimiento. La evaluación de la capacidad antibacteriana tanto del quitosano como de los extractos se observó diferenciada para cada tipo de bacteria, observándose un retraso en el crecimiento para todas las bacterias sin importar el tipo de extracto ($p > 0.05$). En base a los resultados obtenidos se eligió aplicar el recubrimiento adicionado con EI en concentraciones de 0, 0.1 y 0.5% sobre carne de cerdo fresca (*M. L. dorsi*), en esta etapa se observó una disminución ($p < 0.05$) de la carga microbiana por la aplicación del recubrimiento, sin importar el porcentaje de adición de té verde, sin embargo este sí tuvo influencia en la reducción de la oxidación de lípidos (TBARS). La aplicación de los tratamientos no provocó cambios en el color de la carne ni en el oscurecimiento del hueso en cortes envasados al vacío. El extracto de té verde aunado al quitosano es una buena opción para prolongar la vida útil de la carne de cerdo.

Palabras clave: calidad de la carne, recubrimiento comestible, propiedades mecánicas, color, capacidad antioxidante, oxidación de lípidos.

ABSTRACT

From the 1990s, exports of Mexican pork increased at an accelerating rate from 494 to 64,464 tons in 2011, directed mainly to Asia, particularly to Japan. However, because the meat is a highly perishable and susceptible to deteriorate food, it is necessary to seek new forms of conservation to prolong its shelf life. Therefore, edible coatings based on chitosan and two different types of green tea extracts [Industrial (EI) and experimental (EE)] were developed to be applied on pork meat. The mechanical properties, color, antioxidant and antimicrobial capacity of coatings containing different concentrations (0.05, 0.1, 0.5 and 1%, w / w) of green tea extract were evaluated. The results showed that the higher content of EI flavonoids than EE (6.49% and 15.20), as well as total phenolic content (58.26 and 43.31%), respectively. The coatings containing EI extract shown higher inhibition of the DPPH radical. Regarding the mechanical properties, the coatings with 0.05 and 0.1% of any of both tea extracts have higher elongation capacity. The color of the coatings was affected by the concentration of tea extract, the a* and b* parameters increased and L* decreased proportionally at higher extract content. Evaluating the antibacterial capacity of chitosan as both extracts was observed differentiated for each type of bacteria, showing a growth delay for all bacteria regardless of type of extract. Based on the results was chosen to apply the added coating EI at concentrations of 0, 0.1 and 0.5% of fresh pork (*M. L. dorsi*), at this stage a decrease ($p < 0.05$) of microbial load was observed by applying the coating, regardless of the percentage of added green tea, however the treatments had influence in reducing lipid oxidation (TBARS). The treatments application did not cause changes in the color of the flesh nor bone darkening vacuum packaged cuts. The green tea extract combined with the chitosan is a good option to extend the shelf life of pork.

Keywords: meat quality, edible coating, mechanical properties, color, antioxidant capacity, lipid oxidation.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la carne de cerdo es el primer tipo de carne consumido a nivel mundial, en cuanto a volumen (FAOSTAT, 2014). Esta substancial aceptación por parte de los consumidores, se debe en gran parte, a las mejoras genéticas que se han realizado a la especie, con la finalidad de cambiar el perfil de ácidos grasos presentes, haciendo de la carne de cerdo un alimento rico en nutrientes, a la vez que saludable. Sin embargo, la carne por ser un alimento rico en proteínas y grasas, es susceptible al deterioro tanto por la contaminación microbiana así como por la oxidación de lípidos, lo cual puede derivarse en rechazo por parte del consumidor, e incluso puede causar daños a la salud (Siripatrawan y Noipha, 2012). Es por ello que es muy importante asegurar su calidad fisicoquímica, microbiológica y sensorial.

Hoy en día las exigencias de comercialización de la carne de cerdo a nivel mundial dan pie a un nuevo reto tecnológico, ya que se hace necesario establecer estrategias que permitan conservar las características de calidad de la carne durante los largos periodos de transporte y almacenamiento al que es sometido este alimento. El problema se deriva a partir de que los centros de producción de muchos alimentos no están cerca del lugar de consumo; y en específico, en el caso de la carne de cerdo, algunos embarques deben viajar por más de 20 días para llegar al consumidor final, como es el caso de las exportaciones a oriente. Además, deben hacer este viaje sin ser sometidos a un proceso de congelación para no comprometer su calidad organoléptica (Naviera-NYK, 2014).

Una posible solución a las exigencias del mercado por mejorar la conservación es la aplicación de un recubrimiento comestible a base de quitosano, el cual ha demostrado tener propiedades antioxidantes, antimicrobianas y de formación de

recubrimientos (El Ghaouth *et al.*, 1997; Li y Yu, 2001; Coma, 2008). Otras investigaciones han demostrado que la adición de compuestos activos en los recubrimientos, mejora su capacidad para conservar la calidad (Bégin y Van Calsteren, 1999; Quintavalla y Vicini, 2002; Sebti y Coma, 2002; Durango *et al.*, 2006; Sánchez-González *et al.*, 2009; Atarés *et al.*, 2010; Fajardo *et al.*, 2010).

Por otro lado, uno de los aditivos de origen natural que han demostrado muy buenos resultados al aplicarse en alimentos es el té verde, el cual ha demostrado poseer capacidad antioxidante y antimicrobiana (Arakawa *et al.*, 2004; Almajano *et al.*, 2008; Forester y Lambert, 2014; Tao y Lambert, 2014). Así entonces, esta investigación está específicamente dirigida a generar un recubrimiento con base de quitosano y adicionado con té verde. Ambos compuestos han probado su capacidad antioxidante y antimicrobiana en diferentes investigaciones científicas, aplicadas en forma separada o conjunta (Bégin y Van Calsteren, 1999; Quintavalla y Vicini, 2002; Almajano *et al.*, 2008; Mbata *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2010; von Staszewski *et al.*, 2011; Siripatrawan y Noipha, 2012), aunque no existen muchas evidencias de estudios que prueben su aplicación en carne fresca.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación fue establecer el efecto de la aplicación de un recubrimiento comestible con base de quitosano y adicionado con extracto de té verde, sobre la vida útil de la carne de cerdo fresca.

II. ANTECEDENTES

2.1 Situación Actual de la Producción, Consumo y Comercialización de la Carne de Cerdo

La carne de cerdo se ubica entre las tres principales más consumidas a nivel mundial. Su consumo está asociado fuertemente al entorno cultural, económico, sensorial y publicitario. Así por ejemplo, en los países musulmanes el consumo de carne de cerdo es muy bajo, o nulo; sin embargo, en relación al aspecto económico, se observa fácilmente el contraste entre África y Europa, considerando un consumo *pér capita* de 1.4 y 34.2 kg para el año 2009, respectivamente (Font-i-Furnols y Guerrero, 2014).

En el 2011, según los datos del FAOSTAT (2014), la carne de cerdo ocupó el primer lugar, en consumo, en Europa y Asia; el tercer lugar en América y Oceanía; y en general, el primer lugar como la carne más consumida a nivel mundial (Figuras 1 y 2). A pesar de que en Asia el consumo *per cápita* de carne de cerdo es intermedio (15.3 kg/año) (2009), en 2011 la población de esta región fue la principal consumidora a nivel mundial, con 62.5 millones de toneladas, lo cual representó el 57.81%.

El continente asiático no sólo es el principal consumidor, también es el mayor productor a nivel mundial, principalmente China, que en 2011 produjo 59.68 millones de toneladas, conservando el primer lugar en producción con el 45.71% del total de la producción, seguida de lejos por Estados Unidos de América con el 9.56% (Figura 3).

Así entonces, China siendo el primer productor a nivel mundial, en el 2011 ocupó el lugar 11° en exportaciones y el 3° en importaciones. Alemania en cambio, ocupó el 3^{er} lugar en producción, pero el primero en exportación, y no figuró entre los

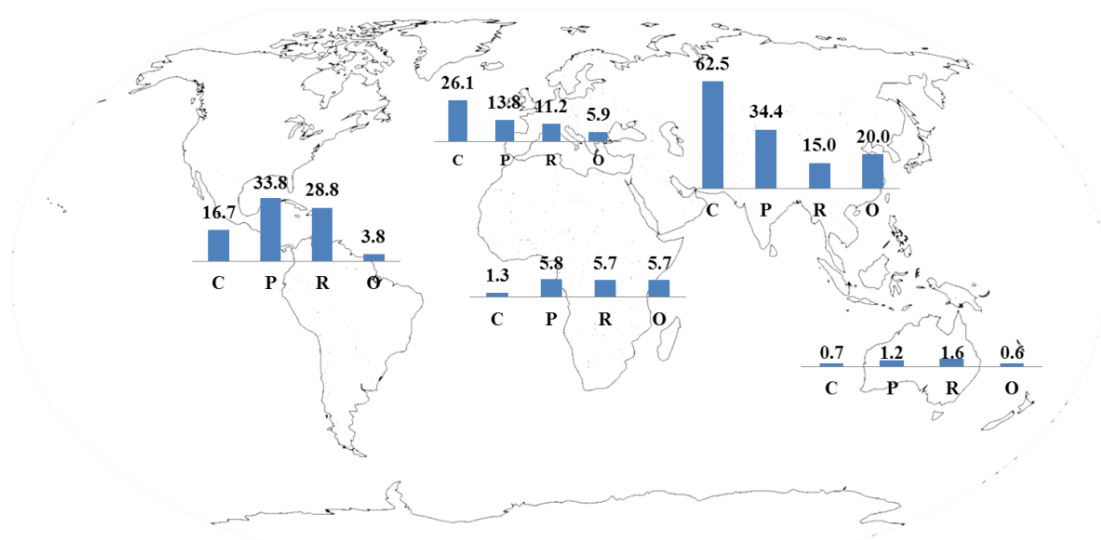


Figura 1. Consumo aparente (en millones de ton) de carne de cerdo (C), pollo (P), res (R) y otras carnes (O) durante el 2011, por continente. Elaboración propia con datos del FAOSTAT (2014).

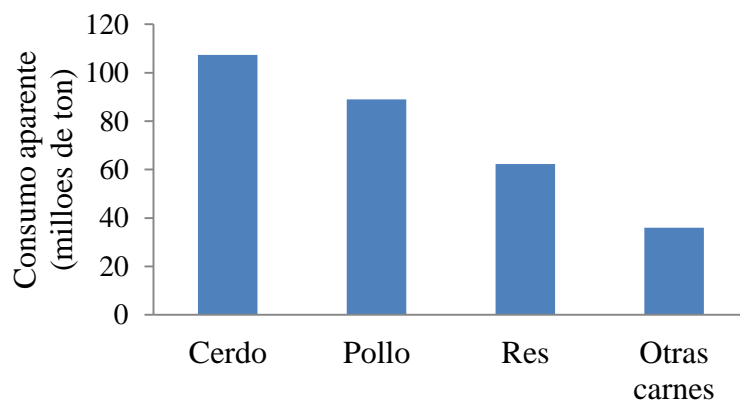


Figura 2. Consumo aparente (en millones de ton) de carne por especie animal, a nivel mundial. Elaboración propia con datos del FAOSTAT (2014).

primeros 15 países importadores; es decir China consume más de lo que produce, mientras que Alemania produce más de lo que consume. Pero un caso más claro de consumo es el de Japón, que ocupó el lugar 15° en producción, ni figuró entre los primeros 15 exportadores, siendo el primer país importador de carne de cerdo a nivel mundial, con un total de 1.19 millones de toneladas, lo que comparativamente correspondió al 99.5% de la producción total de México para ese año (Figuras 3, 4 y 5):

En 2011, México se colocó en la posición 16, entre los países con mayor producción de carne de cerdo a nivel mundial, con 1.20 millones de toneladas. También se ubicó en el número 10 entre los principales importadores, y en el lugar 41° en exportación a nivel mundial con 64,464 toneladas anuales, representando tan solo el 0.059% de la producción mundial, con un valor de 343.7 millones de dólares.

A partir de la década de 1990, México comienza a exportar carne de cerdo, de manera importante (Figura 6), cuando las exportaciones de este tipo de carne se disparan de forma acelerada, desde 0.494 hasta 64.464 miles de toneladas, en un lapso de 21 años, es decir en el año 2011. En cuanto al destino de estas exportaciones, se observa un fenómeno interesante, ya que a partir del 2002, la mayor parte, que antes se destinaba a EUA, se direcciona al mercado japonés; comportamiento que se mantiene e incrementa en los años posteriores (Figura 7) (SIAP, 2012). Sin embargo, esta nueva ruta de comercialización genera tiempos de traslado que van desde 15 hasta 25 días, lo cual representa un reto tecnológico en busca de métodos más efectivos para la conservación de la calidad de la carne durante un periodo más prolongado.

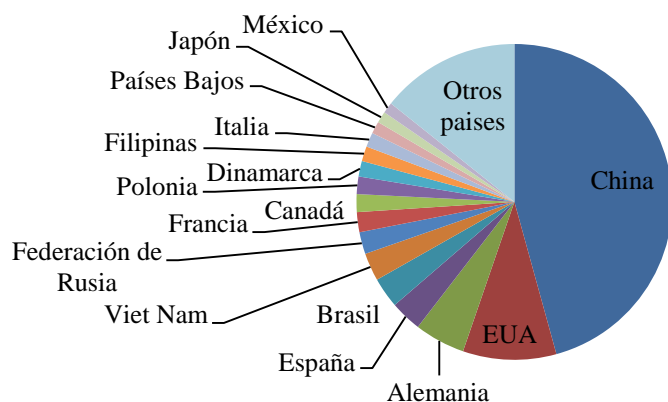


Figura 3. Principales países productores de carne de cerdo a nivel mundial durante el 2011. Elaboración propia con datos del FAOSTAT (2014).

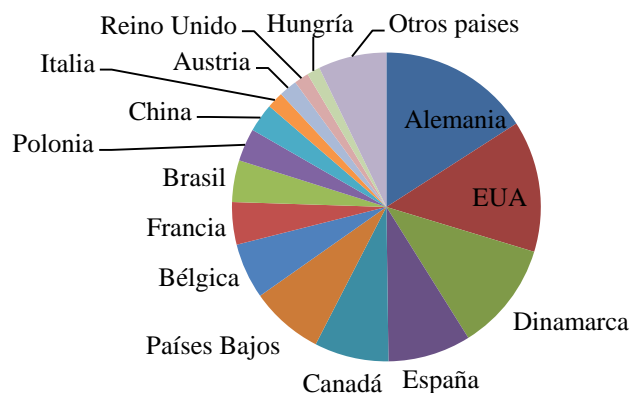


Figura 4. Principales países exportadores de carne de cerdo a nivel mundial durante el 2011. Elaboración propia con datos del FAOSTAT (2014).

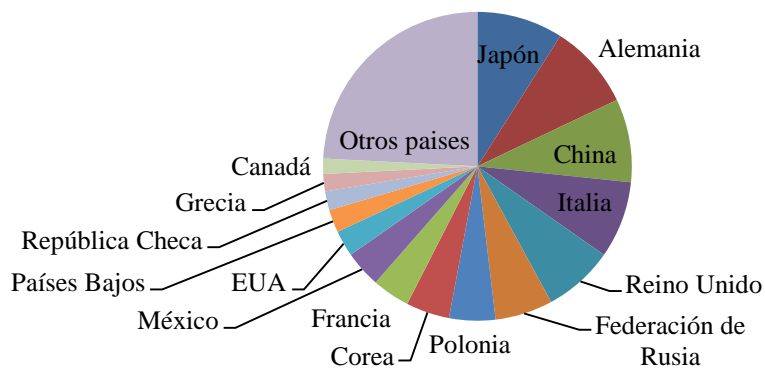


Figura 5. Principales países importadores de carne de cerdo a nivel mundial durante el 2011. Elaboración propia con datos del FAOSTAT (2014).

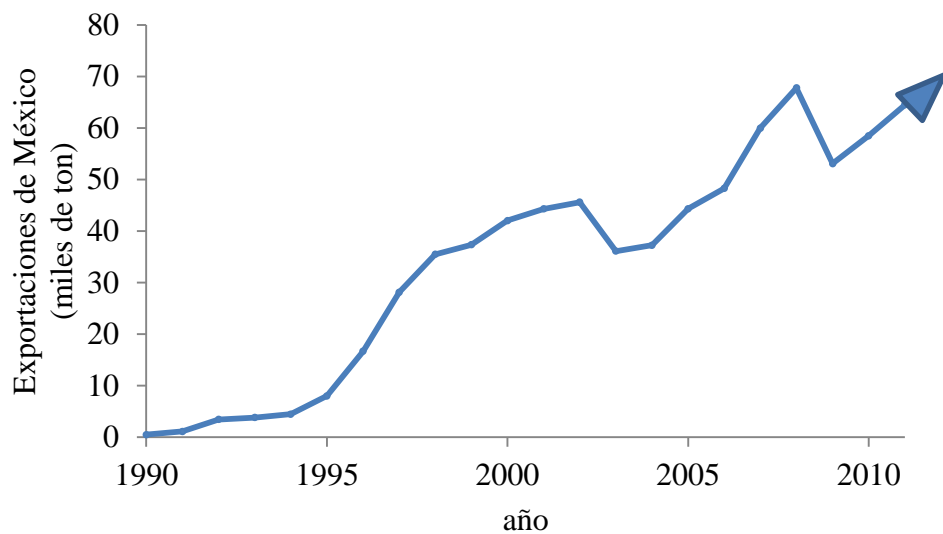


Figura 6. Exportaciones de carne de cerdo en México, durante el periodo 1990-2011 (miles de ton) (FAOSTAT, 2014).

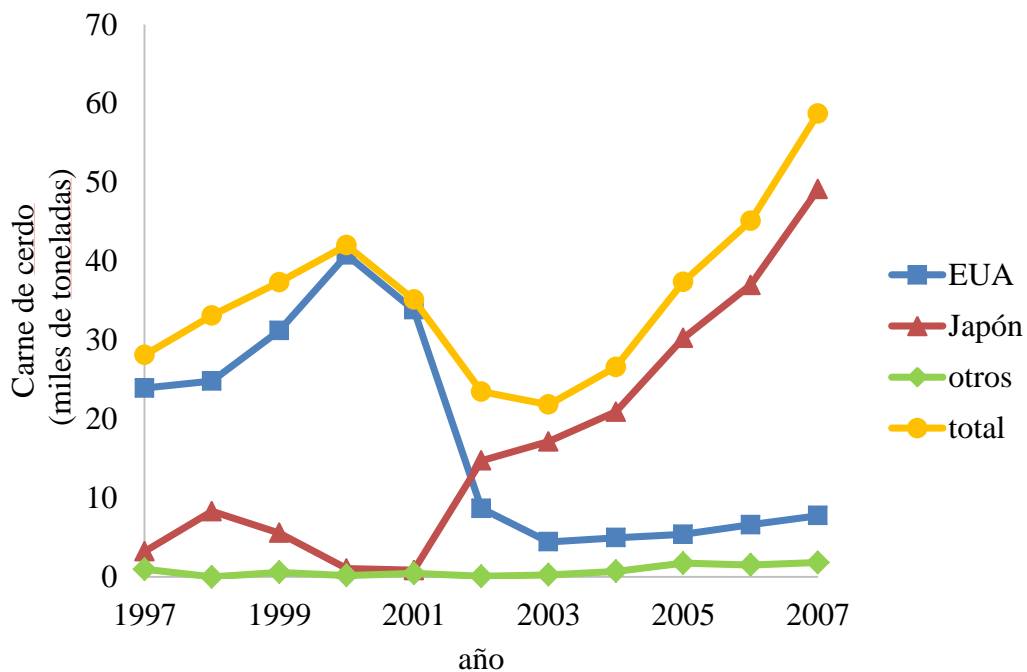


Figura 7. Exportaciones de carne de cerdo de México, durante el periodo 1997-2007. Elaboración propia con datos del SIAP (2012).

2.2 Alcance del Concepto de Calidad

La norma ISO-9000 (2005) define calidad como el grado en el que un conjunto de características inherentes cumple con los requisitos. Requisitos que pueden ser generados por las diferentes partes interesadas, es decir, la calidad podría definirse como el grado en que un bien o servicio es capaz de satisfacer las necesidades del consumidor. Según parece, la mayor dificultad de esta definición radica en el carácter cambiante, móvil y subjetivo, que parece ser inherente al concepto “consumidor”. Entonces, dado que estas necesidades o requisitos dependen del consumidor, y el consumidor es un sector de la población o incluso un individuo, la definición de calidad puede ser extendida, como enuncia Caponi (1997) refiriéndose al concepto de salud, inclusive, a espacios aparentemente tan subjetivos e individuales como es, por ejemplo, el de la “felicidad”.

La calidad puede cambiar de un lugar a otro, de tiempo en tiempo, de individuo a individuo e incluso, al mismo tiempo, el valor óptimo de ciertos atributos, especialmente los organolépticos, pueden tener un elevado componente geográfico y cultural. Así por ejemplo, mientras en el mundo occidental existe una tendencia a consumir carne más magra (Cardenia *et al.*, 2011), el mercado japonés aprecia la carne oscura y con alto contenido de grasa intramuscular. Otro caso es cuando los aspectos englobados bajo la categoría de calidad social de la carne, pueden ser determinantes en el momento de la compra, como es el caso de garantizar el bienestar animal y el sacrificio humanitario, como es el caso de los países de la Unión Europea (Coma y Piquer, 1999). Por supuesto también se involucran aspectos de calidad que no son evaluados por el consumidor final, pero que son de suma importancia, como la calidad microbiológica y nutrimental; o están los factores que deben cumplirse para poder asegurar que se siga consumiendo, como la calidad organoléptica (Font-i-Furnols y Guerrero, 2014).

2.3. Parámetros de Calidad de la Carne de Cerdo

A pesar de la complejidad para definir la calidad de la carne, en general, se pueden identificar y cuantificar parámetros que limitan los márgenes de aceptabilidad. Algunos de los más sobresalientes son el pH de la carne, el color de la carne y del hueso, la oxidación de lípidos, los aspectos organolépticos y la calidad microbiológica.

El pH se relaciona íntimamente con otros parámetros de calidad física e industrial. Tanto el color como la capacidad de retención de agua dependen de los cambios de pH durante la transformación *postmortem* del músculo en carne. Los cambios que se presentan en el pH después del faenado están regidos principalmente por la degradación de glucógeno a ácido láctico; proceso de conversión que es llamado glucogenólisis, que se origina por la activación de la glucógeno fosforilasa. Una glucogenólisis continua en el animal puede provocar una disminución en las reservas de glucógeno, y por tanto una caída menos marcada en el pH, debido a la falta de glucógeno, siendo el resultado final una carne DFD (dark, firm and dry, por sus siglas en inglés). En cambio, un estrés intenso momentos antes del aturdimiento provoca un incremento en la síntesis de ácido láctico, siendo el resultado final una carne PSE (pale, soft and exudative, por sus siglas en inglés) (Coma y Piquer, 1999).

El pH determina la carga eléctrica de las proteínas y es considerado una de las causas principales en el cambio de la capacidad de retención de agua, ya que en el momento de la muerte del animal las cargas son en su mayoría negativas, y éstas se repelen entre sí; pero con el descenso de pH las cargas positivas del ácido “cancelan” las negativas del músculo. Este efecto de cancelación de cargas se da hasta alcanzar el equilibrio, o punto isoeléctrico, el cual ocurre a un pH entre 5.1 y 5.3, aproximadamente (Honikel, 1997).

El color es la primera causa de rechazo de la carne por parte de los consumidores, por ello es uno de los atributos más importantes, tanto de la carne como del hueso. El color de la carne, depende de la concentración de mioglobina presente en

el músculo. Según Lawrie (1998), la concentración de mioglobina en la carne está relacionada con factores tales como edad y especie del animal, así como del tipo de fibra, entre otros. Inicialmente, el músculo es de color púrpura (desoximioglobina); cuando esta empieza a tener contacto con el oxígeno, durante la transformación del músculo en carne, adquiere un color rojo brillante (oximioglobina); pero al continuar oxidándose, el color rojo brillante cambia a un marrón claro (metamioglobina).

La oxidación de los lípidos puede significar el final de la vida útil del producto, ya que es una de las principales causas del deterioro de los alimentos, y produce profundas preocupaciones económicas en la industria alimentaria, porque da lugar a la aparición de sabores y olores anómalos, generalmente denominado enranciamiento oxidativo, en los alimentos que contienen grasas. La combinación de sabores y olores anómalos deterioran su calidad organoléptica. Además, las reacciones oxidativas rebajan la calidad nutritiva el alimento y generan ciertos productos potencialmente tóxicos (Nawar, 1984).

La calidad organoléptica depende de varios factores intrínsecos y extrínsecos, como especie, genotipo, nutrición y edad del animal; así como de la manipulación *ante mortem* y *post mortem*, como por ejemplo procedimiento de sacrificio, condiciones de almacenamiento y tiempo de maduración (Moelich *et al.*, 2003; Meinert *et al.*, 2009; Damon *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2013). Por lo tanto, a veces puede ser difícil mejorar una característica en carne, pues depende de diversos actores en la cadena de producción. Por otra parte, la modificación en la cadena de producción para producir una característica deseada puede afectar negativamente a otras. Lo que está claro es que estas propiedades afectan tanto aceptación como preferencias de los consumidores, y por lo tanto su intención de compra y voluntad de pago (Font-i-Furnols y Guerrero, 2014). En la Figura 8 se muestra el esquema de un modelo multidisciplinario diseñado por estos autores, sobre los principales factores que influyen en la percepción del consumidor en relación al consumo de carne. Considerando el modelo propuesto, es posible tener una idea de todos los factores que inciden en la actitud del consumidor respecto a la decisión de adquirir un determinado tipo de carne.

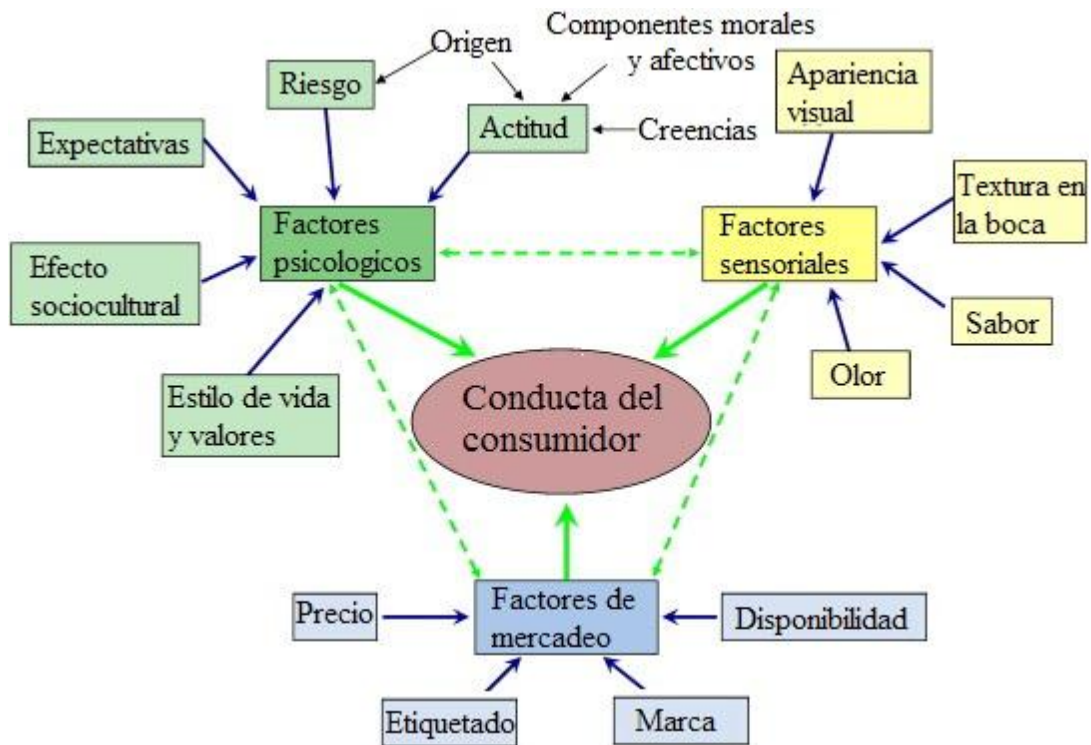


Figura 8. Modelo multidisciplinario de los principales factores que influyen en el comportamiento del consumidor en el campo de los alimentos de Font-i-Furnols y Guerrero (2014).

2.3.1 Estructura y Composición de la Carne de Cerdo

La carne, se define como la estructura muscular estriada esquelética, acompañada o no de tejido conectivo, hueso y grasa, además de fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos; proveniente de los animales de abasto, y que no ha sido sometida a ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas; se incluyen las refrigeradas o congeladas (NOM-194-SSA1-2004). La carne se compone de agua, proteínas y aminoácidos, minerales, grasas y ácidos grasos, vitaminas y otros componentes bioactivos, así como pequeñas cantidades de carbohidratos (Tabla 1) (FAO, 2014)

El contenido de agua en la carne es un parámetro físico que contribuye a la calidad de la carne y sus derivados, y está relacionada con la textura, características sensoriales y color de la carne cruda; y jugosidad y firmeza de la carne cuando esta cocinada (Restrepo *et al.*, 2001). Una forma de medir la retención del agua en la carne es evaluando la capacidad de retención de agua (CRA), que es la habilidad que exhibe la carne para retener el agua que se encuentra en ella durante la aplicación de fuerzas extremas como corte, calentamiento, trituración y prensado; y depende del tipo de proteína y su concentración, así como la presencia de hidratos de carbono, lípidos y sales, al igual que del pH (Restrepo *et al.*, 2001).

El tejido muscular de la carne tiene como unidad fundamental a la fibra muscular. Las características morfológicas y bioquímicas de las fibras musculares pueden afectar la velocidad de la glucólisis *post mortem* y la calidad del músculo en general. Así, por ejemplo, los músculos con un mayor porcentaje de fibras tipo IIb muestran una mayor capacidad glucolítica que los músculos con mayor porcentaje de fibras tipo I. El porcentaje de fibras tipo IIb también se correlaciona positivamente con la producción de lactato, y negativamente con el contenido de glucógeno en el período *post mortem* temprano, mientras que un mayor porcentaje de fibras tipo I se asocia con una mayor capacidad de retención de agua y un pH muscular más elevado (Choi *et al.*, 2012).

Tabla 1. Composición nutricional de las carnes y otras fuentes de alimento.

Producto	Agua (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Cenizas (%)	Contenido energético (KJ)
Carne de vacuno (magra)	75.0	22.3	1.8	1.2	116
Canal de vacuno	54.7	16.5	28.0	0.8	323
Carne de cerdo (magra)	75.1	22.8	1.2	1.0	112
Canal de cerdo	41.1	11.2	47.0	0.6	472
Carne de ternera (magra)	76.4	21.3	0.8	1.2	98
Carne de pollo	75.0	22.8	0.9	1.2	105
Carne de venado (ciervo)	75.7	21.4	1.3	1.2	103
Grasa de vaca (sub-cutánea)	4.0	1.5	94.0	0.1	854
Grasa de cerdo (tocino dorsal)	7.7	2.9	88.7	0.7	812

Fuente: FAO, 2014

En los últimos años, la carne de cerdo ha sido sometida a varios cambios influenciados principalmente por las exigencias del mercado. Estos cambios se han dirigido a la producción de carne más magra y saludable (Wood *et al.*, 2004). Dado que una gran proporción de la ingesta de grasas saturadas en la sociedad occidental proviene de los alimentos de origen animal, se espera que la producción de carne con un perfil lipídico más insaturado tenga un impacto positivo sobre la salud humana. Sin embargo, al modificar la fracción de lípidos de la carne de cerdo se afecta su calidad general (Cardenia *et al.*, 2011), específicamente el mayor grado de insaturación en los lípidos aumenta la susceptibilidad a la oxidación de la carne (Boselli *et al.*, 2010). En la Tabla 2 puede apreciarse la composición lipídica de la carne de cerdo de machos y hembras, y como varía en función del músculo. En la misma tabla también puede observarse como la proporción de ácidos grasos insaturados es mayor en cerdo que en ganado bovino, y comparable con la de Antílope eland (Mas *et al.*, 2011; Bartoň *et al.*, 2014).

2.3.2 Calidad Microbiológica de la Carne de Cerdo

La carne fresca es un producto alimenticio altamente perecedero que, a menos que no se tengan las correctas condiciones de procesado, empacado, almacenado y distribución, puede deteriorarse rápidamente y convertirse en un riesgo para la salud debido al crecimiento microbiano (Mataragas *et al.*, 2008).

Existen varias fuentes de contaminación potencial para la carne, éstas pueden presentarse, previo al sacrificio, en el sacrificio y durante su comercialización. La superficie del animal que se encuentran en contacto con el medio ambiente, previo al sacrificio (piel y heces), es una fuente potencial de contaminación, pues albergan una gran variedad de microorganismos; durante el sacrificio, son las condiciones del rastro las que pueden permitir o minimizar los riesgos de contaminación, y durante la comercialización los principales puntos de riesgo son el vehículo utilizado para el transporte de la carne, el aire en la salida y el suelo del punto de venta (Kumar *et al.*, 2014).

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos (%) de grasa intramuscular de cerdos, machos castrados y hembras, de craza York, antílope eland (*Taurotragus oryx*) y ganado vacuno fleckvieh (*Bos taurus*). (Mas *et al.*, 2011; Bartoň *et al.*, 2014)

Ácidos grasos	M. Longissimus thoracis		M. Semimembranosus		M. Longissimus lumborum	
	Cerdos machos castrados	Cerdos hembras	Cerdos machos castrados	Cerdos hembras	Antílope eland	Ganado vacuno fleckvieh
14:0	1.12	1.03	1.38	1.26	4.33	3.56
16:0	22.66	22.47	20.65	20.67	24.40	26.90
18:0	12.66	12.90	10.83	10.72	13.10	17.40
18:1, n-9	33.79	32.38	43.38	42.98	23.30	29.70
18:2, n-6	15.64	16.58	13.69	14.30	12.80	8.07
18:3, n-6	0.16	0.19	0.09	0.17	0.22	0.17
18:3, n-3	0.44	0.43	1.07	1.07	2.26	0.91
20:0	0.20	0.19	0.24	0.21		
20:1	0.62	0.61	1.08	1.03		
20:2, n-6	0.37	0.39	0.78	0.80		
20:3, n-6	0.57	0.61	0.09	0.11	0.65	0.46
20:4, n-6	3.96	4.54	0.35	0.30	7.10	2.02
20:3, n-3	0.12	0.12	0.21	0.21		
20:5, n-3	0.19	0.21	ND	ND	0.10	0.19
EPA						
22:6, n-3	0.21	0.24	ND	ND	0.72	0.020
DHA						
AGS ^b	36.80	36.86	33.48	33.31	45.43	51.39
AGMI ^b	41.51	39.79	50.23	49.70	27.28	34.97
AGPI ^b	21.68	23.34	16.28	16.98	27.28	13.62
AGPI/AGS	0.60	0.66	0.49	0.51	0.60	0.27
n-6/n-3	20.77	22.23	11.27	11.60	5.04	6.08

ND: no detectado

b: AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados

En el caso de los microorganismos deteriorativos como *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas spp.*, y bacterias ácido lácticas, su crecimiento provoca que la carne se considere no apta para el consumo humano. Pero en el caso de los agentes patógenos tales como *E. coli 0157:H7*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*, pueden crecer y causar enfermedades, ya sea por la ingestión de las propias células bacterianas o por las toxinas que producen (Reuben *et al.*, 2003). Existen varios informes sobre brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) a causa del consumo de carne (Lunden *et al.*, 2003; Reuben *et al.*, 2003; Prakash *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2014).

Los microorganismos deteriorativos actúan sobre la carne durante su almacenamiento, provocando olores y sabores desagradables. Lo anterior es debido a la oxidación de lípidos y a la proteólisis. Así, el potencial deteriorativo de *Brochothrix thermosphacta* es el resultado no sólo de la digestión de carbohidratos, sino también de su actividad proteolítica. Esto es independiente de la temperatura de almacenamiento del producto y del método de envasado. Esta bacteria muestra actividad proteolítica no sólo durante las interrupciones de la cadena de frío, sino también a la temperatura establecida de refrigeración (4 ° C). También se ha observado la acumulación de productos derivados de la degradación de proteína y de la descarboxilación. Por lo tanto, es de vital importancia evitar la proliferación excesiva *B. thermosphacta* (Nowak y Piotrowska, 2012).

La temperatura de almacenamiento se considera el factor de deterioro más importante en la carne, debido a que afecta la tasa de crecimiento y el número de células bacterianas finales (Mataragas *et al.*, 2006). Por ello, se han observado cambios de las poblaciones microbianas bajo diferentes temperaturas de almacenamiento; por ejemplo, se ha observado que las bacterias psicrófilas Gram positivas, tales como bacterias ácido lácticas (BAL) y Gram negativas, tales como *Pseudomonas spp.* y enterobacterias, podrían desarrollarse en la carne a temperaturas de enfriamiento, es decir 4 °C (Gill y Newton, 1978; Holzapfel, 1998).

Escherichia coli. A pesar de que la mayoría de las bacterias *E coli* son inofensivas, un grupo llamado enterohemorrágica puede conducir a insuficiencia renal y provocar diarreas sangrientas y fuerte dolor abdominal. Un ejemplo del peligro que representa esta bacteria se observó el 27 de mayo del 2011, cuando la Organización Mundial de la Salud (OMS) alertó sobre el brote de una enfermedad intestinal, relacionada con la bacteria *Escherichia coli* en Alemania, que ha causado 276 contagios, de los cuales tres resultaron fatales (OMS, 2014).

E. coli O157:H7 es la causante de por lo menos 60,000 infecciones y 50 muertes cada año en el mundo; también es considerada como una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA), y es la causa más importante de fallo renal en niños. La ingestión de carne sin cocinar o poco cocinada, es la causa más común de infección por esta bacteria, presentándose particularmente en carne molida y procesada en grandes cantidades. Dado que *E coli* se desarrolla en el intestino y se encuentra en el material fecal, el agua es también una fuente potencial para que se presente esta enfermedad (Madigan *et al.*, 2004).

Staphylococcus Aureus. La intoxicación alimentaria estafilocócica es una de las enfermedades más frecuentes transmitidas por los alimentos y representa más una intoxicación que una infección. La enfermedad se debe a la acción de una toxina bacteriana presente en los alimentos, más que al efecto directo de los microorganismos en el paciente. Los alimentos que se contaminan con mayor frecuencia son las carnes elaboradas, como el jamón y el cerdo curados con sal, y los derivados lácteos. El crecimiento de *S. aureus* en las carnes curadas con sal es debido a su capacidad de proliferar en presencia de concentraciones elevadas de sal. Los alimentos contaminados no presentan un aspecto ni un sabor desagradables. El calentamiento posterior de los alimentos provoca la destrucción de las bacterias, pero no inactiva las toxinas termoestables que estén presentes en el alimento (Madigan *et al.*, 2004).

Salmonella. Aunque a veces se le conoce como intoxicación alimentaria, la salmonelosis es una enfermedad gastrointestinal debida a una infección por *Salmonella* transmitida por los alimentos, principalmente de origen animal, como son la carne de pollo, res o huevo. Los síntomas aparecen después de la colonización del epitelio intestinal por el patógeno, estos incluyen un repentino dolor de cabeza, escalofríos, vómitos y diarrea, seguido de fiebre durante varios días. Incluso después de la recuperación, los pacientes presentan a la bacteria en las heces durante varias semanas. La salmonelosis también puede producir septicemia, una infección en la sangre, fiebre entérica o fiebre tifoidea, una enfermedad caracterizada por la infección sistémica y fiebre alta durante varias semanas (Madigan *et al.*, 2004).

Listeria monocytogenes. Este microorganismo es de gran importancia entre los patógenos asociados a los alimentos, particularmente porque se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y ha sido aislada de muchas especies de animales y diferentes alimentos. Se han descrito brotes asociados a ensalada de repollo, quesos no pasteurizados, leche pasteurizada y diversos productos cárnicos, entre otros (Reuben *et al.*, 2003). Su incidencia en productos cárnicos puede deberse a la utilización de equipos deficientemente sanitizados (Lunden *et al.*, 2003).

Dada la importancia que tiene la calidad microbiológica de la carne, y sus posibles efectos negativos sobre la salud pública, la normatividad mexicana vigente se encarga de definir los límites permisibles de las bacterias más representativas, y de este modo asegurar que la carne para consumo humano no represente un riesgo para el consumidor. A continuación se presenta una tabla donde se resumen, en base a normas, las especificaciones sobre los límites máximos permitidos de las principales bacterias que afectan la calidad de la carne, las cuales son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, bacterias mesofílicas y psicrófilas aerobias en general.

Tabla 3. Límites máximos permitidos por la normatividad mexicana vigente, del contenido microbiano en carne cruda. (Secretaría de Salud, 2014)

Microorganismo	Límite máximo	Norma
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 000 UFC/g*	NOM-034-SSA1-1993
<i>Escherichia coli</i>	1 000 UFC/g**	NOM-194-SSA1-2004
<i>Salmonella spp</i>	Ausente en 25g**	NOM-114-SSA1-1994
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente en 25g**	NOM-143-SSA1-1995
Mesofílicos aerobios	5 000 000 UFC/g o mL*	NOM-034-SSA1-1993
Psicrofílicos aerobios	No reportado en la legislación	

* presente en carne molida o procesada

** presente en carne fresca

2.3.3 Oxidación de Lípidos

La oxidación de lípidos en los productos cárnicos se inicia principalmente en la fracción altamente insaturada de fosfolípidos de las membranas celulares (Boselli *et al.*, 2010; Cardenia *et al.*, 2013). Actualmente se ha dado mucha importancia al estudio de los productos de la oxidación de los lípidos, y su relación con la incidencia de diversas enfermedades crónico degenerativas, y a la pérdida de funcionalidad de la células que puedan generar alteraciones y/o enfermedades tales como cáncer, entre otras (Forester y Lambert, 2014).

Por otro lado, se ha señalado a varios de los productos de la oxidación de lípidos como responsables de olores y sabores rancios, algunos de los cuales son muy reactivos. Los productos primarios de la oxidación de lípidos incluyen compuestos formados durante las etapas de iniciación y propagación temprana, los cuales pueden ser grupos alquilo, alcoxi y radicales peroxi, además de protones extraídos de moléculas vecinas. Otros productos primarios de la oxidación, son los peróxidos, los cuales pueden sufrir una ruptura y formar los productos secundarios de la oxidación; además de compuestos de menor peso molecular que incluyen aldehídos, cetonas y epóxidos. Ejemplos concretos y conocidos de este tipo de compuestos incluyen hexanal, propanal y malondialdehído (Sakai *et al.*, 1998).

La autooxidación de los lípidos ocurre a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres, que incluye las fases de iniciación, propagación y terminación (Figura 9). En la etapa de iniciación (Figura 9-1), el radical lipídico $R\bullet$ se forma a partir del lípido (RH), usualmente por el ataque de radicales, luz, calor, irradiaciones o por trazas de metales. El radical lipídico ($R\bullet$) formado, reacciona rápidamente con oxígeno (Figura 9-2) para formar un radical peróxido ($ROO\bullet$), el cual sustrae un átomo de hidrógeno para formar un hidroperóxido lipídico (ROOH), y un nuevo radical lipídico, que inicia de nuevo la secuencia de propagación (Figura 9-3). De esta manera, muchas moléculas de lípidos pueden ser oxidadas hasta hidroperóxidos por muchas formas de

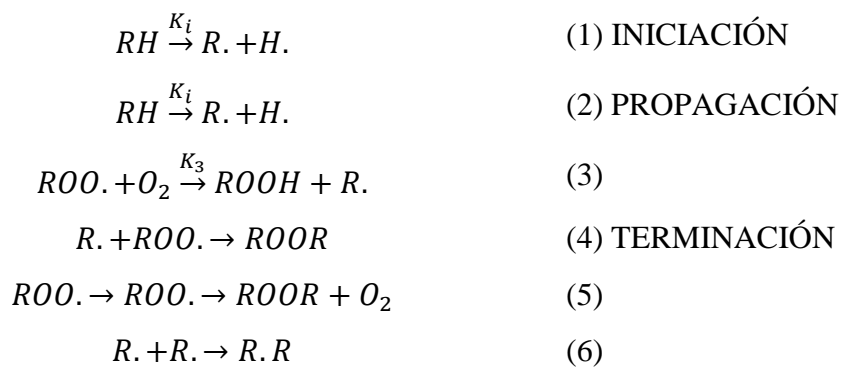


Figura 9. Proceso de autoxidación de los lípidos (Rojano *et al.*, 2008).

iniciación. El ciclo de propagación es interrumpido por las reacciones de terminación (Figura 9-4, 9-5 y 9-6), en las cuales hay consumo de los radicales (Rojano *et al.*, 2008).

Oxidación de la Carne de Cerdo. La oxidación de la carne de cerdo ha sido estudiada de forma exhaustiva por diversos autores. Los principales componentes para que esta reacción se lleve a cabo son: ácidos grasos insaturados, oxígeno y sustancias reactivas al oxígeno, que actúan facilitando que se lleve a cabo la reacción. Aunque esta observación es general para todos los tipos de carne, existen una serie de características inherentes a la carne de cerdo que la predisponen a una oxidación acelerada, como es el perfil de ácidos grasos y el tipo de fibras (Faustman *et al.*, 2010).

En general, la carne de animales no rumiantes contiene mayor concentración de ácidos grasos insaturados, y puesto que la oxidación requiere de este tipo de ácidos grasos, esta reacción se lleva a cabo más rápidamente en carne de cerdo que en la de rumiantes. No obstante, el perfil de ácidos grasos se ha visto modificado a través de los años, ya sea por efecto de la especie, raza, sexo e incluso, en cada músculo. Así por ejemplo, el ganado bovino (*Bos taurus*) presenta un perfil de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de 50.83:35.58:13.58, respectivamente (Bartoñ *et al.*, 2014); mientras que en el cerdo, Mas *et al.* (2011) reportaron valores de 27.58:30.14:42.27, lo cual significa que el cerdo presenta un contenido de ácidos grasos poliinsaturados tres veces mayor en proporción con el ganado bovino, lo que puede justificar por qué la carne de cerdo es más susceptible a la oxidación.

Por otra parte, también se ha demostrado que la estructura y composición de los músculos influyen en que lleve a cabo la degradación oxidativa; así, una mayor proporción de fibras rojas aumenta la susceptibilidad a la oxidación, debido a que contienen más hierro y fosfolípidos que los músculos donde predominan las fibras blancas (Wood *et al.*, 2004). Cuando los productos cárnicos son fortificados con ácidos grasos poliinsaturados n-3 para mejorar su perfil nutricional, también se incrementa la cantidad de sustrato susceptible a la oxidación (Apple *et al.*, 2009).

2.3.4 Color de la Carne

El color de la carne es el criterio principal por el cual el consumidor evalúa su calidad y aceptabilidad. Los consumidores prefieren carne frescas de color rojo brillante, carnes cocidas de color café o ligeramente gris y carnes curadas de color rosa (Faustman y Cassens, 1990). Actualmente se realizan esfuerzos para extender la estabilidad del color de la carne fresca, a través del mejoramiento de la higiene de las instalaciones, los tratamientos antimicrobianos, el control de la temperatura, el tipo de envasado, modificaciones en la dieta de los animales, mejoramiento de la raza y manejo de animales, etc. (MacDougall, 1982; Lawrie, 1985; Hulsegge *et al.*, 2001).

Para entender la mecánica de los cambios de color de la carne en general, y de la carne de cerdo en específico, es indispensable hacer un resumen de los principales factores responsables de esta característica. Varios autores han caracterizado a la mioglobina (Figura 10a) como la hemoproteína responsable del color de la carne, la cual se ve afectada por la oxidación del átomo central de hierro dentro del grupo hemo (Figura 10c) (Brewer *et al.*, 2001; Mancini *et al.*, 2007b; Suman *et al.*, 2011). El color depende entonces, tanto de la concentración como del estado de la mioglobina; estos factores, a su vez, dependen del tipo de fibras musculares, tipo de almacenamiento y oxidación de ácidos grasos presentes en la carne (Ryu y Kim, 2005; Faustman *et al.*, 2010).

Cuando la mioglobina se encuentra en el músculo el átomo de hierro está unido a los cuatro nitrógenos de los pirroles, ocupando cuatro centros de coordinación; sin embargo, en estado ferroso (Fe^{2+}), el hierro puede formar dos centros más; el quinto centro lo ocupa el anillo de una N-histidina (his proximal) que fija al grupo hemo (Figura 10d); el sexto centro, es el lugar al cual se coordina el O_2 . Cuando el hierro del grupo hemo se encuentra en ausencia de O_2 , se conoce como desoximioglobina y muestra un color púrpura; al fijarse el O_2 , toma el nombre de oximioglobina (Figura 10e), que es de color rojo cereza. La unión del O_2 al hierro va acompañada por la transferencia parcial de un electrón del ión ferroso al O_2 , por lo que la estructura se

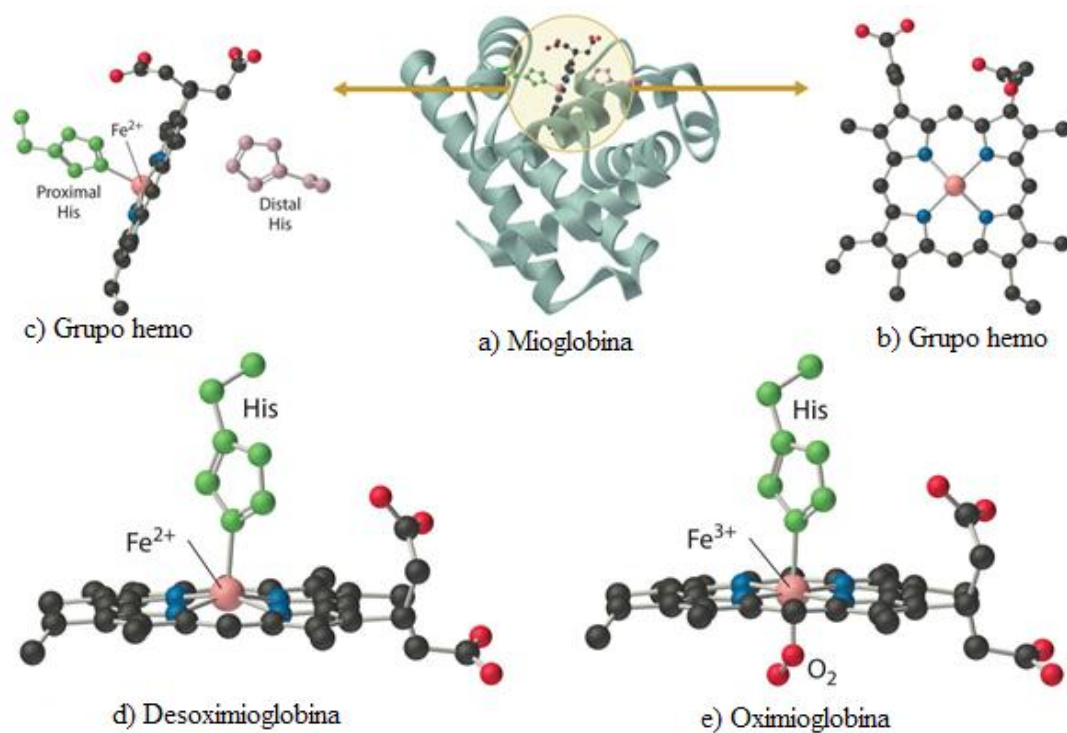


Figura 10. a) molécula de mioglobina mostrando al grupo hemo, b) vista frontal del grupo hemo, c) vista lateral del grupo hemo, incluyendo vista de la histidina (His) proximal y distal, d) grupo hemo de la desoximioglobina y e) grupo hemo de la oximioglobina (Averill y Eldredge, 2011).

describe mejor como un complejo entre el ion férrico (Fe^{3+}) y el anión superóxido (O_2^-) (Berg *et al.*, 2008). En este punto el O_2 puede liberarse y ser sustituido por una molécula de agua, entonces la molécula sufre un cambio de oximioglobina a metamioglobina, transformándose en un color rojo pardo (Faustman *et al.*, 2010).

También es importante considerar el color característico de la carne de cada especie, como se muestra en la Tabla 4. Las diferencias entre cada especie, generalmente se asocian a la concentración de mioglobina en el músculo. Para el caso de la carne de cerdo se han estudiado las diferencias entre músculos tales como *M. Longissimus thoracis* (LT), *Gluteus medius* (GM), *Semimembranosus* (SM), *Biceps femoris* (BF), y *Triceps brachii* (TB), observándose que en orden ascendente $\text{LT} < \text{GM} < \text{SM} \leq \text{BF} < \text{TB}$, lo cual se debe a la concentración de pigmentos y a la presencia de los diferentes tipos de fibras (rojas y blancas) Brewer *et al.* (2001).

Cambios de Color de la Carne. Respecto a la estabilidad del color de la carne, existe polémica en relación a establecer si la tasa de oxidación de la oximioglobina es el factor determinante, o es la tasa de reducción de la metamioglobina (O'Keeffe y Hood, 1982; Ledward, 1985; Faustman *et al.*, 2010). En este sentido se deben tener en cuenta muchos factores que afectan la oxidación de la oximioglobina en la carne, pues de esto puede derivar cualquier cambio de color. Entre los factores que afectan los cambios de color están incluidos: a) temperatura de almacenamiento, b) pH, c) remoción de exudados, d) presión parcial de oxígeno, e) oxidación de los lípidos, entre otros (Renerre y Labas, 1987; Zakrys *et al.*, 2008; Faustman *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013).

La temperatura es uno de los principales factores de decoloración de la carne fresca, ya que de forma general el aumento de la temperatura acelera las reacciones de óxido-reducción de los pigmentos musculares. El almacenamiento de la carne a 0°C permite conservar el color rojo intenso por un periodo de tiempo más prolongado, mientras que un aumento de la temperatura de 0 a 4°C , la velocidad de oxidación del pigmento (mioglobina) se duplica (Renerre y Labas, 1987).

Tabla 4. Color típico de la carne procedente de diversas especies.
Fuente: (Forrest *et al.*, 1979)

Espece	Color	Mioglobina (mg/g)
Vacuno	Rojo cereza brillante	5-10
Tenera	Rosa marrón	1-3
Cerdo	Rosa grisáceo	1-3
Oveja y carnero	Rojo pálido a rojo ladrillo	2
Aves (pollo)	Blanco gris (pechuga)	0.05
	Rojo pálido (muslo)	2
Aves (pavo)	Pechuga	0.25
Pescado	Blanco grisáceo a rojo oscuro	0.3

Una temperatura baja de almacenamiento disminuye la respiración de la carne, por tanto reduce la profundidad a la cual el oxígeno penetra, así como la cantidad de O₂ disuelto en los fluidos de la carne, con lo que disminuye el grado de oxidación de la mioglobina. De modo contrario, un incremento de la temperatura de almacenamiento, disminuye la solubilidad del O₂ en la carne, lo que favorece la disociación del O₂ de la oximioglobina (Rickert *et al.*, 1957) existiendo una mayor tendencia a la oxidación del pigmento (O'Keeffe y Hood, 1982) y un aumento en los procesos de oxidación lipídica (Labuza y Dugan Jr, 1971), contribuyendo así a una mayor decoloración de la carne.

Se cree que el grado de oxidación de la mioglobina disminuye cuando aumenta el pH, logrando mayor estabilidad del color. Renerre y Labas (1987) observaron que un pH bajo favorece la formación de metamioglobina. Un pH bajo propicia la aparición de carnes PSE, cuya característica es que el músculo se vuelva pálido, refleja una gran parte de luz incidente y parece más opaco, además de tener relación con la disminución de la capacidad de retención de agua, lo que a su vez tiene implicaciones en la presencia de características indeseables de textura.

En relación a la remoción de exudados, se han observado cambios en el color de la carne de cerdo, específicamente en *M. Longissimus thoracis y lumborum*, debido al efecto combinado del almacenamiento en refrigeración y congelación, con la remoción o no de exudados, durante siete días. Para el caso de los cortes almacenados en refrigeración, sin la remoción de exudados, se ha reportado un rango de valores de L* de 51.19 a 54.63, a* de 7.98 a 10.24, y b* de 4.17 a 8.42, observándose que los valores de L*, a* y b* disminuyen a lo largo del almacenamiento, sobre todo en las muestras congeladas, mostrando diferencias al final del almacenamiento. Sin embargo, el efecto se minimiza para L* y b*, al remover los exudados del envase, efecto que no se observa para el valor a* (Kim *et al.* (2013).

La presión parcial de oxígeno (pO₂) alta o al vacío, favorece la presencia del ion ferroso en la mioglobina, mientras que la presión baja (no de cero) favorece la formación de metamioglobina. Así entonces, los músculos que contienen mayores proporciones

relativas de fibras rojas, y mayores tasas de consumo de oxígeno, parecen decolorarse más rápidamente. (Faustman *et al.*, 2010).

Algunas investigaciones también relacionan los cambios de color de la carne con el proceso de oxidación de lípidos, dando por resultado un aumento en la decoloración. Zakrys *et al.* (2008) investigaron el efecto de la concentración de oxígeno sobre los indicadores de calidad en carne de bovino empacada en atmósfera modificada con diferentes niveles de oxígeno utilizados en la mezcla de gases, concluyendo que los cambios de color asociados a oximioglobina, hierro hemo, valores de L* y a*, parecen estar relacionados con la oxidación de lípidos y fuertemente correlacionados con la concentración de TBARS. Los mecanismos por los cuales la oxidación de lípidos podría aumentar la oxidación de la mioglobina han sido explicados principalmente en función de la reactividad de los productos primarios y secundarios derivados de los ácidos grasos insaturados (Faustman *et al.*, 2010).

Los cambios de color pueden minimizarse de diferentes maneras, entre las que se encuentra la aplicación de antioxidantes (Mancini *et al.* (2004). Así por ejemplo, Suman *et al.* (2011) probaron la aplicación de quitosano al 1% sobre carne de bovino, observando que la disminución del color rojo (valor a*) fue menor. Otros estudios han encontrado resultados favorables empleando compuestos de origen natural, tales como quitosano (El Ghaouth *et al.*, 1997; Li y Yu, 2001; Coma, 2008), ácido sórbico, ácido benzoico, benzoato de sodio, ácido cítrico (Quintavalla y Vicini, 2002), nisina (Sebti y Coma, 2002), natamicina (Durango *et al.*, 2006); (Fajardo *et al.*, 2010), aceites esenciales de árbol de té (Sánchez-González *et al.*, 2009) y té verde (Almajano *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012; Siripatrawan y Noipha, 2012).

2.3.5 Deterioro de la Calidad de la Carne por Oscurecimiento del Hueso

La coloración grisácea-negra, de la médula ósea es un fenómeno que podría afectar la aceptación por parte de los consumidores de carne fresca, la cual se manifiesta

durante el almacenamiento. El fenómeno de decoloración de la médula ósea se presenta en cortes de carne envasados con alto contenido de oxígeno, y también en cortes empacados en película de cloruro de polivinilo (PVC). Además, el ennegrecimiento del hueso se produce por la acumulación de hemoglobina en las superficies cortadas del hueso, ya que al cortar la carne, este pigmento se libera en la superficie, provocando que con el tiempo y a través de la exposición al aire, la hemoglobina en la superficie del hueso cambie de color de rojo a marrón, e incluso a negro (Gill, 1996).

Otra posible causa del oscurecimiento del hueso puede ser debida a la oxidación de los lípidos, ya que analizando el contenido de éstos en la médula ósea de las vértebras cervicales y lumbares, y el fémur de bovino, se encontró que el contenido de lípidos es menor en la médula ósea del fémur, que en las vértebras cervicales y lumbares. A partir de estos resultados, se ha afirmado que la médula ósea es más parecida al tejido adiposo que a los músculos o al tejido hepático. Por lo anterior, se cree que la oxidación de lípidos puede ser otro mecanismo de oscurecimiento de la médula ósea (Miller *et al.* (1982).

Más recientemente Grobbel *et al.* (2006), analizaron el efecto del tipo de envasado en la decoloración de la medula ósea. En esta investigación se comparó el envase utilizando PVC con el envasado en atmósfera modificada (80% O₂ y 20% CO₂ vs 70% N₂ y 30% CO₂), empacando costillas, escápulas, vértebras torácicas y húmero de bovinos. Los resultados mostraron que la decoloración de la médula ósea se presentó en costillas, escápulas y vértebras torácicas envasadas en PVC o con una atmósfera rica en oxígeno; mientras que los huesos envasados en una atmósfera con un bajo nivel de oxígeno, mostraron una decoloración mínima. Adicionalmente, observaron que la decoloración de la médula ósea no es un problema en el húmero, indicando que la decoloración de la médula ósea puede ser causada por la oxidación de la hemoglobina, pero también puede ser resultado de la oxidación de lípidos, o una combinación de ambos factores.

Para prevenir el oscurecimiento del hueso, se han realizado estudios donde se encontró que el tratamiento de la médula ósea de vértebras lumbares de bovino con 1.5%

o 2.5% de ácido ascórbico, fue efectivo en la reducción del oscurecimiento, lo cual fue debido probablemente a las propiedades antioxidantes del compuesto (Mancini *et al.* (2004). También se ha probado el efecto de la aplicación de ácido ascórbico y eritorbato de sodio a diferentes concentraciones, niveles entre 0.5 y 1.5%, sobre vértebras lumbares de bovino, obteniendo como resultado que el tratamiento con ambos compuestos a mostró la inhibición del ennegrecimiento (Mancini *et al.* (2007a). Así entonces, la aplicación de eritorbato de sodio en la superficie del corte transversal de las vértebras lumbares es tan eficaz como el tratamiento con ácido ascórbico. Existe poca investigación del fenómeno de oscurecimiento del hueso en carne de cerdo.

2.4. Aditivos Antioxidantes y Antimicrobianos

La carne es susceptible tanto al deterioro microbiano como al oxidativo, por lo tanto, es deseable usar uno o combinación de varios conservadores con propiedades que inhiban este deterioro. Mientras la oxidación lipídica contribuye al desarrollo de las características organolépticas inaceptables, el crecimiento microbiano puede causar no tan sólo el deterioro, sino también llegar a causar daños a la salud del consumidor. Con el fin de proteger los lípidos, evitar el deterioro de la apariencia y el crecimiento microbiano, los fabricantes de productos cárnicos han utilizado varios aditivos alimentarios con propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Hoy en día, existe una mayor demanda de productos alimenticios saludables y de origen natural, sin conservadores químicos, lo que resulta en la necesidad de evitar el uso de aditivos sintéticos. Esto ha favorecido el uso de aditivos naturales o métodos alternativos para extender la vida útil y/o mejorar la seguridad alimentaria (Sayas-Barberá *et al.*, 2011).

Entre los compuestos de origen natural con propiedades funcionales en los alimentos se encuentran los polifenoles, entre estos sobresalen los flavonoides, que son metabolitos secundarios de las plantas, los cuales forman parte de la composición de hojas, frutos y semillas. Algunas de las propiedades que se han atribuido a este grupo de compuestos son su capacidad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria,

anticancerígena, como preventivo de enfermedades cardiovasculares, desórdenes neurológicos, obesidad, desórdenes metabólicos, enfermedades óseas y musculares (Almajano *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2010; Forester y Lambert, 2014; Tao y Lambert, 2014).

En base a los diferentes grupos funcionales que presentan, los flavonoides pueden clasificarse en: flavanonas, dihidroflavonoles, flavan-3-oles, isoflavonas, flavonas, flavonoles, antocianidinas y proantocianidinas (Pan *et al.*, 2010) y cuyas estructuras se muestran en la Figura 11.

Katalinic *et al.* (2006) analizaron el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de 70 plantas medicinales, algunas de las cuales fueron *Melissae folium*, *Spiraea herba*, *Uvae ursi folium*, *Rubi fructose folium*, *Salicis cortex*, *Teucrii herba*, *Gerani robertiani herba*, *Thymi herba*, *Rubi idaei folium*, *Serpylli herba*, *Fragariae herba folium*, *Epilobii herba*, *Myrtili fructus*, *Mentha piperita folium*, *Veronicae herba*. Todas las anteriores mostraron un contenido de fenoles totales de entre 502 y 2218 mg equivalentes de catequina por litro de infusión (de mayor a menor por orden de aparición), siendo *Melissae folium* la que presentó el mayor contenido de fenoles totales. En esta investigación también encontraron una alta correlación ($r=0.9825$) entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante, determinado por la capacidad de reducción del ion férrico en plasma (FRAP, por sus siglas en inglés).

Perva-Uzunalić *et al.* (2006) por su parte, analizaron la composición del té verde variedad Fanning Belas, y reportaron un contenido de las principales catequinas presentes en hojas secas, de 191 g/kg. Comparativamente, de acuerdo a los resultados de Katalinic *et al.* (2006) (15 g de hojas secas para hacer un litro de infusión) y Perva-Uzunalić *et al.* (2006), es posible afirmar que el té verde presenta un mayor contenido de catequinas (129%), considerando a la mejor (*Melissae folium*) de las 70 plantas analizadas.

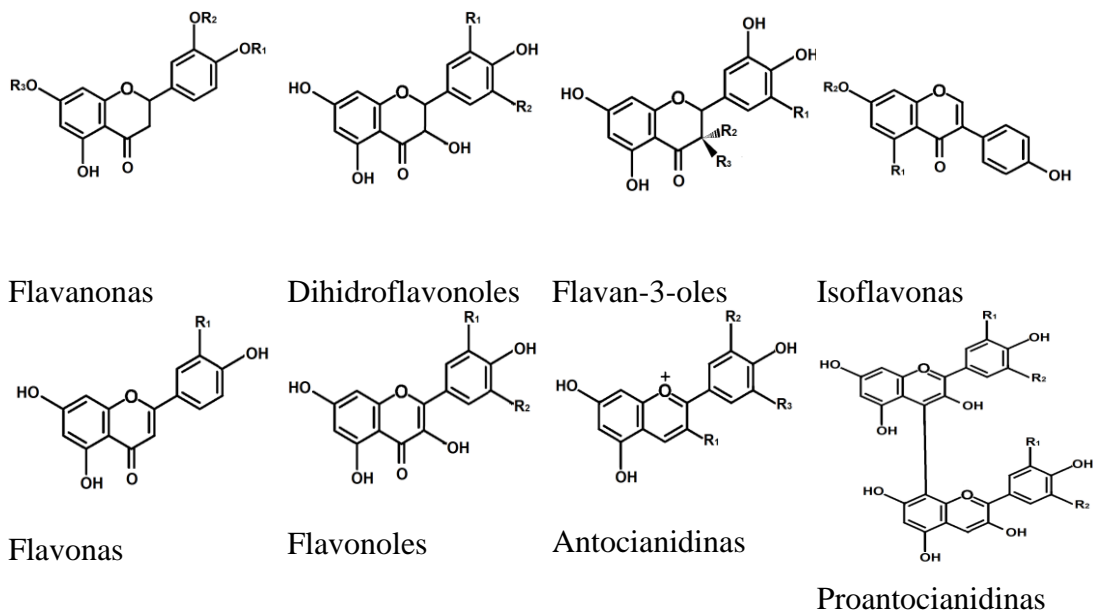


Figura 11. Clasificación de los flavonoides (elaboración propia).

2.4.1 Propiedades del Té Verde

El té es la bebida más popular en el mundo después del agua. Esta bebida proviene de la infusión de las hojas de la planta *Camellia sinensis*, planta que crece principalmente en China y en el sureste de Asia. Específicamente para el té verde, una de las características más importantes es su alto contenido de polifenoles (Figura 11), siendo las catequinas las de mayor proporción. Las cuatro catequinas principales presentes en el té son: galato de epigalocatequina 3 (EGCG), que constituye alrededor del 59% de catequinas totales, epigalocatequina (EGC), alrededor del 19%, epicatequina 3 galato (ECG) cerca del 13.6% y epicatequina (EC) de aproximadamente 6.4% (Figura 12) (Narotzki *et al.*, 2012).

Capacidad antimicrobiana. Las catequinas presentes en el té verde, poseen una fuerte acción bactericida. Arakawa *et al.* (2004) identificaron una especie reactiva al oxígeno como la responsable de la capacidad antibacteriana de las catequinas. Específicamente la EGCG reacciona con el oxígeno disuelto en solución acuosa, dando como resultado la generación de peróxido de hidrógeno. En esta misma investigación también se demostró que la producción de peróxido de hidrógeno derivada de EGCG aumentó al incrementarse el pH, y que el efecto bactericida de EGCG es dependiente de los niveles de peróxido de hidrógeno producidos. Por lo tanto, el peróxido de hidrógeno, que se genera por el EGCG, parece estar implicado en la acción bactericida del té verde (Arakawa *et al.*, 2004).

Por otro lado, Nakayama *et al.* (2013) estudiaron el mecanismo de la actividad antibacteriana de catequinas sobre *Escherichia coli*, y demostraron que los depósitos que contienen EGCG se encuentran sólo en la membrana externa de la célula de esta bacteria. A partir de esta observación, la atención se centró sobre las proteínas de membrana externa como objetivos de EGCG. Aparentemente esta se une a los residuos de arginina presentes en la superficie interna del canal de transporte de la membrana celular, a través de puentes de hidrógeno; dando como resultado la inhibición de la

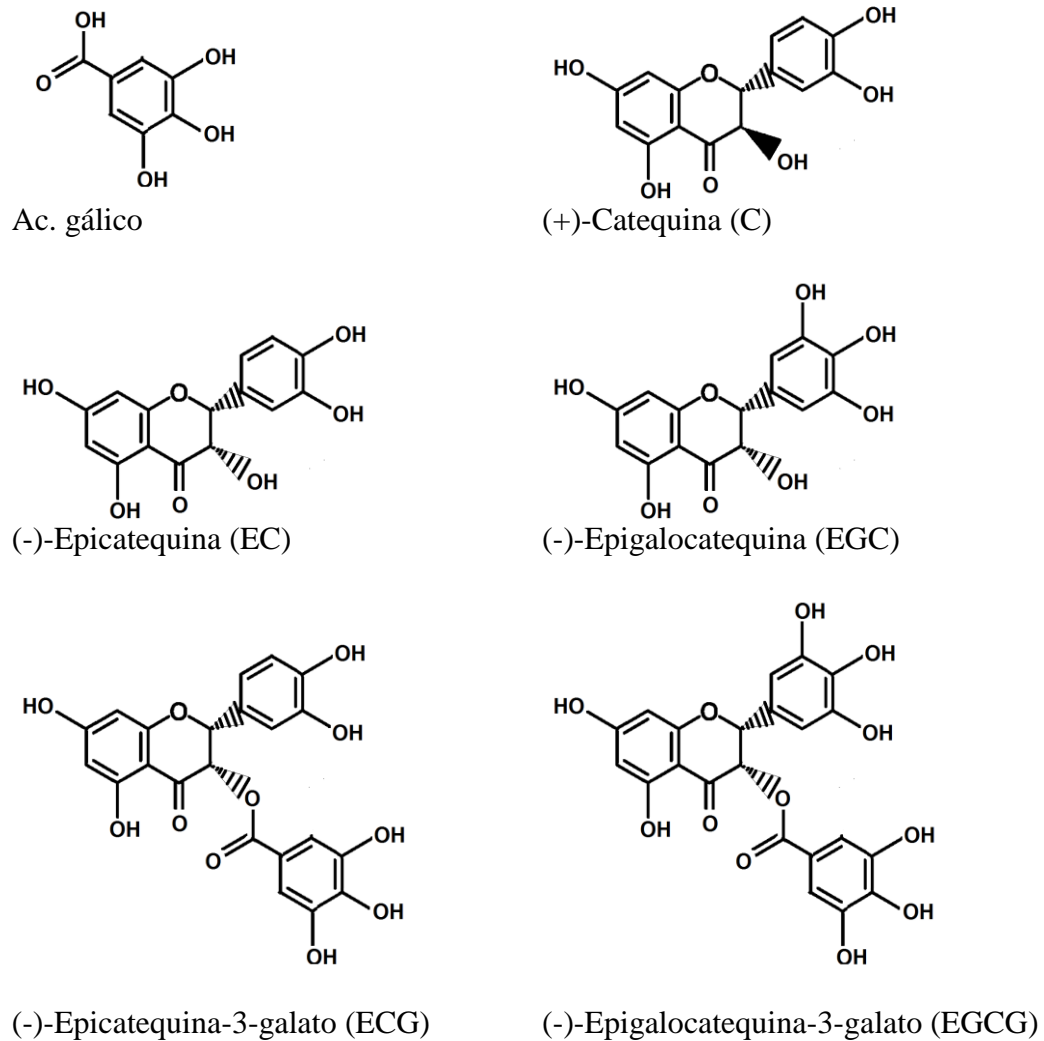


Figura 12. Principales Flavan-3-oles presentes en el té.

función de la proteína porina. Por otra parte, la captación de glucosa por *E. coli* se inhibió en las células tratadas con EGCG. En conjunto, estos resultados sugieren que el EGCG inhibe la función principal de la porina, es decir, el transporte pasivo de pequeñas moléculas hidrofílicas tales como la glucosa, lo que conduce a la inhibición del crecimiento de *E. coli* (Nakayama *et al.*, 2013).

Capacidad antioxidante. Existen varios mecanismos conocidos por los cuales el té verde puede actuar como antioxidante, entre los más estudiados se encuentran la inhibición de compuestos oxidantes mediante la donación de electrones o protones, quelación de metales, inhibición de los factores de transcripción sensibles a la oxidación/reducción y de enzimas pro-oxidantes. Todas estas virtudes se atribuyen a la acción de sus componentes fenólicos, ya que se ha reportado un importante acción antioxidante de las principales catequinas presentes en este tipo de extracto, principalmente de la EGCG (Perva-Uzunalić *et al.*, 2006). Pero la actividad antioxidante del té verde no sólo depende del contenido de compuestos fenólicos, sino también de su tipo (Frei y Higdon, 2003).

Varios estudios han demostrado que las catequinas y polifenoles del té son efectivos inhibidores de especies reactivas al oxígeno y al nitrógeno, como por ejemplo los radicales superóxido (O_2^-), peróxido, oxígeno singlete, peroxinitrito ($ONOO^-$) y ácido hipocloroso. Esta actividad antioxidante puede atribuirse a las diferentes estructuras de los polifenoles (Figura 10), principalmente los grupos hidroxilos (OH), muy abundantes en estos compuestos (Frei y Higdon, 2003; Almajano *et al.*, 2008; Tao y Lambert, 2014).

La capacidad de un compuesto para actuar como un eliminador de radicales libres está parcialmente relacionada con su potencial redox, el cual es una medida de la reactividad de un antioxidante como donador de hidrógenos o electrones bajo condiciones estandarizadas. Un menor potencial redox indica que se requiere menos energía para la donación de hidrógeno o electrones. Las catequinas y teaflavinas del té tienen un potencial redox comparable al del α -tocoferol (vitamina E) que es de 480 mV,

pero mayor al del ascorbato (vitamina C) el cual es de 280 mV, por lo que muestra una capacidad superior como donador de hidrógenos; aunque específicamente la EGCG muestra un potencial redox de 430mV (Frei y Higdon, 2003).

2.4.2 Propiedades del Quitosano

Capacidad antibacteriana. El quitosano inhibe el crecimiento de una gran variedad de hongos, levaduras y bacterias. Sin embargo, hasta el momento no es completamente claro el mecanismo por el cual el quitosano inhibe el crecimiento microbiano. Varios autores coinciden en que existen, no sólo una sino varias posibles teorías que expliquen este mecanismo. Entre ellas destaca la existencia de interacciones entre las cargas (+) del quitosano y las cargas (-) de la membrana celular de los microorganismos, con la consecuente desnaturalización o ruptura de los componentes celulares o proteínicos de los mismos. Generalmente el quitosano se aplica en solución con ácidos, donde sus cargas positivas interactúan con las macromoléculas cargadas negativamente de la superficie celular de los microorganismos, y en posible competencia con el Ca^{2+} por los sitios electronegativos, pero sin conferir estabilidad tridimensional, lo que compromete la integridad de la membrana produciendo por lo tanto su debilitamiento (Bégin y Van Calsteren, 1999).

Otra posible explicación radica en la capacidad del quitosano para actuar como un agente quelante que se une selectivamente a los metales traza, y de este modo inhibe la producción de toxinas y el crecimiento microbiano. También activa varios procesos de defensa en el tejido del huésped, actuando como agente fijador de agua, e inhibiendo varias enzimas, incluso puede unirse al ADN en el núcleo de la célula e interferir con la síntesis de ARNm y proteínas (Shahidi *et al.*, 1999).

La actividad antibacteriana del quitosano y oligómeros de quitosano con diferentes pesos moleculares ha sido cuantificada contra cuatro bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, y *Vibrio*

parahaemolyticus) y siete bacterias Gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, y *L. bulgaricus*). En general, el quitosano (28 a 1671 kDa) mostró mayor actividad antibacteriana que sus oligómeros (1 y 22 kDa), aunque los efectos inhibitorios fueron diferentes en relación con el peso molecular del quitosano y el tipo de bacteria; las mayores inhibiciones se observaron debido a la presencia de compuestos con pesos moleculares intermedios. Respecto al tipo de bacterias, se observaron efectos bactericidas más fuertes sobre las Gram positivas en presencia de 0.1% de quitosano, y la concentración mínima inhibitoria (MIC) del quitosano varió de 0.05% a > 0.1%. Además, se encontró que el tipo de solvente aumenta el potencial de inhibición del quitosano para la mayoría de las bacterias, siendo mejor el ácido acético, que láctico, fórmico, propiónico y ascórbico. Finalmente, se encontró que la actividad antibacteriana del quitosano fue inversamente afectada por el pH (en el rango de pH de 4.5 a 5.9), es decir a menor pH, mayor actividad (No *et al.* (2002).

Actividad antioxidante. La actividad antioxidante del quitosano y sus derivados ha atraído la atención debido a su naturaleza no tóxica y abundancia natural. Yin *et al.* (2004) informaron que el quitosano de bajo peso molecular inhibe la actividad del radical superóxido en razón de 80.3% a 0.55 mg/ml. Jung y Zhao (2012) establecieron los mecanismos antioxidantes del quitosano mediante la determinación de la actividad inhibitoria del radical DPPH, el poder reductor, las capacidades quelante y secuestrante del radical hidroxilo. Además, establecieron que estas capacidades dependen del peso molecular, la concentración y la forma estequiométrica de la molécula de quitosano. En esta investigación, también se identificó la capacidad reductora y la actividad de eliminación de radicales hidroxilo, como los mecanismos predominantes en la actividad antioxidante del quitosano.

En contraste, otros autores adjudican su capacidad antioxidante a la quelación de iones de hierro libre con relación a las hemoproteínas; incluso se ha aprovechado está

capacidad quelante para la purificación de agua (Shahidi *et al.*, 1999; Agulló *et al.*, 2003; Ruiz-Navajas *et al.*, 2013).

2.5. Envasado de la Carne Como Medio de Conservación

El envasado es una parte esencial del proceso y distribución de los alimentos. El Instituto Internacional de Envasado describe en su Glosario de términos de envasado, las funciones que debe tener un envase, sobre esto Robertson (2013) aclara que debe llevar a cabo una o más de las siguientes funciones: 1) contención para la manipulación, transporte y uso, 2) protección y preservación del contenido de acuerdo con el tipo de almacenamiento requerido durante toda la vida útil del producto, 3) identificación del contenido, cantidad, calidad y fabricante, y 4) disponibilidad (PI/INT'L, 1988). Resumiendo, el envase tiene como función la protección y preservación del contenido de acuerdo con el tipo de almacenamiento requerido durante toda la vida útil del producto.

Los sistemas de envasado ofrecen varias posibilidades dependiendo de las condiciones de particulares que se elijan. El método apropiado dependerá de muchos factores, incluyendo el tipo de carne que será envasada (res, cordero, cerdo, ternera), así como la duración del almacenamiento o de su distribución al mayoreo o menudeo (Blakistone, 1998).

2.5.1. Empaques Empleados Tradicionalmente

Emplayado. El emplayado es un método de envasado en el que se utiliza una película plástica de PVC termoencogible o de polietileno de baja densidad (LDPE) que se coloca sobre el producto, el cual, al contacto con calor se contrae, sujetando el producto para impedir que se mueva o sea extraído del empaque. Las grandes ventajas de este tipo de empaque son su bajo costo y la rapidez con la que puede empacarse debido a que no requiere ningún tipo de molde; también permite que el consumidor aprecie completamente el producto o productos, sin tener que extraerlo de su empaque.

Actualmente el LDPE ha demostrado ser material alternativo, viable, y más seguro (MEE, 2004).

Envasado en atmósferas modificadas (EAM). El EAM puede ser definido como la colocación del alimento en un empaque en el cual la atmósfera dentro del mismo ha sido modificada o alterada con el fin de proveer una atmósfera óptima que permita incrementar la vida de anaquel y mantener la calidad del alimento (Robertson, 2013). El EAM es una forma de empacado que involucra la remoción del aire del empaque para remplazarlo con un gas o una mezcla de gases. La mezcla de gases utilizada dependerá del tipo de producto a envasar, pero comúnmente se utiliza N₂, O₂ y CO₂ (Blakistone, 1998). El EAM es usado principalmente para retrasar el deterioro de los alimentos que no se encuentran esterilizados, y aquellos en que su sistema enzimático puede seguir operando. El EAM es siempre utilizado en conjunto con refrigeración (Robertson, 2013).

Empaque al vacío. En el empaque al vacío, generalmente se utiliza una bolsa plástica, de un material o combinación de materiales de baja permeabilidad al oxígeno, donde se extrae el aire dentro del empaque con el propósito de mejorar la vida útil del alimento. La atmósfera alrededor del alimento deberá contener menos del 1% v/v de oxígeno, y al empacar al vacío la carne, el oxígeno residual es rápidamente consumido por el músculo, lo que conlleva a la reducción de las reacciones de oxidación de lípidos y de la mioglobina, así como a la disminución del crecimiento microbiano. En la carne fresca la ausencia de oxígeno puede reducir la formación de oximioglobina, debido a la ausencia de oxígeno, provocando que la carne no adquiera el característico tono rojo brillante, lo que puede provocar el rechazo por parte del consumidor (Robertson, 2013).

2.5.2. Materiales de origen biológico para empaques

Hace más de cuatro décadas E. F. Schumacher escribió que uno de los más funestos errores de nuestra época consiste en creer que “el problema de la producción” se ha resuelto; hoy en día este argumento tiene más vigencia que nunca, ya que el problema no radica en la eficiencia que se pueda llegar a lograr, sino en el manejo sustentable de los recursos (Schumacher, 2011), siendo esto un claro ejemplo de lo que pasa con la industria del envasado.

Con excepción del papel, los materiales utilizados para el envasado de los alimentos se basan tradicionalmente en materia no renovable, más específicamente materiales de origen fósil, es decir, petroquímicos. La producción mundial de plásticos basados en materiales petroquímicos excede los 250 millones de toneladas anuales, de éstas aproximadamente el 40% se destina a envases, es decir que 100 millones de toneladas de materiales fabricados de fuentes no renovables son introducidos al mercado (Robertson, 2013) y generalmente a la basura, lo cual genera un serio problema ambiental, pero además demuestra un comportamiento irracional, que se basa en un consumo desproporcionado, puesto que el gasto de materia prima es mucho más acelerado que su renovación (Schumacher, 2011).

En este concepto surgen los envases basados en materiales biológicos; al respecto, Robertson (2013) describe a estos materiales como recursos primarios y anualmente renovables; esta definición excluye al papel, pues los árboles de donde provienen tienen un ciclo de renovación de entre 25 y 65 años, dependiendo de la especie y el clima. Entre los envases con base en materiales biológicos se encuentran los recubrimientos comestibles, los cuales pueden clasificarse de acuerdo al tipo de material, en: polisacáridos, lípidos, proteínas y materiales compuestos. Entre los polisacáridos empleados usualmente como recubrimiento comestible se encuentran almidón, celulosa, hemicelulosa, gomas y quitosano.

2.6. Recubrimientos Comestibles

Los recubrimientos o cubiertas comestibles son un tipo de envase, que se distingue por su modo de aplicación sobre el alimento. En general un envase comestible se define como una película, una lámina, una capa fina o un recubrimiento que forma parte integral de un alimento y se ingiere junto con este (Debeaufort *et al.*, 1998).

Un recubrimiento comestible se distingue de otros envases comestibles por ser una matriz fina y continua que se aplica sobre la superficie del alimento mediante la inmersión o aspersion de la solución formulada. Una de las ventajas de la aplicación de los recubrimientos comestibles es la regulación del intercambio de gases con el producto, así como el acarreo y liberación controlada de sustancias activas, que pueden ayudar a mejorar la calidad del producto (Robertson, 2013).

Las cubiertas comestibles pueden clasificarse en tres grandes grupos, de acuerdo al tipo de material que los constituyen; a base de lípidos, proteínas y polisacáridos, aunque también la combinación de dos o más tipos de materiales en una misma cubierta. Entre las cubiertas basadas en polisacáridos se encuentran las formadas por alguno o algunos de los siguientes materiales: almidón, alginato, carragenina, derivados de la celulosa, pectinas, quitina y quitosano (Gennadios *et al.*, 1997).

2.6.1 Cubiertas Comestibles de Quitosano

El quitosano es un polisacárido policatiónico natural derivado de la quitina, la cual es encontrada en el exoesqueleto de crustáceos, en la cutícula de los insectos y en la pared celular de los hongos. Las películas de quitosano son biodegradables, biocompatibles, flexibles, durables, tenaces y resistentes a la ruptura; tienen valores moderados de permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua, además de inhibir el crecimiento microbiano (Agulló *et al.*, 2003). Así también ha demostrado actividad antimicrobiana sobre bacterias, hongos y levaduras; además, una de sus propiedades más

importantes como cubierta comestible, es su habilidad como acarreador de compuestos activos (Bégin y Van Calsteren, 1999).

El quitosano químicamente es una molécula formada por 2-acetamido-2-deoxy-b-D-glucosa, y unida por enlaces β 1-4 (Figura 13a). Su estructura es muy similar a la de la quitina pero con sus monómeros desacetilados (Figura 13b). Muchas de las propiedades físicas y químicas del quitosano están relacionadas con el grado de acetilación y disociación (Falguera *et al.*, 2011).

Entre los antimicrobianos utilizados para fabricación de películas y cubiertas comestibles se encuentran los ácidos sórbico, benzoico y cítrico, así como benzoato de sodio (Quintavalla y Vicini, 2002), nisina (Sebti y Coma, 2002), natamicina (Durango *et al.*, 2006; Fajardo *et al.*, 2010), aceites esenciales de árbol de té (Sánchez-González *et al.*, 2009), quitosano (El Ghaouth *et al.*, 1997; Li y Yu, 2001; Coma, 2008) y aceites esenciales (Atarés *et al.*, 2010).

2.6.2 Cubiertas Comestibles de Quitosano Adicionadas con Té Verde

La incorporación de extracto de té verde a la matriz de quitosano puede afectar las propiedades físicas del recubrimiento. Wang *et al.* (2013) probaron los efectos de añadir diferentes concentraciones (0-40%) de polifenoles de té ($\leq 90\%$ de EGCG) sobre una película de quitosano. En este estudio se comprobó que hay una reducción significativa de alrededor del 50% de la permeabilidad al vapor de agua de la película por efecto de adición de estos polifenoles.

Siripatrawan y Noipha (2012) elaboraron una cubierta comestible a base de quitosano y té verde, la cual fue aplicada sobre la superficie de salchichas de cerdo, y monitoreando los cambios durante su vida de anaquel. En la Figura 14 se muestran los cambios en la microbiología de las salchichas, observándose un menor crecimiento microbiano en el tratamiento donde se aplicó una cubierta comestible de quitosano y té.

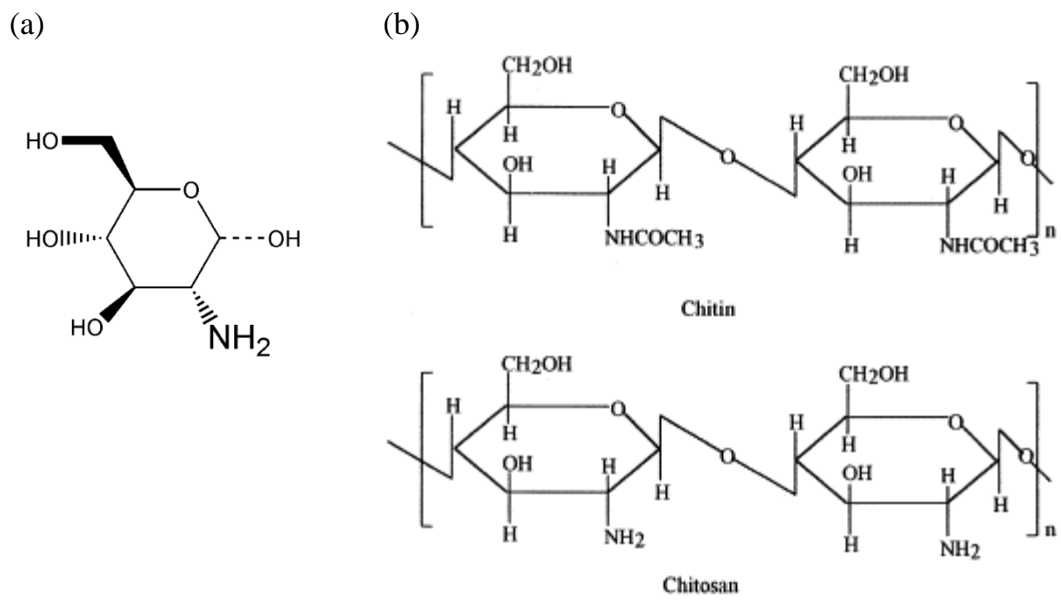


Figura 13. Estructura de la glucosamina, monómero del quitosano (a) y representación química de la estructura de la quitina y el quitosano (b) (Pillai *et al.*, 2009).

En la Figura 15 se muestra la evolución de las características sensoriales de los diferentes tratamientos estudiados por Siripatrawan y Noipha (2012), donde se puede observar que entre los tratamientos, el que incorporó té verde a la película de quitosano, fue el que mostró mejor aceptabilidad en aroma (Figura 15a), menor decoloración (Figura 15b), menor formación de grumos (Figura 15c) y una mayor aceptabilidad global (figura 15d).

En otro estudio, Li *et al.* (2012) aplicaron un tratamiento por inmersión en solución de polifenoles del té 0.2% (p/v), a (4°C) por 60 min sobre corvina amarilla (*Pseudosciaena crocea*). Posteriormente, los peces se recubrieron de forma individual mediante la inmersión en solución de quitosano durante 20 min, y se dejaron reposar a 4°C con el fin de formar los recubrimientos comestibles. Los análisis microbiológicos y sensoriales demostraron que la inmersión en polifenoles del té en combinación con una capa de quitosano fue eficaz para la conservación durante almacenamiento refrigerado, pudiendo extender la vida útil del pescado de 8 a 10 días en comparación con el grupo control.

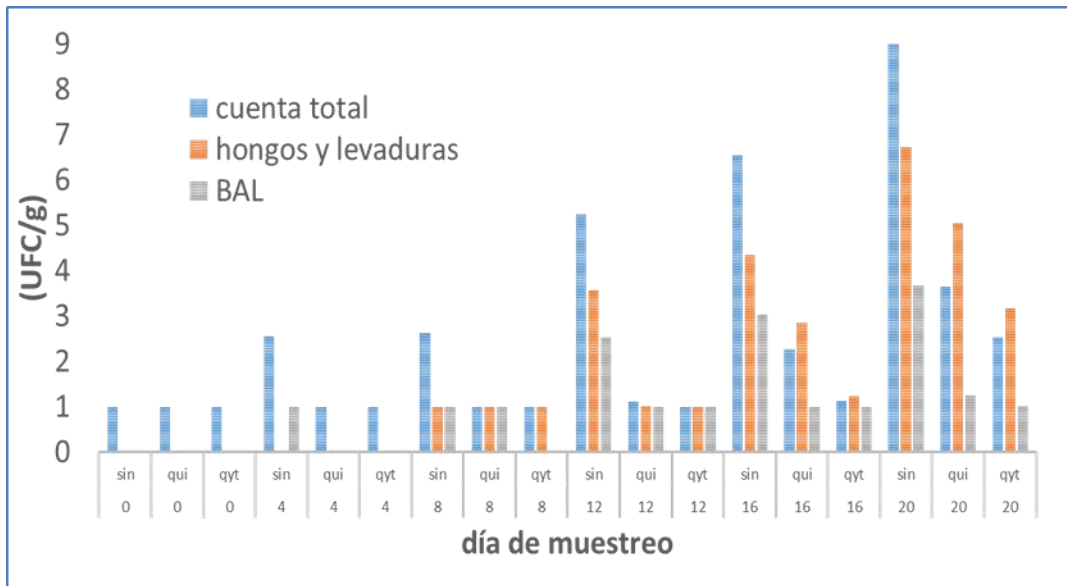


Figura 14. Evolución de la carga microbiológica de salchichas de cerdo sin recubrimiento (sin), con recubrimiento de quitosano (qui) y con recubrimiento de quitosano y té verde (qyt) a los 0, 4, 8, 12, 16 y 20 días de almacenamiento a 4 °C (Siripatrawan y Noipha, 2012).

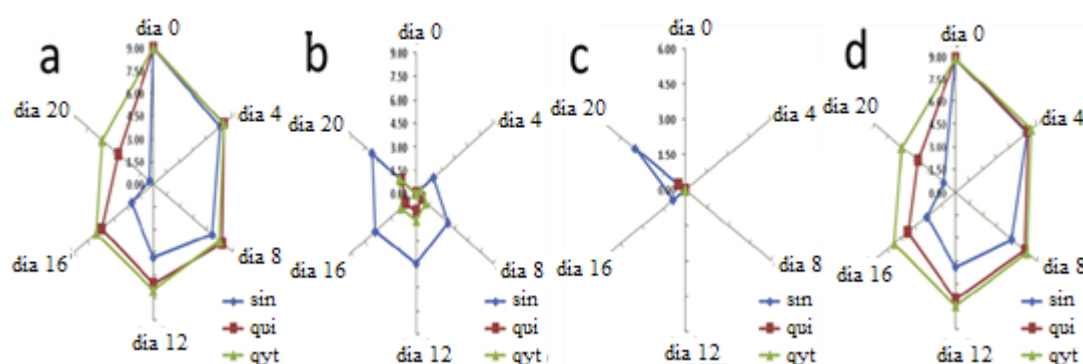


Figura 15. Evaluación sensorial de salchichas de cerdo sin recubrimiento (sin), con recubrimiento de quitosano (qui) y con recubrimiento de quitosano y té verde (qyt) a los 0, 4, 8, 12, 16 y 20 días de almacenamiento a 4 °C (Siripatrawan y Noipha, 2012).

III. HIPÓTESIS

La aplicación de un recubrimiento comestible con base de quitosano y adicionado con extracto de té verde, prolonga la vida de anaquel de la carne de cerdo fresca.

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer el efecto de la aplicación de un recubrimiento comestible con base de quitosano y adicionado con extracto de té verde, sobre la vida útil de la carne de cerdo fresca.

Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones de elaboración de un extracto de té verde soluble en solución de quitosano.
2. Determinar la concentración de té verde óptima para generar un recubrimiento comestible.
3. Evaluar las propiedades mecánicas del recubrimiento comestible a base de quitosano y té verde.
4. Determinar la capacidad antioxidante y antimicrobiana del recubrimiento comestible a base de quitosano y té verde.
5. Evaluar los cambios en las características fisicoquímicas y microbiológicas de carne de cerdo fresca con hueso, durante su almacenamiento a 0°C, por efecto de la aplicación del recubrimiento comestible de quitosano y té verde.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en dos etapas y de acuerdo a los objetivos específicos planteados. La primera etapa (I) abarcó la elaboración y evaluación de la cubierta comestible; mientras que la segunda etapa (II) consistió en la aplicación del recubrimiento en la carne fresca de cerdo y evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas. En la Figura 16 se presenta el esquema de trabajo planteado.

Para el desarrollo de la etapa I se adquirió un extracto de té verde comercial del laboratorio Rosa Elena Dueñas, S.A. de C.V. (REDSA), al que se denominó extracto industrial (EI), de donde se tomaron algunas características que se presentan en la Tabla 5. De forma paralela se adquirieron hojas secas de té verde de la marca Zea Tea®, a partir de las cuales se obtuvo un extracto, el cual se denominó extracto experimental (EE). Una vez elaborado el extracto experimental, se determinó la capacidad antioxidante y antimicrobiana de ambos extractos, para posteriormente ser utilizados en el desarrollo de los recubrimientos con base de quitosano (marca sigma-aldrich® con un grado de desacetilación entre 75 y 85 % y una viscosidad de entre 200 y 800 cps al diluir 1% de quitosano en ác. Acético al 1%), los cuales fueron analizados en cuanto a color, propiedades mecánicas, capacidad antioxidante y antimicrobiana; y una vez obtenidos los resultados, se seleccionó el más adecuado para su utilización en la etapa II.

En la etapa II se aplicó el recubrimiento seleccionado sobre carne fresca con hueso (chuletas de cerdo). En las muestras, con y sin recubrimiento, se evaluaron los cambios de color, pH, oxidación de lípidos, y se cuantificó el crecimiento de microorganismos psicrófilos y mesófilos aerobios durante su almacenamiento en refrigeración.

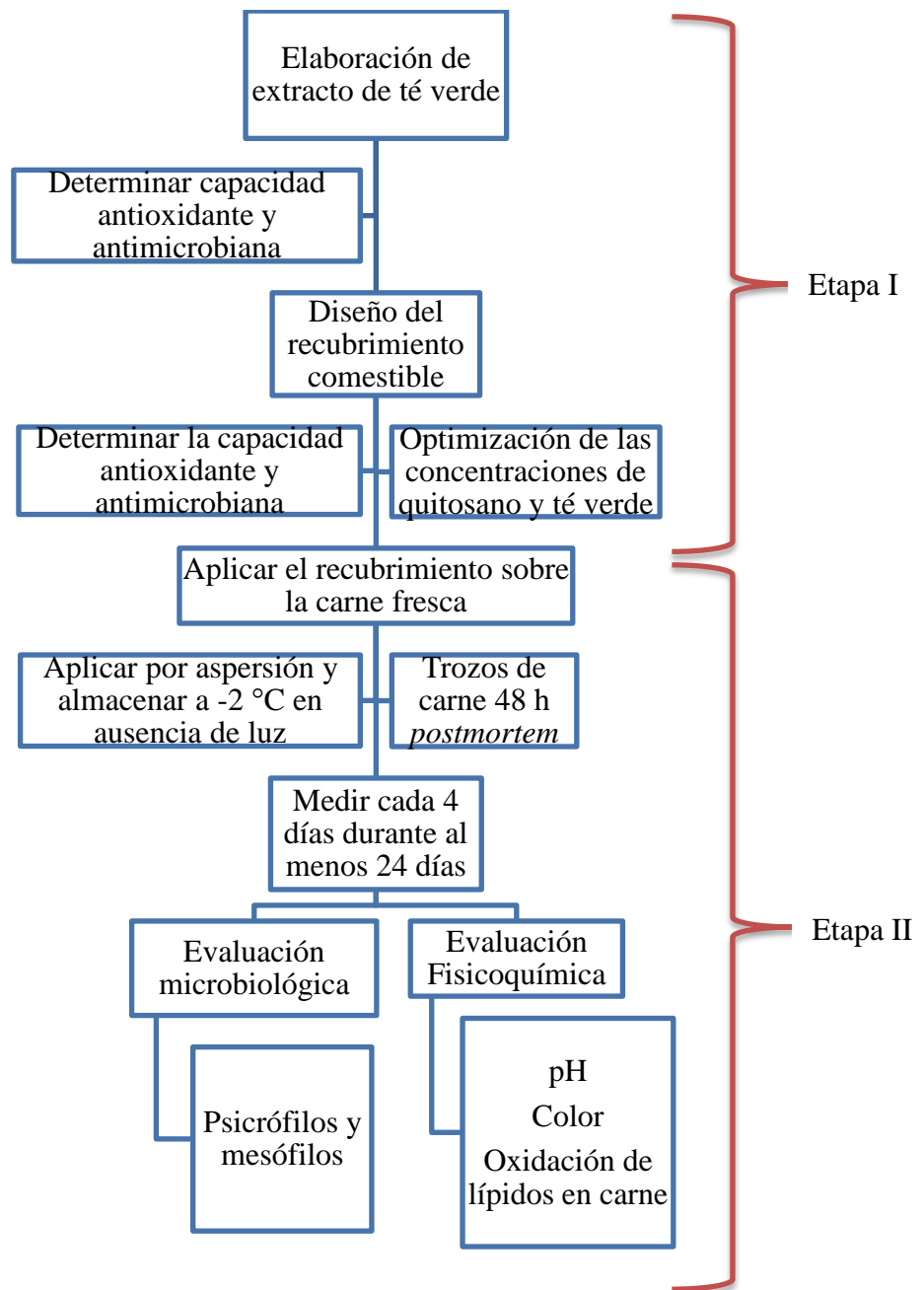


Figura 16. Esquema de trabajo y parámetros a medir.

Tabla 5. Componentes principales del extracto industrial del laboratorio REDSA.

Solvente de extracción:	Agua
Fenoles totales:	51.40%
Catequinas:	39.60%
EGCG:	20%
Cafeína:	6%

4.1. Etapa I

4.1.1 Elaboración del Extracto Experimental

Con las hojas secas de té verde de la marca Zea Tea®, se elaboró una infusión, utilizando como solvente agua destilada a 80°C, dejando en maceración por 20 min en una proporción de 1:40 (p/v). Esta infusión posteriormente se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min, y a continuación el sobrenadante se filtró en papel Whatman 1. El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio a vacío (modelo RE 121, marca BÜCHI), manteniendo una temperatura constante de 40°C. Enseguida este extracto concentrado se le extrajo humedad en un liofilizador de laboratorio (modelo SEDSF12, Samwon Co. Ltd., Busan, Korea), para finalmente ser almacenados en envases de vidrio ámbar con tapa de rosca a temperatura de refrigeración (Perva-Uzunalic, 2006).

4.1.2 Desarrollo de Películas y Recubrimientos

Para el desarrollo de películas y recubrimientos, en esta primera etapa se formularon 9 soluciones a base de quitosano y diferentes concentraciones de extracto de té verde, utilizando como solvente una solución de ácido acético al 1%. La concentración de quitosano utilizada fue del 1%, mientras que las de los extractos fueron de 0.05, 0.1, 0.5 y 1%; adicionalmente, se elaboró un control sólo a base de quitosano (Tabla 6). De cada solución preparada se tomaron 20 g y se vertieron en una placa Petri de 10 cm de diámetro, las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su deshidratación. Una vez secas, se separaron cuidadosamente de la placa para llevar a cabo los análisis correspondientes a la caracterización de las propiedades mecánicas (módulo de elasticidad, límite elástico, esfuerzo máximo, esfuerzo de ruptura y porcentaje de elongación), color y capacidad antioxidante (Figura 17).

Tabla 6. Formulación de soluciones de quitosano y té verde para recubrimientos.

Tipo de extracto	Adición del extracto (p/v, %)	Adición de quitosano (p/v, %)	Tratamientos
--		1	Control
EE	0.05	1	EE 0.05%
	0.1	1	EE 0.1%
	0.5	1	EE 0.5%
	1.0	1	EE 1.0%
EI	0.05	1	EI 0.05%
	0.1	1	EI 0.1%
	0.5	1	EI 0.5%
	1.0	1	EI 1.0%



Figura 17. Películas desarrolladas con diferentes concentraciones de té verde (de menor a mayor concentración de izquierda a derecha).

4.1.3 Capacidad Antioxidante de Extractos y Recubrimientos

Con la finalidad de tener una idea objetiva de la capacidad antioxidante de cada tratamiento, se midió el porcentaje de inhibición del radical DPPH, contenido de fenoles totales y flavonoides, tanto de extractos como de recubrimientos. Cabe mencionar que para realizar las mediciones, las películas se re disolvieron en ácido acético al 1% en una proporción 1:100 (p/v). A continuación se detalla de forma puntual cada una de estas metodologías.

Inhibición del radical DPPH (%). Para medir el porcentaje de inhibición del radical DPPH, primeramente se disolvieron 0.003 g de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil en 25 mL, usando etanol como solvente; posteriormente se agitó por sonicación durante 5 min y se midió la absorbancia a 517 nm. Los valores de absorbancia debieron encontrarse entre 0.9 y 1.0, ya que de no ser así, la absorbancia se ajustó añadiendo soluto o solvente, según fue el caso. De forma paralela, la muestra se diluyó a 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL con etanol, y cada una de estas soluciones se midió individualmente.

En tubos para centrifuga de 1.5 ml se agregaron 500 µL de la muestra a medir. Igualmente se tuvieron tubos para un control positivo y un control negativo, los cuales fueron preparados mediante la adición de 500 µL de ácido ascórbico a una concentración de 25 µg/mL, y 500 µL de etanol, respectivamente. Cabe señalar que para la preparación del control positivo se disolvieron 5mg de ácido ascórbico puro en 1 mL de una mezcla de agua-etanol (7:3, v/v), mezcla que se sonicó por 2 min. A partir de esa solución se tomaron 40 µL que se diluyeron en 4 mL de etanol puro.

A continuación a los 500 µL de cada uno de los tratamientos y controles preparados anteriormente en sus respectivos tubos, se agregaron 500 µL de la solución de DPPH, se homogenizó con ayuda de un Vortex durante 1 min, y se incubaron por 20 min a 50°C, para finalmente leer la absorbancia a 517 nm.

El cálculo del porcentaje de inhibición se realizó usando la ecuación que se presenta a continuación:

$$\% \text{ de inhibición del radical DPPH} = \left(1 - \left(\frac{m}{C^-} \right) \right) * 100$$

Donde m se refiere a la absorbancia de la muestra y C^- representa la absorbancia del control negativo, es decir el DPPH con etanol. El porcentaje de inhibición del control positivo, es decir el ácido ascórbico, se observó cercano a 96%, lo que asegura que la técnica se llevó a cabo correctamente.

Cuantificación de fenoles totales. Para cuantificar el contenido de fenoles totales se aseguró que la dilución de la muestra tuviera una lectura menor a 2.0 de absorbancia. Para ello se realizaron las diluciones correspondientes y se midió un blanco de reactivos con etanol. De cada muestra o dilución se colocaron 50 μL en tubos de 1.5 mL y se agregaron 400 μL de agua y 200 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 0.25 N, previamente homogenizado en Vortex por 30 seg y sonicando durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 300 μL de Na_2CO_3 al 5% y 400 μL de agua, se dejó reposar durante 1 h en completa oscuridad y se leyó la absorbancia a 750 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo.

En el caso de la curva de equivalencia, se usaron concentraciones desde 0 hasta 1000 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico en etanol, proporcionando el mismo tratamiento que a las muestras. La técnica se realizó en condiciones de oscuridad apoyados por luz roja, para evitar la oxidación de los grupos fenólicos por efecto de la luz.

Cuantificación de flavonoides. Para cuantificar el contenido de flavonoides se aseguró que la dilución de la muestra tuviera una lectura menor a 2.0 de absorbancia. Para ello se realizaron las diluciones correspondientes y se midió un blanco de reactivos con etanol. De cada muestra o dilución se colocaron 50 μL en tubos de 1.5 mL y se agregaron 650 μL de metanol, 50 μL de AlCl_3 al 2.5%, 650 μL de metanol, los cuales fueron

homogenizados en Vortex por 30 seg al agregar cada reactivo, para finalmente dejarlos reposar durante 30 min en completa oscuridad. Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia a 412 nm. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de rutina por gramo.

En el caso de la curva de equivalencia, se usaron concentraciones desde 0 hasta 1000 µg/mL de rutina en etanol, y se les dio el mismo tratamiento que las muestras. La técnica se realizó en condiciones de oscuridad apoyados con luz roja, para evitar la oxidación de los flavonoides por efecto de la luz.

4.1.4 Capacidad Antimicrobiana de Extractos y Recubrimientos

Para medir la capacidad antimicrobiana de los extractos (EE y EI) se evaluó la cinética de crecimiento de cuatro diferentes microorganismos. Estas bacterias fueron dos bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella choleraesuis*. ATCC 10708) y dos bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213B y *Listeria innocua* ATCC 33090). Las cuatro cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Química, Bioquímica y Biotecnología de Productos Lácteos, perteneciente al CIAD. La metodología utilizada para estas dos evaluaciones fue de microdilución en microplacas de 96 pocillos, descrita por Wiegand *et al.* (2008).

Para llevar a cabo la medición del crecimiento microbiológico se emplearon microplacas de 96 pocillos distribuidos en 12 carriles y 8 filas, como se muestra en la Figura 18. El medio nutritivo utilizado fue caldo infusión cerebro corazón (BHI), marca BD. Primeramente, se depositó el caldo BHI estéril en los pocillos, 50 µL en los carriles del 1 al 11 y 100 µL en el carril 12 que sirvió como blanco negativo, pues no se inocularon microorganismos en este carril. Los extractos se diluyeron a una concentración del 1% en solución salina estéril al 0.85% (p/v) y se vertieron 50 µL en el carril 1 provocando una mezcla con el medio nutritivo, dejando una concentración final de 0.5% de extracto. A continuación, se tomaron 50 µL del carril 1 y se depositaron en

el carril 2 de su fila respectiva, con el fin de diluir la concentración del extracto al 50%, es decir 0.5% de extracto. Este procedimiento se repitió hasta el carril 8, del cual se tomaron 50 μ L y se desecharon. De este modo los pocillos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 tenían 50 μ L con concentraciones de 0.5, 0.25, 0.125, 0.62, 0.31, 0.15, 0.07 y 0.03% de extracto, respectivamente. En los carriles 9 y 10 se realizaron las mismas diluciones que en las filas, pero en forma vertical. Para el caso de los recubrimientos, estos fueron añadidos a los pocillos en cantidades de 50 μ L y se mezclaron con 50 μ L del medio de cultivo, después de ser homogenizado, se retiraron 50 μ L de la mezcla y se procedió a colocar el microorganismo, en este caso no se hicieron diluciones.

El microorganismo respectivo fue diluido en solución salina estéril y ajustado a una absorbancia entre 0.8 y 1.0. Finalmente, se depositaron 50 μ L del microorganismo ajustado correspondiente, a los carriles 1 a 8 y 11. En los carriles 9 y 10 se les depositaron 50 μ L de solución salina estéril. Una vez terminada la inoculación, la placa se colocó en incubación a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, y se midió la absorbancia a los 620 nm a las 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 y 48 h.

4.1.5 Medición de Color de las Películas

El color de las películas se determinó utilizando un espectrofotómetro de reflectancia Minolta modelo CM508D, previamente calibrado. El iluminante utilizado fue el F2, con un ángulo de observador de 10° y una relación iluminante observador de 0/45. Los parámetros medidos fueron los establecidos por la CIE (Comisión Internacional de l'Eclairage, 1978), los cuales corresponden a los valores L^* (luminosidad), a^* (índice de rojo), b^* (índice de amarillo), C^* (chroma) y h^* (hue). La calibración se realizó mediante un disparo al aire y la medición de las muestras se llevó a cabo colocando las películas en el sensor y dirigiéndolo al aire, evitando que cualquier superficie debajo de la película interfiriera en la medición.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B	B8	B9	B10	B11	B12
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Figura 18. Esquema de microplaca de 96 pocillos.

4.2.6 Propiedades Mecánicas de las Películas

La medición de las propiedades mecánicas de las películas ensayas a tensión se realizó mediante un analizador de textura TA-XT2 (Texture Technologies Co., Scardale, NY. USA) de acuerdo a la norma ASTM D 882-91. El accesorio utilizado en la evaluación de estas propiedades está formado por un par de mordazas, una móvil y otra fija, que sujetan a la muestra, donde una celda registra la fuerza aplicada en un panel de control. Para la medición, la muestra se recortó en una probeta o cinta, midiendo esta 6x1 cm de película. Las condiciones bajo las cuales se realizó esta prueba fueron utilizando una carga de 20 g y una velocidad de cabezal de 10 mm/s.

Los parámetros mecánicos que se determinaron fueron el límite y módulo de elasticidad, esfuerzo máximo de tensión y esfuerzo a la ruptura, así como los porcentajes de elongación de las diferentes películas.

4.2 Etapa II

4.2.1 Aplicación del Recubrimiento en Carne de Cerdo y Almacenamiento

De los recubrimientos caracterizados en la Etapa I, se eligieron dos concentraciones del EI, éstos fueron los que demostraron las características más deseables en un recubrimiento (alta capacidad antioxidante y antimicrobiana combinada con los mayores porcentajes de elongación, módulos de elasticidad y resistencias a la ruptura). Estos tratamientos se aplicaron por inmersión, sobre un corte transversal de lomo de cerdo con hueso (*longissimus thoracis*) 24 horas *post mortem*, posteriormente se midió el grosor de el recubrimiento sobre la carne mediante fotografía con microscopio.

El lomo de cerdo fue seccionado en chuletas de 1.5 cm de espesor, las cuales fueron posteriormente sumergidas hasta cubrir en las diferentes soluciones de quitosano y té verde seleccionadas, durante 5 minutos (como se aprecia en la Figura 19).

Posteriormente, se empacaron en bolsa al vacío, se rotularon, se separaron por tratamiento y por día de medición, obteniendo un total de 90 piezas, como se muestra en la Tabla 7. La carne con los diferentes recubrimientos se almacenó a 0°C en condiciones de oscuridad y posteriormente se realizaron las mediciones de color, pérdida de agua, pH, espesor del recubrimiento, psicrófilos totales y contenido de TBARS a los 0, 5, 10, 15, 20 y 25 días de almacenamiento.

4.2.2 Medición del Color de la Carne y Médula Ósea

Las mediciones de color se realizaron una vez que el color se estabilizó, esto es después de 30 minutos de retirar el envase (blooming). Una vez transcurrido este tiempo, el color se determinó en la superficie de la carne y de la médula ósea utilizando un espectrofotómetro de reflectancia Minolta modelo CM508D, previamente calibrado. El iluminante utilizado fue el F2, y los parámetros medidos fueron los aceptados por la CIE (Comisión Internacional de l'Eclairage, 1978), los cuales son: L*(luminosidad), a*(índice de rojo), b*(índice de amarillo), C*(chroma) y h* (hue). Se realizaron 15 lecturas para cada muestra, utilizando tres muestras de carne por tratamiento.

4.2.3 Medición del pH de la Carne

El pH de las muestras se determinó usando un potenciómetro de electrodo de vidrio modelo 211 (Hanna Instruments). Las muestras se analizaron por triplicado, pesando 5 g de la carne y adicionando 45 ml de agua destilada, para luego homogenizar la muestra a 9,500 rpm durante 30 segundos en un homogeneizador Ultraturax modelo T25 (marca IKA). El pH de cada evaluación correspondió al valor promedio de tres lecturas (Torrescano *et al.*, 2003).

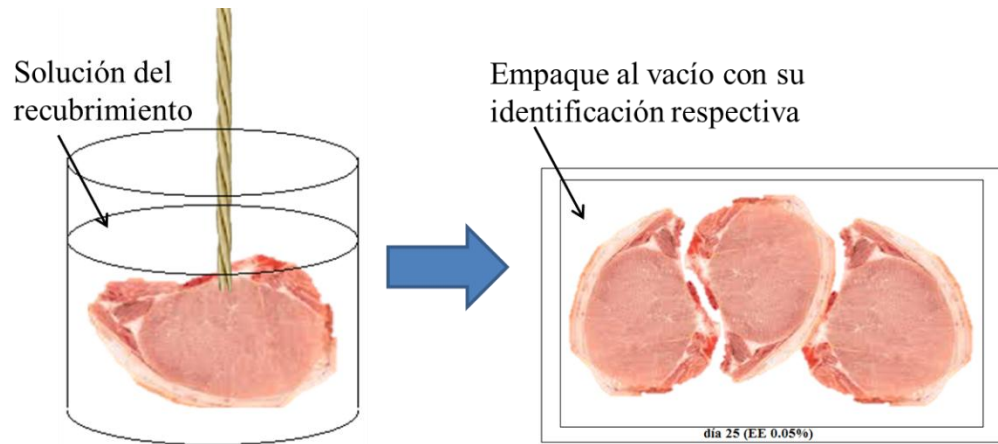


Figura 19. Aplicación del recubrimiento por inmersión en la solución del recubrimiento, empaque e identificación de las muestras.

Tabla 7. Tratamientos y número de muestras para la aplicación en carne.

Tratamiento	% de adición de extracto de té	Número de mediciones	Número de repeticiones	Total de muestras
Control	0	6	3	18
Extracto Industrial (EI)	0.1	6	3	18
	0.5	6	3	18
Total de piezas:				90*

*cada pieza de carne pesa aprox. 250 g

4.2.4 Evaluación de Oxidación (TBARS) en la Carne de Cerdo

La medición de la oxidación de lípidos se realizó determinando la formación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acuerdo con la metodología descrita por Pfalzgraf *et al.* (1995). El procedimiento consistió en homogenizar 10 g de la muestra en 20 ml de ácido tricloroacético al 10% (Ultraturrax marca IKA, modelo T25) utilizando un baño de hielo para evitar que se incrementara la temperatura. Posteriormente, los tubos con las muestras se centrifugaron (Beckman, Modelo J2-21) a 4,300 rpm y 5°C durante 20 min y se filtraron en papel filtro Whatman No. 1; de la fase líquida se tomaron 2 ml y se añadieron 2 ml de TBA 20mM y se homogenizó posteriormente en Vortex durante 30 seg. El análisis se realizó por triplicado y un duplicado de muestra blanco se preparó mezclando 2 ml de ácido tricloroacético y 2 ml de ácido tiobarbitúrico; las muestras y el blanco, se calentaron a 97°C en un baño de agua, durante 20 min. Posteriormente, los tubos se enfriaron a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 531 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, USA).

4.2.5 Evaluación Microbiológica de la Carne

La evaluación microbiológica de las muestras se realizó mediante la cuantificación de microorganismos psicrófilos y mesófilos totales. Se prepararon diluciones decimales consecutivas de las muestras de carne de acuerdo a lo estipulado en la NOM-110-SSA1-1994. Estas diluciones fueron sembradas por duplicado.

La prueba consistió en distribuir las cajas Petri estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación, la adición de medio de cultivo y la homogenización, se realizaron cómoda y libremente. Para cada lote de medio se incluyó una caja sin inóculo como testigo de la esterilidad.

Posteriormente, se inoculó 1 mL de las diluciones de las muestras en cada una de las cajas, y se añadió de 12 a 15 ml del medio preparado de Agar para cuenta estándar

para psicrófilos y mesófilos. Al agregar el medio preparado a las placas, se procedió a mezclarse mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidando que el medio no moje la cubierta de las cajas. Finalmente, se dejó solidificar a temperatura ambiente. Procurando que el tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

A continuación, las cajas se dejaron incubar en posición invertida (con la tapa hacia abajo) a $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 7 a 10 días para organismos psicrófilos, y $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas mesófilos (NOM-092-SSA1-1994).

4.3 Diseño Experimental y Análisis estadístico

El experimento se realizó en dos etapas y de acuerdo a los objetivos específicos planteados. La primera etapa (I) abarcó la elaboración y evaluación de la cubierta comestible; mientras que la segunda etapa (II) consistió en la aplicación del recubrimiento en la carne fresca de cerdo y evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas.

4.3.1 Etapa I

La primera parte de la etapa I, consistió en comparar los dos tipos de extractos, EE y EI, mediante la prueba de T de Student al 95 % de confianza. Posteriormente, la evaluación de la elaboración de los recubrimientos del experimento se llevó a cabo mediante un diseño factorial 2×4 , donde el primer factor fue el tipo de extracto adicionado al recubrimiento, con dos niveles (EE y EI); el segundo factor fue el

porcentaje en que los extractos de té verde fueron añadidos al recubrimiento (0.05, 0.1, 0.5 y 1%), adicionalmente se caracterizó un recubrimiento control de quitosano sólo.

Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces y los datos obtenidos se analizaron empleando análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se realizó por el método de Tukey-Kramer ($p < 0.05$).

4.3.2 Etapa II

Las piezas de carne fueron recubiertas utilizando tres diferentes concentraciones del extracto de té verde (EI) (0, 0.1 y 0.5%), adicionalmente se cuantificó un tratamiento control sin recubrimiento de quitosano.

Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces y los datos obtenidos se analizaron empleando análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se realizó por el método de Duncan ($p < 0.05$),

Los datos se analizaron empleando el paquete estadístico NCSS 2007 para Windows (NCSS, Chicago, Illinois., E.U.A).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPA I

Capacidad Antioxidante de los Extractos

En esta etapa se caracterizaron, se cuantificaron y se compararon las propiedades de dos extractos de té verde, uno de origen industrial (EI) y otro de origen experimental (EE). El extracto experimental generó un rendimiento del 36.5%, con respecto a las hojas secas de té, resultado que concuerda con lo reportado por Xi *et al.* (2011). Esta información es importante debido a la variación que existe entre extractos de té verde, ya que pueden estar en función del origen del cultivo (Zhang *et al.*, 2013) y de las condiciones de la extracción, como: presión (Xi *et al.*, 2011), temperatura, tiempo y solvente utilizado (Perva-Uzunalić *et al.*, 2006).

Porcentaje de inhibición del radical DPPH. En los extractos EI y EE, se midió la capacidad que estos tenían para inhibir al radical DPPH a cuatro diferentes concentraciones, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL. Los valores encontrados para ambos extractos se presentaron muy similares, a tal grado que solo se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en dos de las cuatro concentraciones, 100 y 12.5 µg/mL, sin embargo, se puede observar que en todas las concentraciones el EI fue el que presentó el porcentaje de inhibición más alta con 90.78% a una concentración de 100 µg/mL (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de los extractos de té verde.

Extracto	Concentración del extracto utilizada para la medición			
	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	12.5 µg/mL
EE**	87.71±0.59 a	87.71±5.95 a	86.01±5.20 a	72.98±1.26 a
EI**	90.78±1.04 b	89.08±3.35 a	90.99±1.64 a	86.33±1.94 b
Ac. ascórbico	95.44±0.27 b			

* las literales diferentes representan diferencias significativas entre los extractos a la misma concentración (comparación entre filas), por prueba de T de Student ($p < 0.05$).

** EE: extracto experimental; EI: extracto industrial

Los resultados muestran que todos los porcentajes de inhibición fueron altos, ya que el valor más bajo encontrado fue de $72.98 \pm 1.26\%$ para la concentración de $12.5 \mu\text{g/mL}$ del EE. Mientras que otras investigaciones reportan valores de aproximadamente 60 y 70% para concentraciones de 50 y $100 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Xi *et al.*, 2011), en esta investigación se encontraron porcentajes de inhibición más altos, desde 87.71 ± 5.95 hasta 90.78 ± 1.04 para estas mismas concentraciones.

Contenido de compuestos fenólicos. El contenido de fenoles totales fue de 582.6 ± 24.1 y $433.1 \pm 15.8 \text{ mg/g}$, para el EI y EE, respectivamente (Tabla 9). Se puede observar como el valor del EE fue muy similar al reportado por Xi *et al.* (2011), el cual fue de $439.4 \pm 4.06 \text{ mg}$ de fenoles totales por gramo de extracto de té verde, mientras que el EI se muestra significativamente más alto, aunque aún en un rango no extraordinario, ya que en esta misma investigación se reportan valores de $578.2 \pm 3.35 \text{ mg/g}$ para un extracto elaborado bajo un procedimiento que incluye altas presiones.

Utilizando el valor del rendimiento del EE, se pueden realizar comparaciones con resultados reportados por Xi *et al.* (2011) y por Fadda *et al.* (2014) en extractos secos y para infusiones de té verde. El EE demostró tener un contenido de fenoles de 433.1 mg/g y un rendimiento del 36.51%, por lo que el contenido de fenoles totales por gramo de hoja seca será de 158.12, este resultado resultó ser más bajo que el reportado por Xi *et al.* (2011), quienes reportaron un contenido de fenoles totales de 439.4 mg/g , con un rendimiento de 38.7 g de extracto por cada 100 g de hojas secas, obteniendo un contenido de 170.0 mg/g de hoja seca; otro investigador Fadda *et al.* (2014), reportaron un contenido de fenoles totales de 301.01 mg en 100 mL de infusión preparada con dos gramos de hojas secas, es decir 150.5 mg/g de hoja seca, lo que indica que el EE tiene un valor intermedio entre los extractos de té verde reportado en estas dos investigaciones.

El contenido de flavonoides se reporta en la Tabla 9, donde se observa que la concentración de flavonoides fue de $152.0 \pm 10.7 \text{ mg/g}$ para EI y de $64.9 \pm 4.3 \text{ mg/g}$ para EE, valores que representan el 26.08 y 14.98 % de contenido de fenoles totales,

Tabla 9. Contenido de compuestos fenólicos en los extractos de té verde.

Extracto	Fenoles totales* (mg/g***)	Flavonoides* (mg/g****)
EI**	582.678 ± 24.114 b	152.013 ± 10.711 b
EE**	433.129 ± 15.808 a	64.961 ± 4.398 a

* Se muestra la media ± su desviación estándar y las literales diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos, por prueba de comparación de medias de T de Student ($p < 0.05$).

** EE: extracto experimental; EI: extracto industrial

*** mg equivalentes de ac. gálico/g de extracto

**** mg equivalentes de rutina/g de extracto

respectivamente. Investigaciones realizadas por Fadda et al. (2014) reportaron haber encontrado un 26.91 % de flavonoides con respecto al total de fenoles, valores que se asemejan a los encontrados en nuestra investigación en el EI.

de las principales características presentes en el té verde y por las que se le atribuyen más características funcionales, es a su contenido de flavonoides, como lo sugiere un estudio realizado por Perva-Uzunalić *et al.* (2006), quienes cuantificaron que en té verde, variedad Fanning Belas, obtuvieron 191 g de catequinas por kg de hojas secas de té verde, un contenido que supera a las 70 plantas medicinales analizadas por Katalinic *et al.* (2006).

En base a lo anterior, una gran cantidad de autores ligan la capacidad antioxidante con el contenido de compuestos fenólicos (Frei y Higdon, 2003; Almajano *et al.*, 2008; Tao y Lambert, 2014), por lo que el mayor contenido de fenoles totales y flavonoides en el EI, puede ser la explicación de presentar mayor capacidad de inhibición del radical DPPH.

Color de las Películas

El color de las películas formadas, a partir de las soluciones formuladas para la generación de los recubrimientos, puede afectar el color de la carne una vez aplicado, por lo que se procedió a medirlo. El recubrimiento de quitosano presentó valores de L*, a*, b*, C*, y h*, de 34.67, -0.21, -0.25, 0.35 y 215.25 (Tabla 9), respectivamente. Estos resultados difieren con lo reportado por Schreiber *et al.* (2013), quienes elaboraron una película de quitosano, encontrando valores de L*, a * y b* de 88.36, -2.18 y 2.08, respectivamente. A pesar de que se observa una diferencia en los valores de L* y b*, el valor de a* fue muy similar al obtenido en esta investigación. En la investigación realizada por Schreiber *et al.* (2013) se añadió ácido gálico a las películas de quitosano, ellos observaron como la adición afectaba los valores del color de la película, ya que mientras el valor L* se mantenía, a* disminuía y b* aumentaba.

Tabla 10. Color de las películas

Clave de la película*	L*	a*	b*	C*	h*
Control	34.669±1.001 bc	-0.210±0.120 a	-0.250±0.264 a	0.353±0.253 a	215.250±35.061 d
EI 0.05%	34.361±0.516 b	0.535±0.288 c	2.998±0.871 c	3.052±0.892 c	81.571±7.020 bc
EI 0.1%	34.325±0.273 b	1.039±0.228 d	4.675±0.613 d	4.790±0.648 d	77.590±1.041 bc
EI 0.5%	31.617±0.761 a	2.865±0.371 f	6.044±0.758 e	6.695±0.792 e	64.603±2.575 ab
EI 1%	31.462±0.373 a	4.272±0.114 g	6.015±0.677 e	7.390±0.516 ef	54.396±3.610 ab
EE 0.05%	35.105±0.263 c	0.011±0.061 ab	1.265±0.192 b	1.267±0.193 b	89.634±2.754 c
EE 0.1%	35.099±0.306 c	0.254±0.146 bc	3.096±0.547 c	3.107±0.557 c	85.627±2.023 c
EE 0.5%	34.894±0.080 bc	1.026±0.214 d	6.564±0.535 e	6.645±0.559 e	81.212±1.252 bc
EE 1%	34.638±0.171 bc	1.571±0.107 e	7.431±0.280 f	7.596±0.293 f	78.071±0.460 bc

*Se refiere al porcentaje (p/p) de té verde añadido al recubrimiento con base de quitosano,

**Se muestra la media ± su desviación estándar y las literales diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos, por prueba de comparación de medias Tukey-Kramer (p<0.05).

Para el caso valor de la luminosidad (L^*) se puede observar que todos los tratamientos son similares al control, excepto aquellos que se elaboraron con las concentraciones de 0.5 y 1% de EI. Los resultados muestran que el parámetro a^* aumentó conforme se incrementó la concentración del extracto, siendo más notorio en los tratamientos elaborados con el EI. El parámetro b^* aumentó de la misma forma conforme aumentaba la concentración del extracto, pero en nuestro caso fue más intenso el cambio en los tratamientos elaborados con el EE.

El parámetro C^* mostró un comportamiento similar a a^* y b^* , pero sin ser superior para un extracto u otro, en cambio h^* mostró una disminución en sus valores conforme aumentó la concentración del extracto, siendo mayor esta disminución en los tratamientos elaborados con EI.

Propiedades Mecánicas de las Películas

Conocer el comportamiento mecánico de un material de envasado, con propiedades funcionales, es crucial para definir las condiciones a las que puede manipularse y así llegar a lograr aprovechar estas propiedades. En el caso de los biomateriales, como el quitosano, es de primordial importancia conocer sus condiciones mecánicas, lo anterior puede llegar a ser la principal limitante para usarse como envase (Miranda *et al.*, 2003; Srinivasa *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2009; Martínez-Camacho *et al.*, 2010; Rudnik, 2013). Las propiedades mecánicas de las películas de quitosano que se cuantificaron para el caso de las películas de quitosano y de quitosano adicionado con los extractos EE y EI, son los siguientes: módulo de elasticidad o módulo elástico (E), límite de elasticidad, esfuerzo máximo, esfuerzo de ruptura y porcentaje de elongación (%E).

Módulo de elasticidad. El módulo elástico, es decir la relación esfuerzo-deformación dentro de la zona elástica de un material, puede o no ser deseable un valor alto, esto

Tabla 11 . Propiedades mecánicas de las películas

Clave de la película*	E (MPa)**	Límite elástico (MPa)**	Esfuerzo máx. (MPa)	Esfuerzo de rupt. (MPa)	Elongación máx. (%)
Control	1559.2 ± 73.08	57.50 ± 10.40	67.43±14.45	65.15 ± 14.02	10.93 ± 4.23
EI 0.05%	3434.72 ± 98.93	75.62 ± 9.42	83.93 ± 24.63	83.03 ± 24.36	8.59 ± 2.98
EI 0.1%	3778.15 ± 84.78	87.85 ± 11.85	88.60 ± 27.35	87.56 ± 27.85	11.02 ± 4.49
EI 0.5%	4325.87 ± 169.16	84.00 ± 16.13	18.32 ± 5.59	18.01 ± 5.23	5.16 ± 1.21
EI 1%	4423.89 ± 137.70	46.00 ± 12.44	1.76 ± 0.05	1.76 ± 0.05	1.41 ± 0.35
EE 0.05%	1826.44 ± 78.70	63.38 ± 20.87	111.72±16.37	109.23 ± 16.39	6.21 ± 2.69
EE 0.1%	2470.90 ± 279.04	68.56 ± 28.53	124.61±16.85	122.86 ± 16.74	4.49 ± 0.09
EE 0.5%	1888.30 ± 185.03	16.32 ± 6.96	126.19±21.59	125.47 ± 22.03	1.47 ± 0.06
EE 1%	142.69 ± 35.87	0.85 ± 0.05	53.85±13.65	51.10 ± 15.21	1.00 ± 0.05

*Las letras se refieren al tipo de extracto (EI: extracto industrial; EE: extracto elaborado) y el número se refiere al porcentaje (p/p) de té verde añadido al recubrimiento con base de quitosano.

**Se muestra la media ± su desviación estándar y las literales diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos, por prueba de comparación de medias Tukey-Kramer (p<0.05).

debido a que el valor elevado de E es sinónimo de alta resistencia a la deformación (rigidez del material). Sin embargo, esto puede comprometer el porcentaje de elongación, como se puede observar en la Tabla 11, donde se presenta un fenómeno que es común a muchos materiales y es que mientras más alto es el módulo elástico, menor es el porcentaje de elongación a la ruptura (Beer y Jonhston, 1995).

El E de la película control fue de 1559.2 ± 73.08 MPa lo cual es cercano a lo reportado por Srinivasa *et al.* (2007) de 1875 MPa para una película de quitosano, sin embargo este es un valor bajo al compararse con un material polimérico empleado como material de envase, por ejemplo, el nylon o poliamida presenta un valor de E de 2800 MPa (Beer y Jonhston, 1995). Adicionalmente, en la Tabla 10 se puede observar un dato interesante, mientras que aumenta la adición del EI aumenta el valor de E, hasta 4423.89 MPa; la adición del EE muestra un valor máximo del E, de 2470.90 MPa, al agregar la concentración de 0.1 % y luego se reduce hasta 142.69 MPa con la adición de la concentración superior, lo que se encuentra por debajo del 10 % del valor del control.

Límite elástico. El límite elástico para la película de quitosano, se observa en la Tabla 10, el cual fue de 57.50 MPa. La adición de extracto a bajas concentraciones produjo un aumento en este parámetro. Los valores más altos se observaron para los tratamientos de EE 0.05%, EE 0.1% y EE 0.5%, con valores de 75.62, 87.85 y 84 MPa, respectivamente, es decir la adición del EE le confiere elasticidad a la película. Sin embargo, al multiplicar estos límites elásticos con los valores de los módulos elásticos, se puede observar que la deformación elástica no fue mayor al 4%, para ninguno de los tratamientos, por lo que estas películas, no pueden considerarse materiales elásticos (Roeder, 2013).

Esfuerzo máximo y esfuerzo de ruptura. Dado que el esfuerzo máximo y el de ruptura no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para ninguno de los tratamientos, se considera que el material no es dúctil, es decir, se trata de un material frágil (Roeder,

2013). El esfuerzo máximo y el de ruptura son medias de la cantidad de energía que puede absorber un material antes de su rotura, lo más deseable para que un envase cuya función incluye la protección, es un valor de esfuerzo máximo y de ruptura elevados (Robertson, 2013). El tratamiento control mostro un valor de 67.43 ± 14.45 MPa, que se encuentra dentro del rango de valores encontrados por Leceta *et al.* (2013) para este tipo de películas, que va desde 53.98 ± 7.65 hasta 68.47 ± 2.58 MPa. Los tratamientos que mostraron el mayor esfuerzo máximo fueron: EI 0.05%, EI 0.1% y EI 0.5%, con valores de 111.72, 124.61 y 126.19 MPa, respectivamente; los tratamientos siguieron en magnitud fueron: EE 0.05% y EE 0.1%, con valores de 83.93 y 88.60 respectivamente; el EI 1% no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) con el control, y los tratamientos EE 0.5% y EE 1% se vieron disminuidos drásticamente en esta propiedad (Tabla 10).

Elongación. El porcentaje de elongación (%E) muestra la capacidad de un material para estirarse, e indica la capacidad del material para absorber energía, antes de romperse (Robertson, 2013). El nylon por ejemplo presenta un %E de 50, mientras que algunos materiales presenta valores de hasta 500 y 600, como es el caso de poliéster elastomérico y el caucho, respectivamente (Beer y Jonhston, 1995). En el caso de las películas de quitosano se ha logrado mejorar sus características mecánicas con la adición de plastificantes como glicerol, tween 80 y cera de abeja (Miranda *et al.*, 2003).

Los %E de las películas de quitosano, en la mayoría de los tratamientos, fueron mayores a lo reportado por Miranda *et al.* (2003) y Martínez-Camacho *et al.* (2010), quienes encontraron valores de aproximadamente 2% para este tipo de películas, al mismo tiempo muestran un valor bajo comparado con lo reportado por Sun *et al.* (2014) de 32.36%, y Vargas *et al.* (2009) de 17 %. Es decir, los valores encontrados en nuestra investigación se encuentran en la parte media de los reportados por los autores para esta característica en las películas de quitosano. La película control, es decir, sin adición de extracto de té, presenta un %E de 10.93, y se observa una disminución en esta propiedad al aumentar el porcentaje de adición de extracto, los tratamientos que no presentaron una

disminución significativa fueron EI 0.05%, EI 0.1% y EE 0.05%, con valores de 8.59, 11.02 y 6.21, respectivamente.

La adición excesiva del extracto de té verde puede generar una reducción importante del %E, como lo demuestra el tratamiento EE 1% que reduce su valor hasta 1%. Lo anterior significa que el extracto de té verde no presenta propiedades como plastificante en la película de quitosano, en los porcentajes cuantificados en esta investigación.

Capacidad Antioxidante de las Películas

La evaluación de la capacidad antioxidante de las películas se realizó una vez que éstas fueron disueltas considerando una concentración del 1% (p/v) en una solución de ácido acético al 1%. Los resultados de esta cuantificación correspondieron a evaluar el porcentaje de inhibición del radical DPPH y el contenido de compuestos fenólicos, los cuales se presentan a continuación:

Inhibición del radical DPPH. Los resultados encontrados muestran que la capacidad de inhibir al radical DPPH aumentó conforme la concentración de té verde se incrementó en la película (Tabla 12), para ambos extractos, observándose que no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos con las concentraciones más altas en los dos extractos, es decir que a pesar de que EI mostró un mayor potencial de inhibición del radical DPPH, esto no se reflejó en la capacidad antioxidante de los recubrimientos desarrollados. Esto contrasta con lo reportado por Li *et al.* (2014), quienes cuantificaron el porcentaje de inhibición del radical DPPH en películas de gelatina adicionadas con diferentes concentraciones de extractos naturales (0, 0.01, 0.1 0.5%); a dichas concentraciones de extracto de té verde en películas de gelatina se observó una inhibición nula al 0%, menor al 10% para la concentración de 0.01, mayor al 90% para

Tabla 12. Inhibición (%) del radical DPPH (Promedio \pm D.E.) de las películas disueltas en ácido acético.

	Inhibición del radical DPPH (%)**		
Control	-0.159	\pm 0.557	a
EI 0.05%*	34.216	\pm 1.734	c
EI 0.10%*	71.875	\pm 2.156	e
EI 0.50%*	92.479	\pm 1.101	f
EI 1%*	92.850	\pm 0.984	f
EE 0.05%*	28.418	\pm 2.042	b
EE 0.10%*	63.483	\pm 4.439	e
EE 0.50%*	91.011	\pm 0.851	f
EE 1%*	92.603	\pm 0.108	f

*Se refiere al porcentaje (p/p) de té verde añadido al recubrimiento con base de quitosano.

**Las literales diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos, por prueba de comparación de medias Tukey-Kramer ($p < 0.05$).

el porcentaje de adición del 0.1% y una reducción en la capacidad antioxidante de la película al aumentar el porcentaje de adición de extracto de té verde a 0.5%.general, en este estudio, el recubrimiento mostró una buena capacidad de inhibición del radical DPPH (encima del 92%), al compararse con algunos envases activos, a los cuales se agregaron extractos naturales de *Curcuma longa L.* (Bitencourt *et al.*, 2014), *Zataria multiflora Boiss* y *Mentha pulegium* (Shojaee-Aliabadi *et al.*, 2014a) en concentraciones desde 2 hasta 3%, resultados que no concuerdan con la presente investigación, pues no superaron el 80% de inhibición del radical.

Compuestos fenólicos. En las películas también se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos, mediante el análisis de fenoles totales y flavonoides. En la Tabla 13 se muestran los resultados de la concentración (mg/g) de ambos indicadores considerados en la evaluación de la capacidad antioxidante de las películas, en la cual se observa un contenido superior ($p < 0.05$) de ambos en los tratamientos elaborados a partir de EI. Para el caso del contenido de flavonoides en todos los tratamientos, se encontraron contenidos desde 0.03 hasta 1.227 mg equivalentes de rutina/g de recubrimiento. Lo cual corresponde a lo encontrado en la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos, siendo EI el que presentó mayor contenido de compuestos fenólicos de manera similar a lo encontrado en este análisis.

Considerando la dilución realizada para la determinación del contenido de compuestos fenólicos de las películas, se observa que en las películas se conserva del 95 al 100% de los compuestos fenólicos de los extractos adicionados. Además, esta concentración es directamente proporcional con la del extracto añadido a la formulación, lo cual no se ha observado en otros extractos, como lo reportado por Shojaee-Aliabadi *et al.* (2014b), quienes al agregar tres veces el contenido de extracto de *Zataria multiflora Boiss* y *Mentha pulegium*, observaron sólo el doble de aumento en la concentración de equivalentes de ácido gálico.

Tabla 13. Contenido de compuestos fenólicos en las películas diluidas al 1%.

Extracto**	Fenoles totales* (mg/g)**	Flavonoides* (mg/g)***
Control	0.000 ± 0.011 a	0.000 ± 0.001 a
EI 0.05%	0.338 ± 0.020 c	0.067 ± 0.003 c
EI 0.10%	0.668 ± 0.049 e	0.137 ± 0.014 d
EI 0.50%	3.262 ± 0.226 g	0.740 ± 0.118 f
EI 1%	6.367 ± 0.735 i	1.227 ± 0.525 g
EE 0.05%	0.229 ± 0.008 b	0.030 ± 0.004 b
EE 0.10%	0.468 ± 0.016 d	0.061 ± 0.011 c
EE 0.50%	2.343 ± 0.385 f	0.334 ± 0.035 e
EE 1%	4.601 ± 0.324 h	0.613 ± 0.110 f

* Se muestra la media ± su desviación estándar y las literales diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos, por prueba de comparación de medias Tukey-Kramer ($p < 0.05$).

** EE: extracto experimental; EI: extracto industrial

*** mg equivalentes de ac. gálico/g de recubrimiento

**** mg equivalentes de rutina/g de recubrimiento

Capacidad Antibacteriana de los Extractos de Té Verde

En las Figuras 20 y 21 se puede observar cómo los dos tipos de extracto de té verde, EE y EI, cuyas concentraciones de té verde empleadas fueron de 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 y 0%, actúan para inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC29213B (SA) y *Listeria innocua* ATCC33090 (LA) (Figura 20) y de las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC25922 (EC) y *Salmonella choleraesuis*. ATCC10708 (SC) (Figura 21).

La adición de los extractos tuvo efecto ($p < 0.05$) sobre la inhibición del crecimiento dependiendo del tipo de bacteria utilizada, observándose que dicho efecto fue más fuerte ($p < 0.05$) en las bacterias Gram positiva. También se observó que la concentración mínima inhibitoria se encuentra entre 0.5 y 0.25% de adición, para ambas bacterias y ambos extractos; sin embargo, para el caso de las Gram negativas, EC y SC, no se encontró una inhibición total, es decir, se presentó un retraso en su crecimiento a la concentración más alta utilizada (0.5%). Además, se observaron pequeñas, pero significativas diferencias ($p < 0.05$) por el tipo de extracto utilizado, siendo mayor la capacidad de inhibición del EI.

El efecto antimicrobiano del té verde se ha probado en función de dos mecanismos. Arakawa *et al.* (2004) identificaron peróxido de hidrógeno producido, en solución acuosa, por la interacción de EGCG con el oxígeno; este compuesto producto de la reacción, parece ser el responsable de la acción bactericida del té verde. En otra investigación Nakayama *et al.* (2013) sugieren que la EGCG inhibe la función principal de la porina, es decir, el transporte pasivo de pequeñas moléculas hidrofílicas tales como la glucosa, lo que conduce a la inhibición del crecimiento bacteriano.

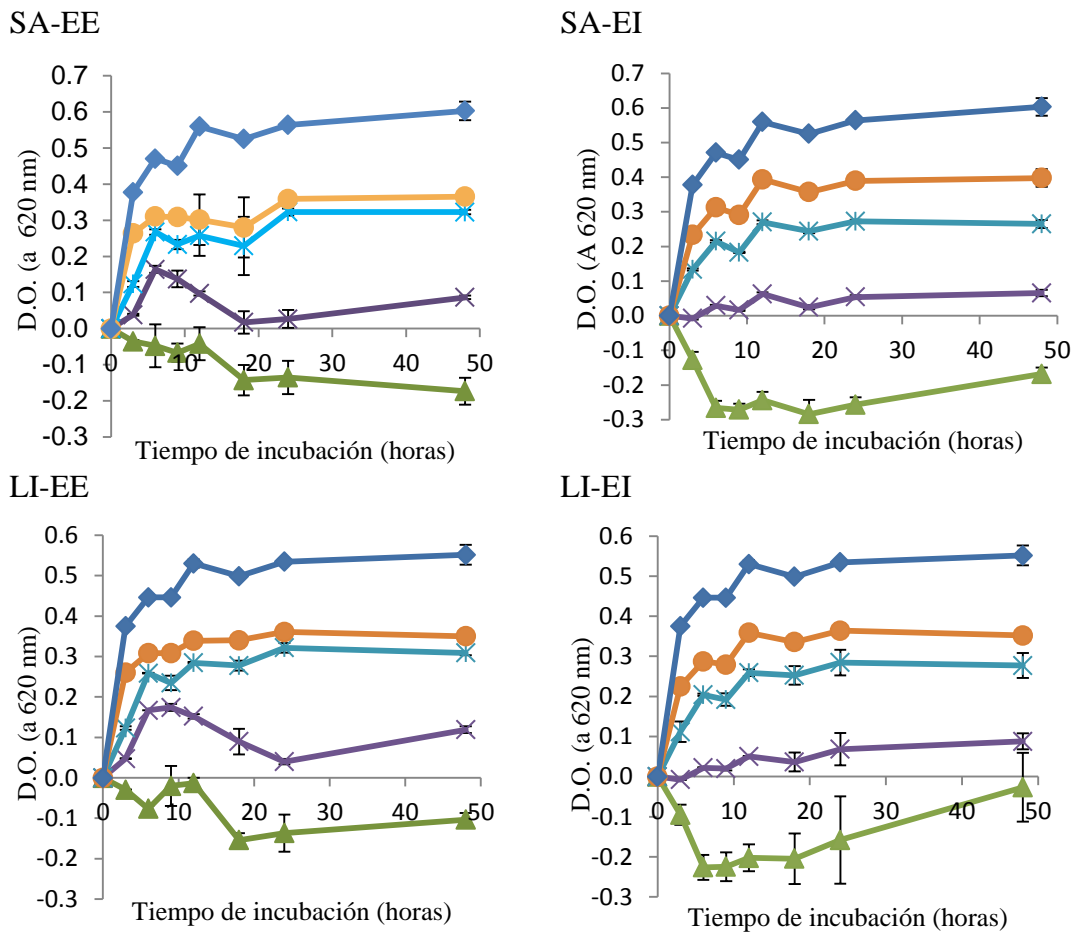


Figura 20. Inhibición del crecimiento de las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC29213B (SA) y *Listeria innocua* ATCC33090 (LI), empleando dos tipos de extracto de té verde, el extracto experimental (EE) y el extracto industrial (EI). Las concentraciones (%) de té verde empleadas fueron de 0.5 (▲), 0.25 (×), 0.125 (*), 0.062 (●) y 0 (◆).

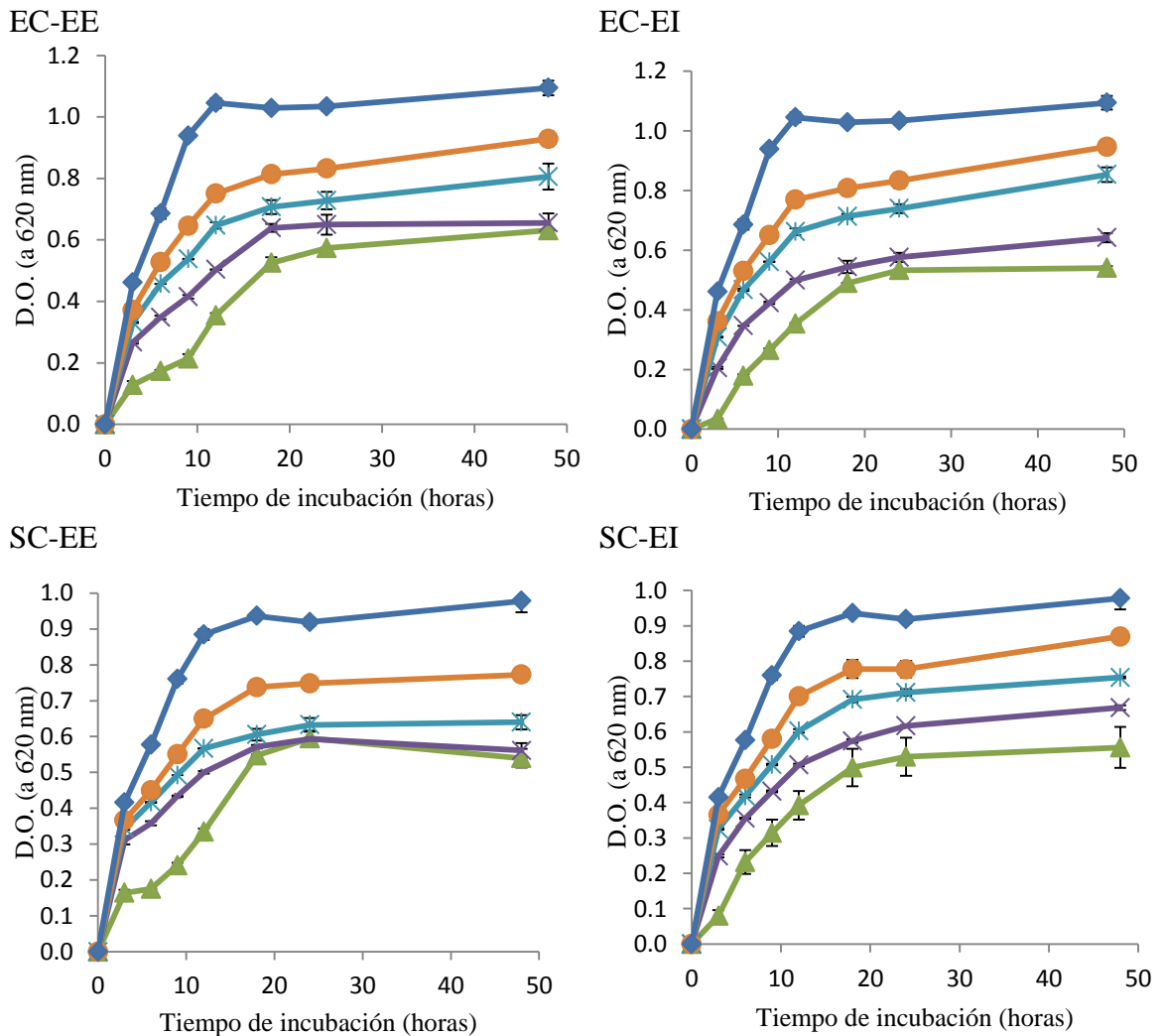


Figura 21. Inhibición del crecimiento de las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC25922 (EC) y *Salmonella choleraesuis*. ATCC10708 (SC), empleando dos tipos de extracto de té verde, el extracto experimental (EE) y el extracto industrial (EI).

Las concentraciones (%) de té verde empleadas fueron de 0.5 (▲), 0.25 (×), 0.125 (*), 0.062(●) y 0% (◆).

Capacidad Antibacteriana de los Recubrimientos

En las Figuras 22 y 23 se muestra la cinética de crecimiento bacteriano y el efecto de la presencia del recubrimiento de quitosano adicionado con los dos tipos de extracto de té verde (EE y EI), sobre el crecimiento de las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC29213B (SA) y *Listeria innocua* ATCC33090 (LI) (Figura 21) y de las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC25922 (EC) y *Salmonella choleraesuis*. ATCC10708 (SC) (Figura 22). Los extractos de té verde se adicionaron a los recubrimientos en concentraciones de 0, 0.05, 0.1, 0.5 y 1% (p/v), adicionalmente se muestra el crecimiento bacteriano con la utilización de gentamicina y de un control positivo (+), donde se probó el crecimiento del microorganismo solo en el medio de cultivo.

Como se puede observar en la Figura 22, que respecto al control, la inhibición ($p < 0.05$) del crecimiento de las bacterias Gram positivas se debió a la acción del quitosano y en mayor medida a las diferentes concentraciones de té verde utilizadas. Por otro lado, el quitosano por si solo muestra un efecto inhibitorio, que se incrementa al incorporar el té verde; es importante resaltar que este efecto se presenta mejor al utilizar EI a las más altas concentraciones. Para el caso de SA, las concentraciones 0.1, 0.5 y 1% mostraron la mayor capacidad de inhibición ($p < 0.05$); sin embargo, no se encontraron diferencias entre estas concentraciones ($p > 0.05$). Mientras que para LI, las concentraciones 0.1, 0.5 y 1% mostraron la mayor inhibición ($p < 0.05$), pero sin mostrar diferencias ($p > 0.05$) entre ellas. Estos resultados muestran, en primer lugar que la adición del EI fue el que mejoró las propiedades antimicrobianas del recubrimiento; y en segundo, que este recubrimiento desarrollado a base de quitosano presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de bacterias Gram positivas, como lo demostraron No *et al.* (2002) quienes evaluaron la inhibición del crecimiento de cuatro bacterias Gram negativas y siete Gram positivas, encontrando que el quitosano mostró un efecto antibacteriano más fuerte sobre las Gram positivas, tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, entre otros.

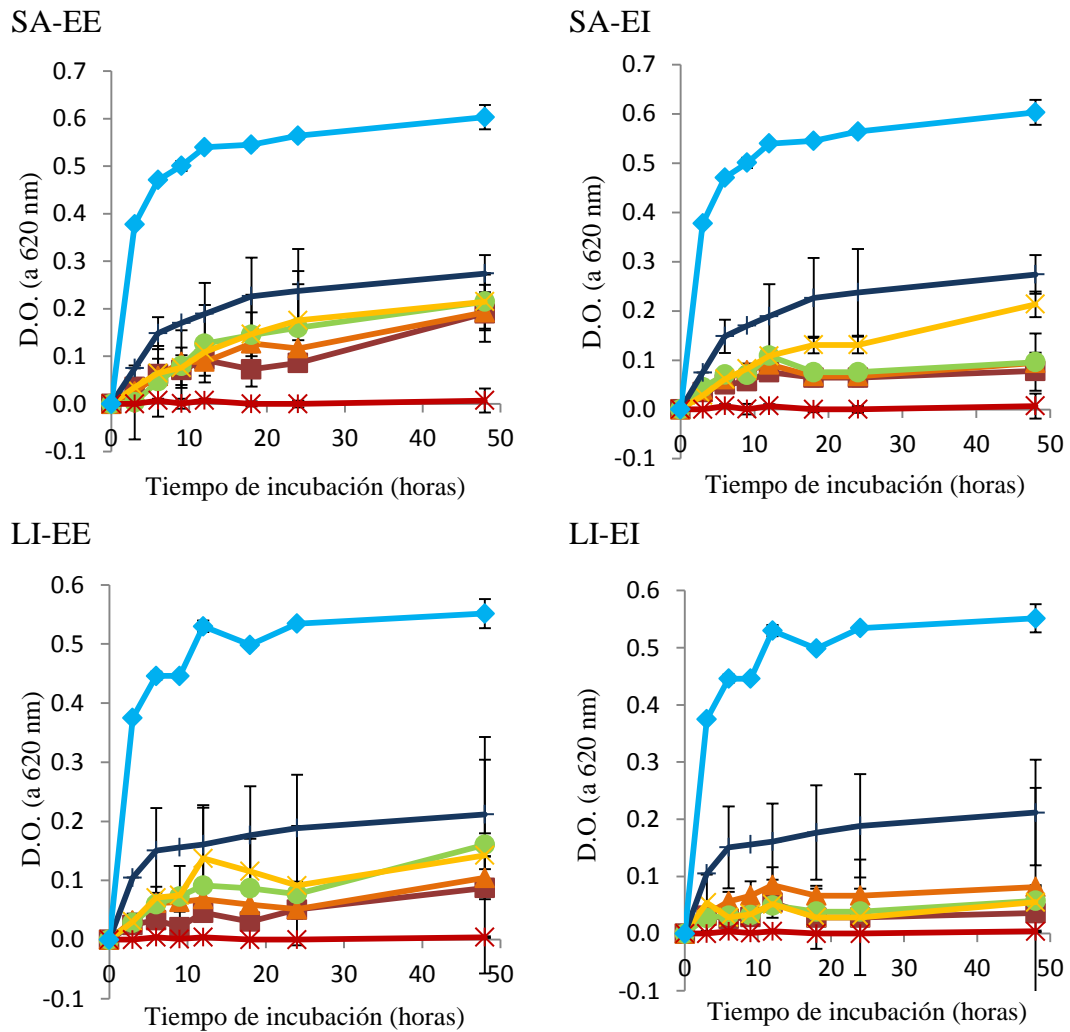


Figura 22. Inhibición del crecimiento de las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC29213B (SA) y *Listeria innocua* ATCC33090 (LI) empleando el recubrimiento de quitosano al 1% adicionado con dos tipos de extracto de té verde, el extracto experimental (EE) y el extracto industrial (EI). Las concentraciones de té verde utilizadas fueron de 1 (■), 0.5 (▲), 0.1 (●), 0.05 (✕) y 0 (—), expresadas en porcentaje (p/v), gentamicina (✱) y control + (◆).

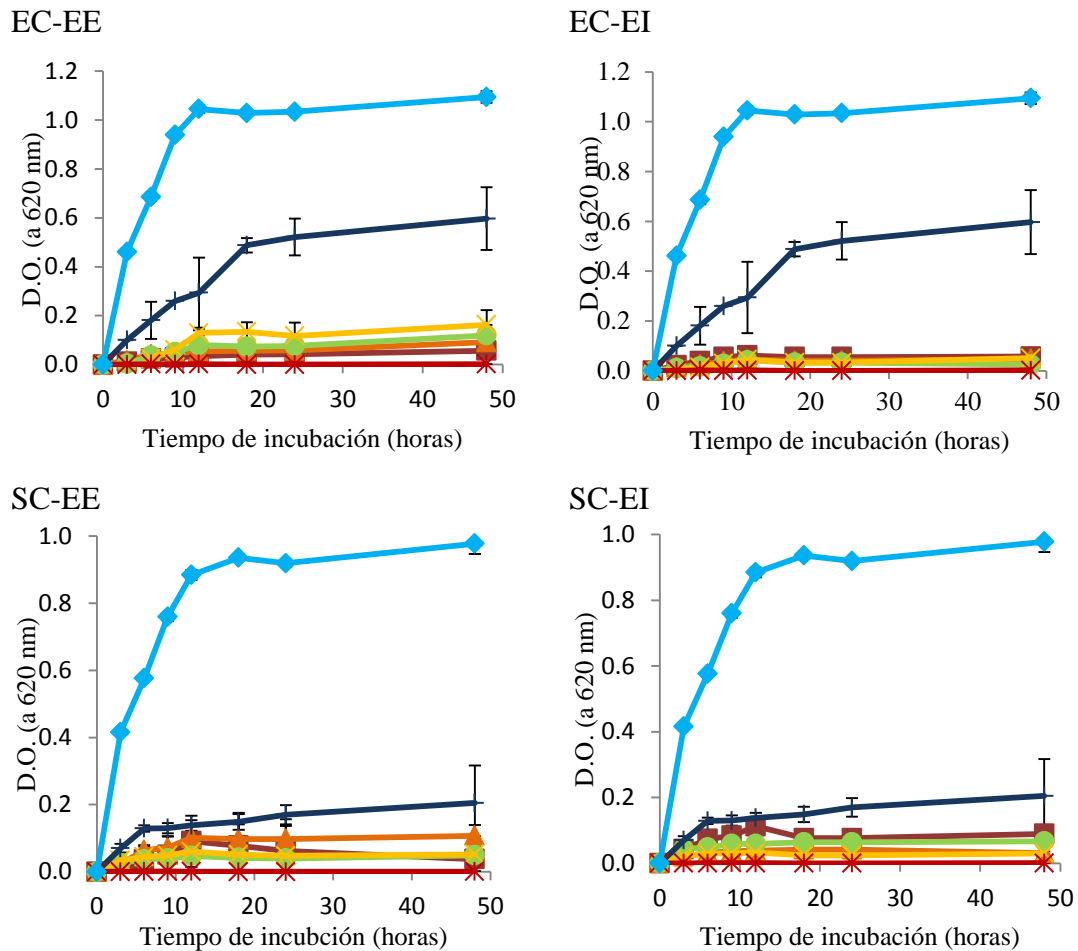


Figura 23. Inhibición del crecimiento de las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC25922 (EC) y *Salmonella choleraesuis*. ATCC10708 (SC), empleando el recubrimiento de quitosano al 1% adicionado con dos tipos de extracto de té verde, el extracto experimental (EE) y el extracto industrial (EI). Las concentraciones de té verde utilizadas fueron de 1 (■), 0.5 (▲), 0.1 (●), 0.05 (✕) y 0 (—), expresadas en porcentaje (p/v), gentamicina (*) y control + (◆).

Para el caso de las bacterias Gram negativas (Figura 23), los resultados muestran que entre ambas bacterias el comportamiento es diferente, tanto entre el control positivo como con la aplicación del recubrimiento sin adición de té verde; ya que mientras EC presenta una inhibición poco menor al 50%, para SC es cercana al 80%. Lo anterior puede significar que SC es más susceptible a la acción inhibitoria de los compuestos presentes en los recubrimientos. En cuanto a la adición de té verde, EC presenta una clara diferencia ($p < 0.05$) entre el recubrimiento desarrollado sólo a base de quitosano y el extracto, independientemente de la concentración utilizada; mientras que para SC la diferencia entre estos es mucho menor, aunque significativa ($p < 0.05$). También puede observarse que la capacidad antibacteriana del té verde es similar al efecto bactericida de la gentamicina, aunque sin considerar diferencias ($p > 0.05$) entre las diferentes concentraciones de té verde empleadas, ni entre el tipo de extracto ($p > 0.05$).

En general, se puede observar una fuerte inhibición del recubrimiento de quitosano para todas las bacterias utilizadas. Sin embargo, este efecto no podría atribuirse completamente al quitosano, ya que en el desarrollo del recubrimiento se utilizó ácido acético al 1%, compuesto que ha demostrado capacidad antibacteriana. En este tipo de recubrimiento se ha observado el efecto del tipo de solvente utilizado en su elaboración. (No *et al.*, 2002) desarrollaron recubrimientos utilizando diferentes solventes tales como los ácidos láctico, fórmico, propiónico, acético y ascórbico; quienes reportaron que el recubrimiento con ácido acético fue el que presentó mejor capacidad antimicrobiana para la mayoría de las bacterias tanto Gram positivas como negativas.

Considerando que el extracto de té verde por sí solo tuvo efecto bactericida a la concentración más alta sobre las bacterias Gram positivas (Figura 20), con la adición de este al recubrimiento parece potenciarse el efecto sobre las Gram negativas (Figuras 22 y 23), principalmente sobre SC. Lo anterior podría significar que en las bacterias Gram negativas el té verde presenta un efecto de inhibición bacteriana aditivo al quitosano y al ácido acético, mientras que con las Gram positivas, la inhibición podría deberse a la acción individual del té verde y el quitosano por sí solos.

ETAPA II

En esta segunda etapa del experimento se emplearon los recubrimientos que mostraron las mejores propiedades antioxidantes y antimicrobianas en la Etapa I, los cuales fueron aplicados en carne de cerdo con hueso.

En esta etapa se midió el grosor de la película formada sobre la carne, observándose un espesor promedio de 0.065 ± 0.023 mm, no encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

La carne fue conservada en refrigeración durante un período de 25 días y evaluada para establecer la efectividad de los recubrimientos en el mantenimiento de la calidad. Los resultados de estos análisis se presentan a continuación:

pH de la Carne Durante su Almacenamiento

En la Tabla 14, se presentan los valores de pH de los tratamientos durante el período de almacenamiento, donde se observa tendencia al incremento a lo largo del tiempo, tanto para los recubrimientos, como para el control, aunque sólo se observan diferencias ($p < 0.05$) entre los tratamientos que incluyeron al té verde en su composición. Esta misma tendencia la han observado otros autores en carne fresca de cerdo (Qin *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2013). Al inicio del almacenamiento, el control presentó un pH estadísticamente superior ($p < 0.05$) al de los tratamientos con recubrimiento, lo que puede atribuirse, a la naturaleza ácida del recubrimiento. Durante el almacenamiento se observó cómo esta diferencia desapareció, y una vez transcurridos los 25 días solo existió diferencia entre los tratamientos control y de quitosano. Rahman *et al.* (2013) consideran que este pequeño aumento en el pH podría deberse a la degradación de las proteínas y a la producción de aminos. Lo anterior puede indicar que el té verde adicionado a los recubrimientos comestibles funciona como amortiguador del efecto acidificante.

Tabla 14. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el pH de la carne con aplicación de recubrimientos de quitosano y té verde.

Día	Q(0)*-T(0)**	Q(1)*-T(0)**	Q(1)*-T(0.1)**	Q(1)*-T(0.5)**
0	5.62±0.12 ^{Ba}	5.44±0.06 ^{Aa}	5.40±0.11 ^{Aa}	5.35±0.13 ^{Aa}
5	5.65±0.10 ^{Ba}	5.47±0.05 ^{Aa}	5.46±0.05 ^{Aab}	5.48±0.06 ^{Aab}
10	5.63±0.06 ^{Ba}	5.50±0.10 ^{Aa}	5.47±0.06 ^{Aab}	5.54±0.07 ^{ABb}
15	5.66±0.17 ^{Aa}	5.52±0.18 ^{Aa}	5.55±0.11 ^{Aab}	5.52±0.13 ^{Aab}
20	5.70±0.13 ^{Aa}	5.53±0.23 ^{Aa}	5.60±0.21 ^{Aab}	5.56±0.19 ^{Ab}
25	5.77±0.22 ^{Ba}	5.53±0.18 ^{Aa}	5.63±0.12 ^{ABb}	5.57±0.10 ^{ABb}

^{A-B} Demuestran las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) de los promedios \pm DE por fila.

^{a-b} Demuestran las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) de los promedios \pm DE por columna.

*porcentaje de adición de quitosano en el recubrimiento.

**porcentaje de adición de extracto de té verde en el recubrimiento.

Oxidación de Lípidos

Los resultados de la evaluación del grado de oxidación de lípidos de la carne durante su almacenamiento en refrigeración se presentan en la Figura 24, donde se puede apreciar que el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS), expresadas como mg de malondialdehído/kg de muestra, es igual ($p > 0.05$) entre todos los tratamientos al inicio del periodo de almacenamiento. Los valores al inicio del tiempo de conservación son más bajos que los reportados en otras investigaciones en las que se utilizó carne de cerdo fresca (Shrestha y Min, 2006; Cardenia *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2013), los cuales son mayores a 0.2 mg/kg de carne a las 24 h *post mortem*. Sin embargo, los valores obtenidos concuerdan con los reportados por Kim *et al.* (2013), quienes midieron el contenido de TBARS en carne fresca de cerdo, específicamente en los músculos *longissimus thoracis et lumborum* (LT y LL).

Los resultados generados en esta investigación muestran una velocidad más baja en la formación de TBARS que los reportados por Kim *et al.* (2013), respecto al control, siendo la concentración de TBARS del día 25 cercana a lo que estos autores reportan para el día 5. Quienes aplicaron un recubrimiento de quitosano en carne fresca y previamente congelada y descongelada. En la Figura 24 también se observa que no hubo cambio ($p > 0.05$) durante el tiempo de almacenamiento en los tratamientos que contenían té verde en su formulación. En contraste, los valores de TBARS del control aumentaron ($p < 0.05$) a lo largo del tiempo, al igual que el tratamiento con sólo quitosano, el cual alcanzó valores más elevados ($p < 0.05$) de malondialdehído, que el mismo control. Lo cual no concuerda con lo encontrado por Rajalakshmi *et al.* (2013), quienes reportaron una alta actividad antioxidante de quitosano aislado a partir de exoesqueleto de camarón. Tampoco coinciden con los resultados de Fan *et al.* (2009) quienes aplicaron un recubrimiento de quitosano al 2% sobre carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) durante almacenamiento en congelación, ya que observaron un retraso en la formación de malondialdehído, es decir una reducción de la oxidación de lípidos por efecto del recubrimiento.

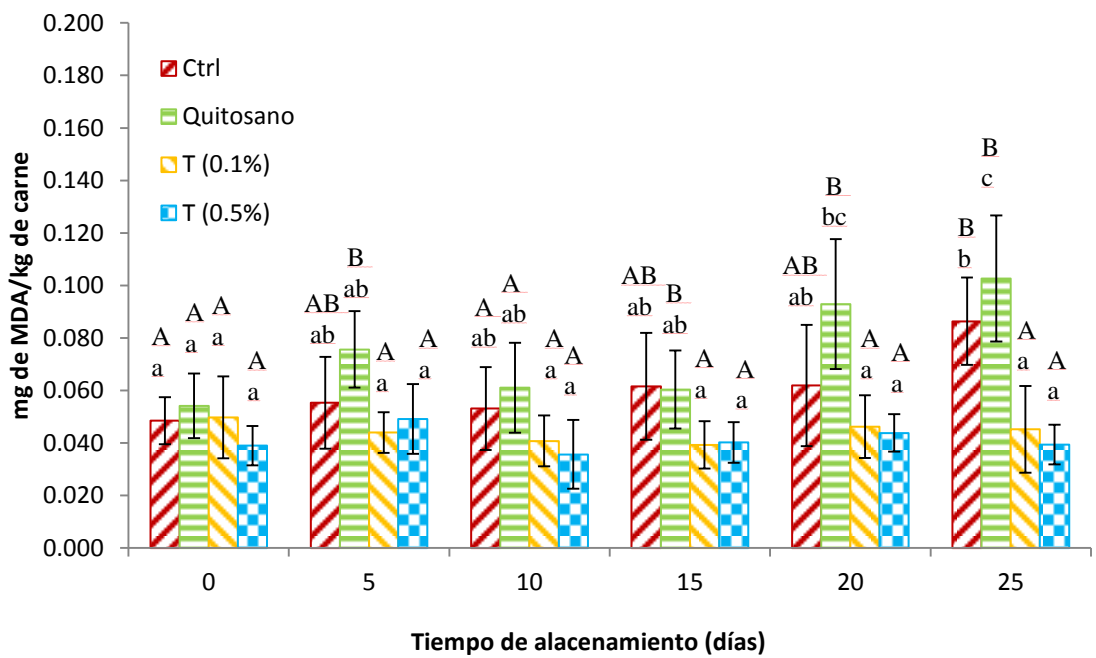


Figura 24. Concentración de TBARS (mg MA/kg) de los diferentes tratamientos a lo largo de 25 días de almacenamiento.

^{A-B} Denotan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre tratamientos el mismo día.

^{a-c} Denotan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) de un tratamiento a lo largo del tiempo.

Por lo anterior, es posible que la razón por la cual la efectividad del quitosano no haya sido similar en el presente estudio, sea que la concentración utilizada, estuvo 50% por debajo de la reportada por estos autores.

Al realizar la comparación entre los diferentes tratamientos evaluados, se observa que no existieron diferencias ($p > 0.05$) al inicio del experimento; sin embargo, conforme transcurrió el tiempo, los valores de malondialdehído aumentaron, principalmente a partir del día 15 de almacenamiento, mostrándose que al final se observan los valores más bajos ($p < 0.05$) para los tratamientos T (0.1%) y T (0.5%), es decir los que contenían el extracto de té verde.

Witte *et al.* (1970), establecen que el límite máximo aceptable de malondialdehído en carne para considerarla como no oxidada es de 1 a 2 mg/kg. Por lo anterior, es posible establecer que los valores encontrados a lo largo de los 25 días del almacenamiento, son aceptables, ya que el valor máximo encontrado fue de alrededor de 0.103 mg/kg, el cual correspondió al tratamiento que contenían sólo quitosano.

Evaluación Microbiológica de la Carne

Los resultados del análisis de los microorganismos mesófilos se muestran en la Figura 25, en la cual se observa que al día cero del almacenamiento todos los tratamientos presentaron una carga microbiana similar ($p > 0.05$). No obstante, a partir del día cinco se observa diferencia ($p < 0.05$) entre el grupo control y el resto de los tratamientos; diferencia que se hace más evidente con el paso del tiempo. En todos los tratamientos se observa crecimiento microbiano a lo largo del tiempo; sin embargo, la velocidad con que aumenta esta carga bacteriana es menor ($p < 0.05$) con la inclusión del recubrimiento comestible. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la carga de mesófilos, entre ninguno de los tres tratamientos donde se aplicó un recubrimiento comestible.

Al final de los 25 días de almacenamiento el grupo control presentó una carga microbiana promedio de 2.1×10^6 UFC/g de carne, carga que se encuentra cercana al límite máximo permitido por la legislación mexicana vigente, que es de 5×10^6 UFC/g de producto, establecido en la NOM-034-SSA1-1993 y que estipula como límite para permitir su comercialización. La carne que se conservó envasada al vacío se encontraba al final de su vida de anaquel, mientras que los tratamientos donde se aplicó el recubrimiento comestible se mantuvieron tres ciclos logarítmicos abajo, es decir mil veces menos carga microbiana, valor que el control presentó el día 5 de su almacenamiento ($p < 0.05$), indicando que el recubrimiento es capaz de prolongar, al menos 20 días la vida útil de la carne de cerdo empacada al vacío y conservada en refrigeración.

La calidad microbiológica de la carne depende en gran medida de las condiciones de obtención durante el sacrificio, como lo mencionan Kumar *et al.* (2014), quienes encontraron que el 29.66% de las muestras de diferentes especies sacrificadas en rastros municipales de la India, rebasaban el límite legal permitido de 1×10^4 UFC/g, para ese país. Sin embargo, en otras investigaciones (Kim *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2013), donde la materia prima se obtuvo en establecimientos certificados, se han encontrado cargas entre 1 y 2 ciclos logarítmicos, es decir entre 10 y 100 UFC/g, lo cual es muy similar a lo encontrado en esta investigación, al inicio del experimento.

La carga microbiana observada para la carne fresca es menor a la observada por Siripatrawan y Noipha (2012) en salchichas de cerdo con un recubrimiento de quitosano y quitosano con té verde. Sin embargo, el comportamiento es similar, ya que en ambos experimentos se observó una reducción de más de 3 ciclos logarítmicos por el uso del recubrimiento de quitosano, no así con el adicionado con extracto de té verde, donde no se observó una diferencia estadística ($p > 0.05$) con respecto al recubrimiento de quitosano solo, mientras que Siripatrawan y Noipha (2012) observaron un aumento en la acción antimicrobiana del recubrimiento al agregar el extracto de té verde. Esta diferencia puede deberse al tipo de bacterias que se desarrollan en la carne fresca y las que se desarrollan en la salchicha que ya ha sido expuesta a un proceso de

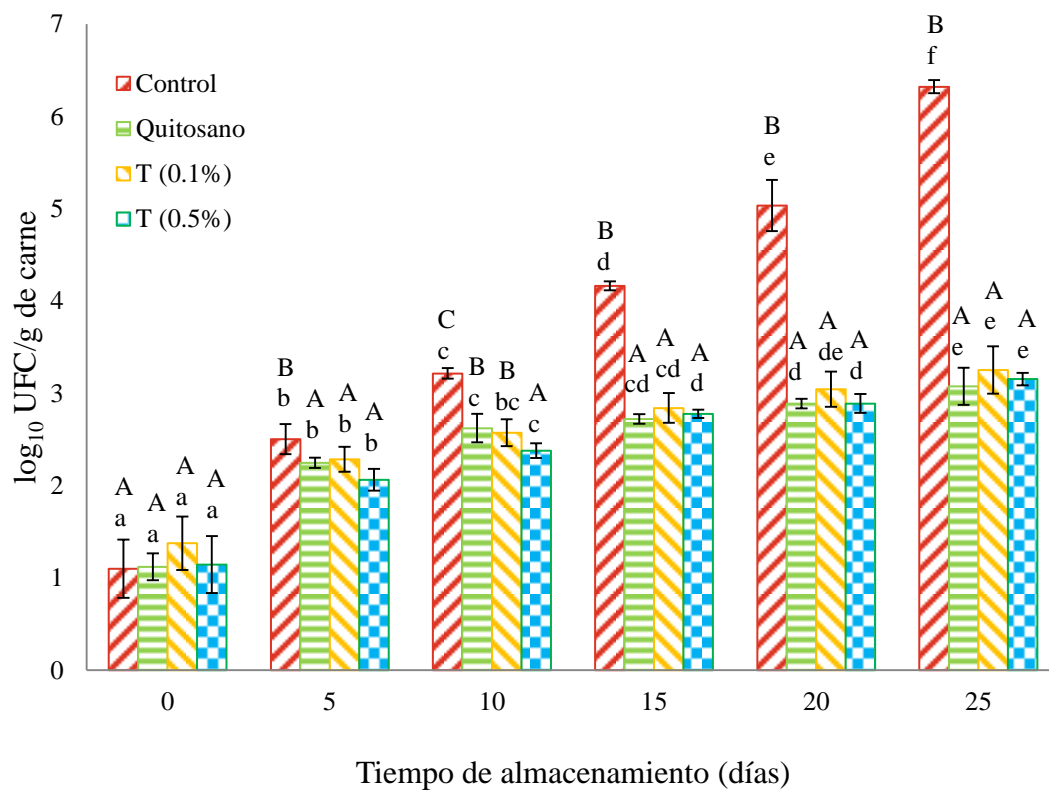


Figura 25. Cuenta total de mesófilos aerobios expresados como \log_{10} UFC/g de carne.

^{A-C} Denotan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre tratamientos el mismo día.
^{a-f} Denotan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) de un tratamiento a lo largo del tiempo.

calentamiento. Como ya se ha mencionado, la función del té verde como agente bactericida está en función del tipo de bacteria (Arakawa *et al.*, 2004; Almajano *et al.*, 2008).

Los resultados de la evaluación de los microorganismos psicrófilos se muestran en la Figura 26 donde se observa el comportamiento de estos a lo largo de 25 días de almacenamiento con los diferentes recubrimientos y el control. Al inicio del almacenamiento (día 0) todos los tratamientos presentaron una carga microbiana similar ($p>0.05$), siendo hasta el día 25 cuando se observan diferencias ($p<0.05$) en el desarrollo de los microorganismos, excepto para el tratamiento Q (1)-T (0.5), el cual no presentó diferencias ($p>0.05$) a lo largo de los 25 días de duración del almacenamiento.

Por otro lado, el crecimiento de microorganismos del tratamiento control presentó diferencias del resto de los tratamientos a partir del día 10, siendo más notable la diferencia a lo largo del tiempo, llegando a presentar valores 200 veces más que el resto de los tratamientos, los cuales no mostraron diferencias significativas ($p>0.05$) a lo largo del experimento, sin importar la composición del recubrimiento.

Entre los tratamientos con los diferentes porcentajes de adición de extracto de té verde y el quitosano, no existe una diferencia con respecto a su capacidad inhibitoria de bacterias psicrófilas, por lo que parece superflua la adición del extracto en los recubrimientos para mejorar su capacidad antimicrobiana.

Color de la Carne

La evaluación del color de la carne y del hueso fueron realizadas en las mismas condiciones, es decir, la medición del color fue utilizando el mismo equipo (geometría), así como la relación iluminante/observador, escala de color y preparación de muestras.

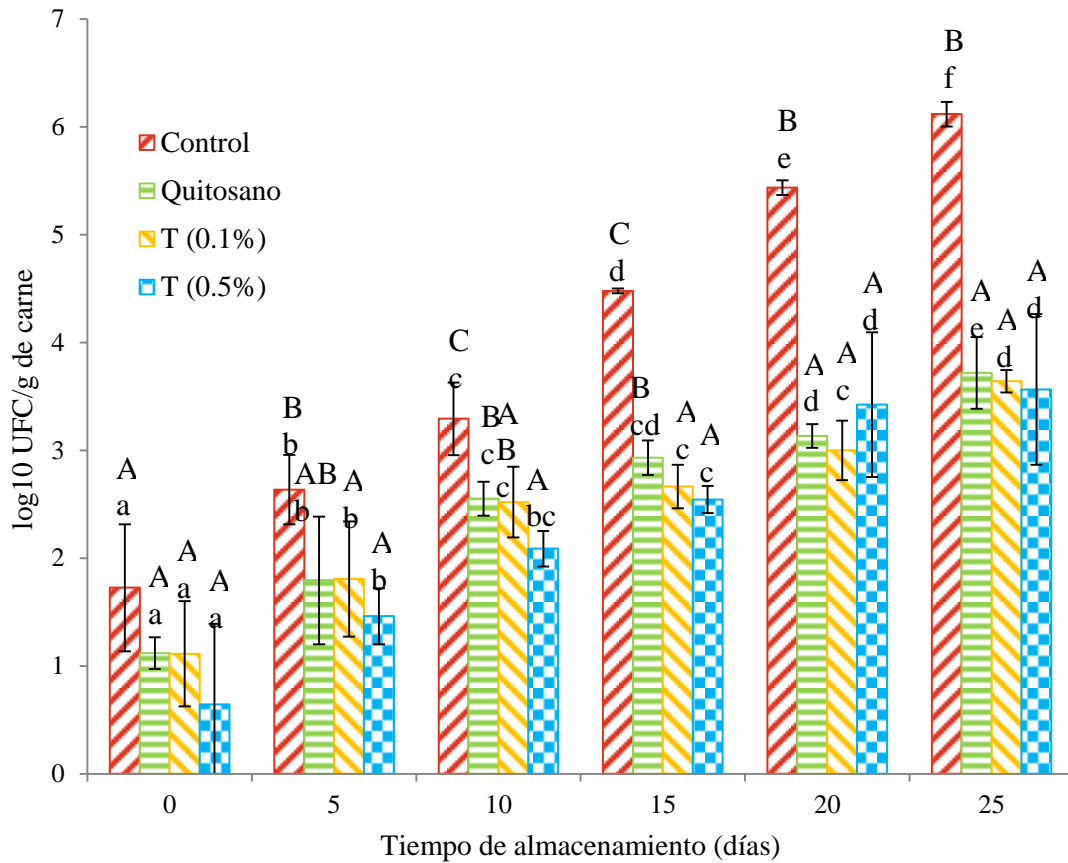


Figura 26. Cuenta en placa de bacterias psicrófilas aerobias totales expresados como \log_{10} UFC/g de carne.

^{A-C} Denotan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre tratamientos el mismo día.

^{a-f} Denotan diferencias estadísticas ($p < 0.05$) de un tratamiento a lo largo del tiempo.

En la Tabla 15 se muestran los resultados de esta evaluación, donde se observa que no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la mayoría de los parámetros evaluados. La falta de cambios en los parámetros de color de la carne, es en sí mismo un resultado alentador, pues significa que los tratamientos aplicados no repercutirán en el color y como se ha mencionado en los antecedentes, el color de la carne es el criterio principal por el cual el consumidor evalúa su calidad y aceptabilidad y los consumidores prefieren carne frescas de color rojo brillante (Faustman *et al.*, 2010).

Durante almacenamiento no se presentaron cambios en el color, lo cual puede deberse al empaque al vacío, ya que se ha demostrado que la ausencia de oxígeno reduce los cambios en color (Grobbel *et al.*, 2006; Veberg *et al.*, 2006). También es importante mencionar que los diversos autores que estudian los cambios de color en la carne, ponen más énfasis sobre los parámetros L^* , a^* y C^* (Mancini *et al.*, 2004; Mancini *et al.*, 2007b; Faustman *et al.*, 2010; Suman *et al.*, 2011), siendo pocos autores quienes consideran los parámetros b^* y H^* , pues estos muestran menos variación.

Como puede apreciarse en el Tabla 15 no se observaron diferencias ($p > 0.05$) entre tratamientos para el parámetro a^* , ni a lo largo del tiempo de almacenamiento. Suman *et al.* (2011) probaron la aplicación de quitosano al 1% sobre carne de bovino, observando que los empaques al vacío mostraron los valores más bajos de a^* , siendo menos drástica esta disminución en aquellos tratamientos donde se aplicó quitosano. Considerando que el principal responsable del parámetro de color a^* de la carne es la concentración y estado del pigmento mioglobina (Gill, 1996) es de esperarse que los cambios sean menos notables en músculos con baja concentración de este pigmento.

Por lo anterior, la ausencia de diferencias en el color puede atribuirse a una serie de factores, entre estos la baja concentración de pigmentos por el tipo de músculo y la utilización del empaque al vacío. Sobre la implementación del envase a vacío, Veberg *et al.* (2006) observaron la disminución de cambios en los parámetros de color L^* , a^* y b^* , por efecto del empaque al vacío en carne molida de cerdo y pavo.

Tabla 15. Valores de L*, a*, b*, C* y H* para la carne con aplicación del recubrimiento.

	Día	Q(0)*-T(0)**	Q(1)*-T(0)**	Q(1)*-T(0.1)**	Q(1)*-T(0.5)**
L*	0	47.01±7.86 Aa	50.99±5.48 Aa	51.63±5.01 Aa	54.08±7.71 Aa
	5	50.81±3.08 Aa	58.28±2.87 Aa	57.38±2.19 Aa	54.74±5.71 Aa
	10	52.34±4.08 Aa	54.63±2.81 Aa	56.92±1.55 Aa	51.10±2.0 ABa
	15	52.50±4.20 Aa	53.53±3.95 Aa	53.32±3.58 Aa	53.46±1.94 Aa
	20	52.77±3.50 Aa	54.62±4.37 Aa	51.22±4.44 Aa	53.05±4.36 Aa
	25	53.63±4.48 Aa	54.01±5.25 Aa	54.15±3.45 Aa	53.22±5.81 Aa
a*	0	1.78±0.37 Aa	1.28±0.18 Aa	1.72±0.69 Aa	2.02±0.72 Aa
	5	1.50±0.52 Aa	1.36±0.42 Aab	1.50±0.41 Aa	2.04±0.35 Aa
	10	1.93±0.36 Aa	1.58±0.22 Aab	2.13±0.52 Aa	2.39±0.39 Aa
	15	2.18±0.89 Aa	1.96±0.87 Aab	1.99±0.47 Aa	2.71±0.86 Aa
	20	2.24±0.47 Aa	2.15±0.55 Aab	2.40±0.67 Aa	3.05±0.68 Aa
	25	2.46±1.32 Aa	2.36±0.76 Ab	2.24±0.74 Aa	3.18±0.88 Aa
b*	0	10.30±2.95 Aa	9.21±1.69 Aa	9.98±1.44 Aa	12.38±2.10 Aa
	5	9.67±0.50 Aa	12.06±1.3 Aab	12.05±1.84 Aa	12.59±1.62 Aa
	10	9.68±0.72 Aa	10.19±1. Abab	12.13±0.96 Ca	11.43±0.3 BCa
	15	9.94±1.47 Aa	10.70±0.8 Aab	12.11±2.94 Aa	12.56±1.82 Aa
	20	9.25±2.35 Aa	10.74±1.7 Aab	11.09±2.25 Aa	12.57±3.00 Aa
	25	11.25±2.62 Aa	13.05±2.63 Ab	12.87±2.11 Aa	14.12±2.66 Aa
C*	0	10.47±2.96 Aa	9.29±1.67 Aa	10.18±1.40 Aa	12.64±1.9 Aa
	5	9.82±0.53 Aa	12.16±1.40 Aab	12.15±1.87 Aa	12.79±1.6 Aa
	10	9.88±0.69 Aa	10.32±1.13 Aab	12.34±0.99 Aa	11.70±0.3 Aa
	15	10.23±1.58 Aa	10.95±1.01 Aab	12.62±3.25 Aa	12.89±1.9 Aa
	20	10.38±1.70 Aa	11.75±0.94 Abab	12.23±1.2 ABa	13.76±2.1 Ba
	25	11.56±2.77 Aa	13.28±2.70 Ab	13.08±2.19 Aa	14.52±2.6 Aa
H*	0	80.07±1.62 Aa	83.84±1.79 Aa	80.09±4.35 Aa	80.82±3.63 Aa
	5	81.30±2.86 Aa	83.63±1.85 Aa	83.05±1.08 Aa	80.66±1.68 Aa
	10	78.66±2.30 Aa	81.22±1.30 Aa	80.15±2.02 Aa	78.29±1.67 Aa
	15	78.12±3.72 Aa	80.14±3.55 Aa	78.13±3.56 Aa	77.78±2.72 Aa
	20	81.64±2.46 Aa	82.29±2.15 Aa	81.85±1.30 Aa	79.65±1.12 Aa
	25	78.19±4.95 Aa	79.92±2.03 Aa	80.30±2.08 Aa	77.14±4.03 Aa

^{A-B} Demuestran las diferencias estadísticas (p<0.05) de los promedios ± DE por fila.

^{a-c} Demuestran las diferencias estadísticas (p<0.05) de los promedios ± DE por columna.

*porcentaje de adición de quitosano en el recubrimiento.

**porcentaje de adición de extracto de té verde en el recubrimiento.

Color del Hueso

El oscurecimiento del hueso se caracteriza por una disminución de los parámetros L^* y a^* y puede ser causa de rechazo de un producto cárnico por parte del consumidor (Mancini *et al.*, 2004; Mancini *et al.*, 2007a). Como se puede apreciar en la Tabla 16, en este experimento no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en ninguno de los parámetros de color (L^* , a^* , b^* , C^* y H^*) durante los 25 días de almacenamiento en todos los tratamientos (control, quitosano y quitosano adicionado con té verde), es decir, no se presentó el fenómeno de oscurecimiento del hueso. Esto probablemente se deba a la utilización del envase a vacío, ya que respecto a esto Grobbel *et al.* (2006), analizaron el efecto del tipo de envasado en la decoloración de la médula ósea, observando que la decoloración de ésta se presentó en una atmósfera rica en oxígeno; mientras que los huesos envasados en una atmósfera con bajo nivel de oxígeno, mostraron una decoloración mínima. Sin embargo, los resultados de esta investigación muestran que se pueden observar ciertas tendencias en el comportamiento de los parámetros de color.

En el día cero, L^* se mostró valores más altos para los tratamientos con aplicación del recubrimiento que para el control ($p < 0.05$); esta diferencia desapareció a partir del día 5 en adelante, excepto en el recubrimiento de quitosano, Q (1)-T (0), con el cual se observó un aumento ($p < 0.05$) a lo largo del tiempo. Por otra parte, aunque no se presentó una diferencia ($p > 0.05$), el tratamiento control mostró la misma tendencia al aumentar el valor L^* , lo que concuerda con lo descrito por Siripatrawan y Noipha (2012), quienes observaron un aumento en el tratamiento control de una salchicha de cerdo, así como una disminución en este mismo parámetro a lo largo de 20 días de almacenamiento al aplicar un recubrimiento de quitosano y té verde.

En cuanto al valor a^* se observa una tendencia a disminuir, aunque sin llegar a presentar diferencia ($p > 0.05$) entre los tratamientos, hasta el día 25, cuando se observa que esta disminución es mayor ($p < 0.05$) en el tratamiento de quitosano que en el control, colocando a los tratamientos que incluyeron té verde en valores intermedios. Este efecto provocado por la adición del extracto puede deberse a la capacidad antioxidante del té

verde, pues para prevenir el oscurecimiento del hueso, se han realizado estudios probando el efecto de la aplicación de ácido ascórbico y eritorbato de sodio a diferentes concentraciones, entre 0.5 y 1.5%, sobre vértebras lumbares de bovino, logrando la inhibición del ennegrecimiento, lo cual se ha atribuido a las propiedades antioxidantes de estos compuestos (Mancini *et al.*, 2004; Mancini *et al.*, 2007a).

El valor de b^* , C^* y H^* muestran una tendencia a la disminución en todos los tratamientos, aunque no llegan a mostrarse diferencias ($p>0.05$). Al respecto es importante enfatizar que en investigaciones realizadas sobre oscurecimiento del hueso, generalmente se realizan en hueso de bovino, por el mayor contenido del pigmento mioglobina, lo que hace más drásticas las diferencias, como lo observado por Mancini *et al.* (2004), quienes observaron cambios en todos los parámetros de color en sólo 24 horas, en bovino envasado en una atmósfera rica en oxígeno.

En la literatura existen dos teorías sobre cómo ocurre el fenómeno conocido como oscurecimiento del hueso. Para Gill (1996) se produce por la acumulación de hemoglobina en las superficies cortadas del hueso, ya que al cortar la carne, este pigmento se libera en la superficie, provocando que con el tiempo y a través de la exposición al aire, la hemoglobina en la superficie del hueso cambie de color de rojo a marrón, e incluso a negro. La otra posible causa del oscurecimiento del hueso puede ser debida a la oxidación de los lípidos; Miller *et al.* (1982) afirmaron que la médula ósea es más parecida al tejido adiposo que a los músculos o al tejido hepático. Por lo anterior, se cree que la oxidación de lípidos puede ser otro mecanismo de oscurecimiento de la médula ósea. Más recientemente Grobbel *et al.* (2006), analizaron el efecto del tipo de envasado en la decoloración de la médula ósea e indicaron que dicha decoloración puede ser causada por la oxidación de la hemoglobina, pero también puede ser resultado de la oxidación de lípidos, o una combinación de ambos factores.

Tabla 16. Valores de L*, a*, b*, C* y H* para el hueso con aplicación del recubrimiento.

Día	Q(0)*-T(0)**	Q(1)*-T(0)**	Q(1)*-T(0.1)**	Q(1)*-T(0.5)**	
L*	0	41.38±2.43 Aa	46.38±1.61 Ba	46.04±1.72 Ba	47.19±2.41 Ba
	5	44.33±4.67 Aa	49.43±5.48 Aab	48.11±0.90 Aa	46.87±3.77 Aa
	10	48.25±4.45 Aa	48.67±1.82 Aab	48.65±3.16 Aa	45.90±4.03 Aa
	15	48.25±5.41 Aa	51.97±1.60 Ab	49.38±3.22 Aa	47.54±2.24 Aa
	20	46.67±4.39 Aa	52.40±3.88 Ab	49.71±2.13 Aa	48.64±4.00 Aa
	25	45.59±4.49 Aa	52.30±1.92 Bb	47.35±3.08 Aa	47.77±3.09 Ba
a*	0	17.52±3.47 Ba	13.25±1.86 Aa	12.59±2.31 Aa	11.02±2.29 Aa
	5	14.80±5.34 Aa	9.95±2.95 Aa	9.35±1.39 Aa	8.81±1.14 Aa
	10	12.31±4.39 Aa	9.29±2.63 Aa	10.12±3.37 Aa	11.95±2.90 Aa
	15	9.85±3.54 Aa	7.69±1.44 Aa	7.31±2.86 Aa	7.79±2.75 Aa
	20	13.69±6.27 Aa	9.93±5.26 Aa	9.75±5.20 Aa	10.38±6.12 Aa
	25	11.25±3.03 Ba	7.09±1.66 Aa	8.79±1.30 ABa	8.77±2.86ABa
b*	0	17.67±1.33 Aa	16.43±1.00 Aa	14.96±2.27 Aa	15.21±1.75 Aa
	5	15.65±2.79 Aa	14.45±1.75 Aa	12.29±1.33 Aa	12.73±0.87 Aa
	10	16.14±1.44 Aa	13.45±2.69 Aa	12.95±3.64 Aa	15.12±1.02 Aa
	15	15.69±3.16 Aa	12.61±2.37 Aa	12.74±2.40 Aa	12.11±2.44 Aa
	20	14.18±1.39 Aa	13.60±2.93 Aa	12.18±2.18 Aa	12.97±1.42 Aa
	25	15.85±1.66 Aa	12.76±3.34 Aa	12.61±1.35 Aa	13.33±2.58 Aa
C*	0	24.96±3.16 Ba	21.21±1.59 Aba	19.65±3.18 Aa	18.85±2.70 Aa
	5	21.64±5.62 Aa	17.65±2.94 Aa	15.52±1.16 Aa	15.58±1.33 Aa
	10	20.43±3.82 Aa	16.47±3.53 Aa	16.46±4.95 Aa	20.25±2.37 Aa
	15	18.76±3.51 Ba	14.89±2.74 Aba	13.02±3.81 Aa	13.50±3.72 Aa
	20	20.02±5.31 Aa	17.30±4.47 Aa	15.98±4.26 Aa	17.02±4.87 Aa
	25	19.74±0.95 Ba	14.67±3.48 Aa	15.40±1.77 Aa	16.06±3.46 Aa
H*	0	45.70±4.27 Aa	51.58±3.78 Aa	50.70±1.33 Aa	55.06±3.37 Aa
	5	47.77±5.65 Aa	56.44±6.80 Aa	52.80±5.71 Aa	55.66±2.35 Aa
	10	53.71±7.21 Aa	55.56±4.64 Aa	52.51±2.18 Aa	53.92±5.56 Aa
	15	58.04±9.41 Aa	58.86±3.10 Aa	55.64±3.51 Aa	54.51±2.29 Aa
	20	47.59±9.45 Aa	51.50±9.48 Aa	48.07±9.04 Aa	50.40±9.91 Aa
	25	54.56±9.28 Aa	60.34±4.95 Aa	55.38±2.21 Aa	57.09±5.95 Aa

A–B Demuestran las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) de los promedios \pm DE por fila.
a–c Demuestran las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) de los promedios \pm DE por columna.

*porcentaje de adición de quitosano en el recubrimiento.

**porcentaje de adición de extracto de té verde en el recubrimiento.

Correlaciones de Pearson entre Variables

En la Tabla 17 se pueden observar las Correlaciones de Pearson para las variables cuantificadas en la aplicación del recubrimiento. La correlación más alta se presenta para psicrófilos y mesófilos, lo cual podría ser debido a que ambas dependen de los mismos factores, como tratamiento, y tiempo de almacenamiento. Estas variables (psicrófilos y mesófilos) también mostraron una correlación con el pH de la carne, obteniéndose valores de $r=0.57$ y $r=0.63$, respectivamente, y el pH a su vez mostró una correlación elevada a la aplicación de quitosano.

Otras correlaciones altas ($r>0.8$) se observaron en las variables de color ya que los valores de C^* y H^* dependen de a^* y b^* , las correlaciones se observadas son esperadas.

Por otra parte, el valor a^* de la carne y del hueso muestran correlaciones bajas con la formación de TBARS, $r=0.17$ y $r=0.14$, respectivamente, lo que significa que ninguno de estos parámetros son importantes para explicar el comportamiento de la oxidación de lípidos de forma individual. Lo cual contradice lo descrito por investigaciones anteriores (Gill, 1996; Mancini *et al.*, 2004; Faustman *et al.*, 2010) que aseguran existe una fuerte relación entre el color rojo de la carne y hueso, y la oxidación de lípidos.

La ausencia de correlaciones elevadas, no significa necesariamente la falta de relación, pues un factor puede no impactar en otro de forma directa pero puede ser determinante cuando interacciona con otros factores. A continuación se presentan las regresiones múltiples que más se ajustan para predecir una variable específica, es decir con el mayor coeficiente de determinación (R^2) para todas las variables analizadas en la aplicación del recubrimiento.

Las regresiones con mejor ajuste fueron el \log_{10} de psicrófilos y \log_{10} de mesófilos, con una R^2 de 0.9677 y 0.9233, respectivamente. Para ambas variables se

Tabla 17. Cuadro de correlación de Pearson de variables cuantificadas en la aplicación del recubrimiento

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
q	0.31	-0.17	-0.49	0.10	0.12	-0.16	0.03	-0.09	0.27	0.12	0.17	0.18	0.19	0.00	0.30	0.30
p	0.77	-0.63	-0.35	0.51	-0.21	-0.12	-0.03	-0.10	0.07	0.00	0.33	0.00	0.02	-0.26	0.95	1
o	0.75	-0.55	-0.26	0.56	-0.23	-0.13	-0.08	-0.12	0.05	0.15	0.33	0.08	0.10	-0.20	1	
n	-0.28	0.12	-0.22	-0.36	0.12	-0.15	-0.27	-0.22	-0.07	0.36	-0.78	-0.19	-0.25	1		
m	0.43	0.37	0.36	0.15	0.35	-0.56	-0.38	-0.47	0.53	0.58	0.70	0.99	1			
l	0.41	0.39	0.35	0.13	0.37	-0.57	-0.40	-0.49	0.54	0.62	0.65	1				
k	0.51	0.00	0.32	0.42	-0.02	-0.24	-0.04	-0.14	0.32	0.01	1					
j	0.18	0.32	-0.06	-0.05	0.41	-0.43	-0.41	-0.45	0.26	1						
i	0.41	0.23	0.08	-0.10	0.70	-0.74	-0.26	-0.51	1							
h	-0.36	-0.20	-0.10	0.10	-0.52	0.94	0.91	1								
g	-0.25	-0.21	-0.16	0.05	-0.34	0.76	1									
f	-0.43	-0.21	-0.12	0.12	-0.64	1										
e	0.08	0.45	-0.02	-0.40	1											
d	0.26	-0.53	-0.08	1												
c	0.03	0.48	1													
b	-0.11	1														
a	1															

Donde las literales representan:

a: Tiempo (días), b: [Quitosano], c: [Té verde], d: pH de la carne, e: L* de hueso, f: a* de hueso, g: b* de hueso, h: C* de hueso, i: h* de hueso, j: L* de carne, k: a* de carne, l: b* de carne, m: C* de carne, n: h* de carne, o: log₁₀ mesófilos, p: log₁₀ psicrófilos y q: TBARS

observa que el parámetro que más influye sobre su comportamiento es la concentración de TBARS, seguido por el pH durante almacenamiento (Ec. 1 y 2).

El pH de almacenamiento es explicado por el modelo presentado en la ecuación 3, con una $R^2=0.7262$, y se observa que el parámetro que tiene una mayor influencia en su comportamiento es la concentración de TBARS.

A su vez la concentración de TBARS es explicada fuertemente ($R^2=0.6040$) por la concentración de té empleada en el recubrimiento y el pH durante almacenamiento.

El parámetro de color a^* de la carne, está fuertemente influenciado ($R^2=0.5714$) de forma negativa por (TBARS) y seguido de lejos por (pH). Esto refuerza la teoría de que el aumento de la oxidación de lípidos reduce el índice de rojo en la carne fresca.

$$\text{Ec. 1) } \log_{10} \text{ psicrófilos} = -4.62 + 3.29(\text{TBARS}) + 1.12(\text{pH}) - 1.94(b^* \text{ de carne}) + 1.73(C^* \text{ de carne}) - 1.01([\text{quit}]) - 0.46([\text{té}]) + 0.11(\text{día}) + 0.07(L^* \text{ de carne}) + 0.05(b^* \text{ de hueso}) - 0.05(C^* \text{ de hueso}) - 0.05(h^* \text{ de hueso}) + 0.02(L^* \text{ de hueso}) + 0.01(a^* \text{ de carne}) + 0.01(h^* \text{ de carne})$$

$$R^2=0.9677$$

$$\text{Ec. 2) } \log_{10} \text{ mesófilos} = -7.23 + 7.86(\text{TBARS}) + 2.49(\text{pH}) - 0.74([\text{quit}]) - 0.61(C^* \text{ de carne}) + 0.43([\text{té}]) - 0.36(a^* \text{ de hueso}) + 0.34(a^* \text{ de carne}) + 0.25(C^* \text{ de hueso}) + 0.25(b^* \text{ de carne}) + 0.16(L^* \text{ de carne}) + 0.10(\text{día}) - 0.09(h^* \text{ de hueso}) + 0.05(b^* \text{ de hueso}) + 0.05(a^* \text{ de carne}) + 0.03(L^* \text{ de hueso})$$

$$R^2=0.9233$$

$$\text{Ec. 3) } \text{pH} = 2.4884 - 1.30(\text{TBARS}) + 0.18(a^* \text{ de carne}) + 0.17(C^* \text{ de carne}) + 0.16(b^* \text{ de carne}) - 0.11([\text{quit}]) + 0.07(a^* \text{ de hueso}) - 0.03(C^* \text{ de hueso}) + 0.02(h^* \text{ de carne}) + 0.02(h^* \text{ de hueso}) - 0.02(b^* \text{ de hueso}) - 0.01([\text{té}])$$

$$R^2=0.7262$$

$$\text{Ec. 4) TBAR} = -0.16 - 0.07 ([\text{té}]) - 0.06 (\text{pH}) + 0.02 (C^* \text{ de carne}) + 0.02 (a^* \text{ de carne}) - 0.01 (b^* \text{ de carne})$$

$$R^2 = 0.6040$$

$$\text{Ec. 5) } a^* \text{ de carne} = -12.68 + 11.95 (\text{TBARS}) + 2.44 (\text{pH}) + 2.25 ([\text{té}]) - 0.06 ([\text{quit}]) + 0.04 (\text{día})$$

$$R^2 = 0.5714$$

Donde (día) se refiere al tiempo de almacenamiento en refrigeración en días, ([TBARS]) se refiere a la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en la carne expresada en mg de MDA/kg de carne, ([quit]) y ([té]) representan la concentración de quitosano y de té verde empleadas en el recubrimiento aplicado en la carne, (pH) es el pH de la carne a lo largo del almacenamiento, (\log_{10} psicrófilos) y (\log_{10} mesófilos), se refieren al logaritmo de base 10 de la carga microbiana de bacterias psicrófilas y mesófilas, (L* de carne), (a* de carne), (b* de carne), (C* de carne), (h* de carne) se refiere al valor L*, a*, b*, C, h* de la carne, respectivamente, y (L* de hueso), (a* de hueso), (b* de hueso), (C* de hueso), (h* de hueso), se refieren al valor L*, a*, b*, C, h* del hueso.

VI. CONCLUSIONES

- El extracto de té verde industrial presentó mayor contenido de compuestos fenólicos, así como mayor capacidad antioxidante. Conforme aumenta el porcentaje de adición de los extractos de té verde en el recubrimiento, aumenta la capacidad de inhibición del radical DPPH.
- La capacidad antimicrobiana del quitosano y el té verde, así como de la combinación de ambos, se presenta en función del tipo de bacteria, siendo el extracto el más eficaz en las bacterias Gram positivas; mientras que para el caso del recubrimiento, el adicionado con extracto inhibe en mayor medida el crecimiento de las bacterias Gram negativas.
- Las propiedades mecánicas de los recubrimientos consideradas como más apropiadas para su uso como envase, se manifiestan en las concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.5 % para ambos extractos.
- El extracto industrial genera recubrimientos con menor luminosidad. Sin embargo, se observó que la aplicación del recubrimiento no afecta el color de la carne durante el almacenamiento.
- La inhibición de bacterias aerobias totales, tanto psicrófilas como mesófilas depende de la aplicación de quitosano; mientras que la reducción de la oxidación se presenta en función de la adición de té verde. Por lo que ambos compuestos se complementan para prolongar la vida útil de la carne de cerdo fresca envasada al vacío y conservada en refrigeración.

- Las diferentes concentraciones de té verde incluidas en el recubrimiento, no generaron diferencias en los parámetros de calidad de la carne; por lo que cualquiera de las concentraciones adicionadas pudiera utilizarse sin repercutir en la efectividad del recubrimiento.
- La combinación de extracto de té verde y quitosano en el desarrollo de los recubrimientos comestibles, prolongó la conservación de la carne de cerdo por 25 días.

VII. LITERATURA CITADA

- Agulló, E., M. S. Rodríguez, V. Ramos, y L. Albertengo. 2003. Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food. *Macromolecular Bioscience* 3: 521-530.
- Almajano, M. P., R. Carbó, J. A. L. Jiménez, y M. H. Gordon. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry* 108: 55-63.
- Apple, J. K., C. V. Maxwell, D. L. Galloway, C. R. Hamilton, y J. W. S. Yancey. 2009. Interactive effects of dietary fat source and slaughter weight in growing-finishing swine: II. Fatty acid composition of subcutaneous fat. *Journal of Animal Science* 87: 1423-1440.
- Arakawa, H., M. Maeda, S. Okubo, y T. Shimamura. 2004. Role of Hydrogen Peroxide in Bactericidal Action of Catechin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27: 277-281.
- Atarés, L., J. Bonilla, y A. Chiralt. 2010. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering* 100: 678-687.
- Averill, B., y P. Eldredge. 2011. *Chemistry: Principles, Patterns, and Applications*. Flat World Knowledge. ISBN: 978-1-4533-3122-4. disponible en: <http://catalog.flatworldknowledge.com/catalog/editions/averillfwk-general-chemistry-principles-patterns-and-applications-1-0>. 1 ed.
- Bartoň, L., D. Bureš, R. Kotrba, y J. Sales. 2014. Comparison of meat quality between eland (*Taurotragus oryx*) and cattle (*Bos taurus*) raised under similar conditions. *Meat Science* 96: 346-352.
- Beer, F., y E. Jonhston. 1995. *Mecánica de los Materiales*. 3ª edición. Colombia: Mc Graw-Hill.
- Bégin, A., y M.-R. Van Calsteren. 1999. Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 26: 63-67.
- Berg, J. M., L. Stryer, y J. L. Tymoczko. 2008. *Bioquímica*. Reverté.
- Bitencourt, C. M., C. S. Fávaro-Trindade, P. J. A. Sobral, y R. A. Carvalho. 2014. Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. *Food Hydrocolloids* 40: 145-152.
- Blakistone, B. A. 1998. *Principles and applications of modified atmosphere packaging of foods*. Springer.
- Boselli, E., M. T. Rodriguez-Estrada, F. Ferioli, M. F. Caboni, y G. Lercker. 2010. Cholesterol photosensitised oxidation of horse meat slices stored under different packaging films. *Meat Science* 85: 500-505.
- Brewer, M. S., L. G. Zhu, B. Bidner, D. J. Meisinger, y F. K. McKeith. 2001. Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. *Meat Science* 57: 169-176.

- Caponi, S. 1997. Georges Canguilhem y el estatuto epistemológico del concepto de salud. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos* 4: 287-307.
- Cardenia, V., M. T. Rodríguez-Estrada, E. Boselli, y G. Lercker. 2013. Cholesterol photosensitized oxidation in food and biological systems. *Biochimie* 95: 473-481.
- Cardenia, V., M. T. Rodríguez-Estrada, F. Cumella, L. Sardi, G. Della Casa, y G. Lercker. 2011. Oxidative stability of pork meat lipids as related to high-oleic sunflower oil and vitamin E diet supplementation and storage conditions. *Meat Science* 88: 271-279.
- Coma, J., y J. Piquer. 1999. Calidad de carne en porcino: efecto de la nutrición. XV Curso de Especialización. *Avances en nutrición animal Grupo Vall Companys*.
- Coma, V. 2008. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science* 78: 90-103.
- Choi, Y. M., K. C. Jung, J. H. Choe, y B. C. Kim. 2012. Effects of muscle cortisol concentration on muscle fiber characteristics, pork quality, and sensory quality of cooked pork. *Meat Science* 91: 490-498.
- Damon, M., K. Denieul, A. Vincent, N. Bonhomme, J. Wyszynska-Koko, y B. Lebret. 2013. Associations between muscle gene expression pattern and technological and sensory meat traits highlight new biomarkers for pork quality assessment. *Meat Science* 95: 744-754.
- Debeaufort, F., J.-A. Quezada-Gallo, y A. Voilley. 1998. Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38: 299-313.
- Durango, A. M., N. F. F. Soares, y N. J. Andrade. 2006. Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control* 17: 336-341.
- El Ghaouth, A., J. Arul, C. Wilson, y N. Benhamou. 1997. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology* 12: 183-194.
- Fadda, A., M. Serra, M. G. Molinu, E. Azara, A. Barberis, y D. Sanna. 2014. Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical. *Journal of Food Composition and Analysis* 35: 112-119.
- Fajardo, P., J. T. Martins, C. Fuciños, L. Pastrana, J. A. Teixeira, y A. A. Vicente. 2010. Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering* 101: 349-356.
- Falguera, V., J. P. Quintero, A. Jiménez, J. A. Muñoz, y A. Ibarz. 2011. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology* 22: 292-303.
- Fan, W., J. Sun, Y. Chen, J. Qiu, Y. Zhang, y Y. Chi. 2009. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry* 115: 66-70.
- FAO. 2014. Composición de la carne. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. disponible en: <http://www.fao.org/ag/ags/gestion-poscosecha/carne-y-productos-carnicos/antecedentes-y-consumo-de-carne/composicion-de-la-carne/es/>.

- FAOSTAT. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from: <http://faostat3.fao.org/compare/S>.
- Faustman, C., Q. Sun, R. Mancini, y S. P. Suman. 2010. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science* 86: 86-94.
- Font-i-Furnols, M., y L. Guerrero. 2014. Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview. *Meat Science* 98: 361-371.
- Forester, S. C., y J. D. Lambert. 2014. Chapter 98 - Cancer Preventive Effects of Green Tea Polyphenols. In: R. R. Watson, V. R. Preedy and S. Zibadi (eds.) *Polyphenols in Human Health and Disease*. p 1309-1322. Academic Press, San Diego.
- Forrest, J., E. D. Aberle, H. B. Hedrick, M. D. Judge, y R. A. Merkel. 1979. *Fundamentos de la ciencia de la carne*. Ed. Cribia. Zaragoza, España.
- Frei, B., y J. V. Higdon. 2003. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. *The Journal of Nutrition* 133: 3275S-3284S.
- Gennadios, A., M. A. Hanna, y L. B. Kurth. 1997. Application of Edible Coatings on Meats, Poultry and Seafoods: A Review. *LWT - Food Science and Technology* 30: 337-350.
- Gill, C. O. 1996. Extending the storage life of raw chilled meats. *Meat Science* 43, Supplement 1: 99-109.
- Grobbel, J. P., M. E. Dikeman, J. S. Smith, D. H. Kropf, y G. A. Milliken. 2006. Effects of polyvinyl chloride overwrap film, high-oxygen modified atmosphere packaging, or ultra-low-oxygen modified atmosphere packaging on bone marrow discoloration in beef humerus, rib, thoracic vertebra, and scapula. *Journal of Animal Science* 84: 694-701.
- Honikel, K.-O. 1997. Reference methods supported by OECD and their use in Mediterranean meat products. *Food Chemistry* 59: 573-582.
- ISO-9000. 2005. *Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario*. Organización Internacional de Normalización.
- Jung, J., y Y. Zhao. 2012. Comparison in antioxidant action between α -chitosan and β -chitosan at a wide range of molecular weight and chitosan concentration. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20: 2905-2911.
- Katalinic, V., M. Milos, T. Kulisic, y M. Jukic. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94: 550-557.
- Kim, G.-D., E.-Y. Jung, H.-J. Lim, H.-S. Yang, S.-T. Joo, y J.-Y. Jeong. 2013. Influence of meat exudates on the quality characteristics of fresh and freeze-thawed pork. *Meat Science* 95: 323-329.
- Kong, M., X. G. Chen, K. Xing, y H. J. Park. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 144: 51-63.
- Kumar, P., J. Rao, Y. Haribabu, y Manjunath. 2014. Microbiological Quality of Meat Collected from Municipal Slaughter Houses and Retail Meat Shops from Hyderabad Karnataka Region, India. *APCBEE Procedia* 8: 364-369.
- Labuza, T. P., y L. Dugan Jr. 1971. Kinetics of lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 2: 355-405.
- Leceta, I., P. Guerrero, I. Ibarburu, M. T. Dueñas, y K. de la Caba. 2013. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering* 116: 889-899.

- Ledward, D. A. 1985. Post-slaughter influences on the formation of metmyoglobin in beef muscles. *Meat Science* 15: 149-171.
- Li, H., y T. Yu. 2001. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 269-274.
- Li, J.-H., J. Miao, J.-L. Wu, S.-F. Chen, y Q.-Q. Zhang. 2014. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids* 37: 166-173.
- Li, T., W. Hu, J. Li, X. Zhang, J. Zhu, y X. Li. 2012. Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Food Control* 25: 101-106.
- Lunden, J. M., T. J. Autio, A. M. Sjöberg, y H. J. Korkeala. 2003. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *Journal of food protection* 66: 2062-2069.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, y J. Parker. 2004. Brock biología de los microorganismos.
- Mancini, R. A., M. C. Hunt, K. A. Hachmeister, D. H. Kropf, y D. E. Johnson. 2004. Ascorbic acid minimizes lumbar vertebrae discoloration. *Meat Science* 68: 339-345.
- Mancini, R. A., M. C. Hunt, M. Seyfert, D. H. Kropf, K. A. Hachmeister, T. J. Herald, y D. E. Johnson. 2007a. Comparison of ascorbic acid and sodium erythorbate: Effects on the 24h display colour of beef lumbar vertebrae and longissimus lumborum packaged in high-oxygen modified atmospheres. *Meat Science* 75: 39-43.
- Mancini, R. A., M. C. Hunt, M. Seyfert, D. H. Kropf, K. A. Hachmeister, T. J. Herald, y D. E. Johnson. 2007b. Effects of ascorbic and citric acid on beef lumbar vertebrae marrow colour. *Meat Science* 76: 568-573.
- Martínez-Camacho, A. P., M. O. Cortez-Rocha, J. M. Ezquerro-Brauer, A. Z. Graciano-Verdugo, F. Rodríguez-Félix, M. M. Castillo-Ortega, M. S. Yépiz-Gómez, y M. Plascencia-Jatomea. 2010. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers* 82: 305-315.
- Mas, G., M. Llavall, D. Coll, R. Roca, I. Díaz, M. A. Oliver, M. Gispert, y C. E. Realini. 2011. Effect of an elevated monounsaturated fat diet on pork carcass and meat quality traits and tissue fatty acid composition from York-crossed barrows and gilts. *Meat Science* 89: 419-425.
- Mataragas, M., E. H. Drosinos, A. Vaidanis, y I. Metaxopoulos. 2006. Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and Its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. *Journal of Food Science* 71: M157-M167.
- Mataragas, M., P. N. Skandamis, y E. H. Drosinos. 2008. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. *International Journal of Food Microbiology* 126: 1-12.
- Mbata, T. I., L. U. Debiao, y A. Saikia. 2008. Antibacterial activity of the crude extract of Chinese green tea (*Camellia sinensis*) on *Listeria monocytogenes*. *African Journal of Biotechnology* 7: 1571-1573.
- MEE. 2004. Empacado tipo empleado. Maquilas y Empaques Especiales, S. A. de C. V. Disponible en <http://www.maquilasyempaques.com>.

- Meinert, L., K. Tikk, M. Tikk, P. B. Brockhoff, W. L. P. Bredie, C. Bjerregaard, y M. D. Aaslyng. 2009. Flavour development in pork. Influence of flavour precursor concentrations in longissimus dorsi from pigs with different raw meat qualities. *Meat Science* 81: 255-262.
- Miller, G. J., M. R. Frey, J. E. Kunsman, y R. A. Field. 1982. Bovine Bone Marrow Lipids. *Journal of Food Science* 47: 657-660.
- Miranda, M., G. Cárdenas, D. López, y A. V. Lara-Sagahon. 2003. Comportamiento de películas de Quitosán compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate. *Revista de la Sociedad Química de México* 47: 331-336.
- Moelich, E. I., L. C. Hoffman, y P. J. Conradie. 2003. Sensory and functional meat quality characteristics of pork derived from three halothane genotypes. *Meat Science* 63: 333-338.
- Nakayama, M., K. Shimatani, T. Ozawa, N. Shigemune, T. Tsugukuni, D. Tomiyama, M. Kurahachi, A. Nonaka, y T. Miyamoto. 2013. A study of the antibacterial mechanism of catechins: Isolation and identification of *Escherichia coli* cell surface proteins that interact with epigallocatechin gallate. *Food Control* 33: 433-439.
- Naviera-NYK. 2014. Nippon Yusen Kaisha. Logistica. (Naviera). Disponible en <http://www2.nykline.com/>.
- Nawar, W. W. 1984. Chemical changes in lipids produced by thermal processing. *Journal of chemical education* 61: 299.
- No, H. K., N. Young Park, S. Ho Lee, y S. P. Meyers. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology* 74: 65-72.
- Nowak, A., y M. Piotrowska. 2012. Biochemical activities of *Brochothrix thermosphacta*. *Meat Science* 90: 410-413.
- O'Keeffe, M., y D. E. Hood. 1982. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation on beef from muscles of differing colour stability. *Meat Science* 7: 209-228.
- OMS. 2014. Brote de síndrome hemolítico urémico en Alemania. Organización Mundial de la Salud. Disponible en: http://www.who.int/csr/don/2011_05_27/es/.
- Pan, M.-H., C.-S. Lai, y C.-T. Ho. 2010. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food & Function* 1: 15-31.
- Perva-Uzunalić, A., M. Škerget, Ž. Knez, B. Weinreich, F. Otto, y S. Grüner. 2006. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry* 96: 597-605.
- Pfalzgraf, A., M. Frigg, y H. Steinhart. 1995. α -Tocopherol Contents and Lipid Oxidation in Pork Muscle and Adipose Tissue during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1339-1342.
- PI/INT'L. 1988. Glossary of Packaging Terms: Standard Definitions of Trade Terms Commonly Used in Packaging. Packaging Institute International.
- Pillai, C. K. S., W. Paul, y C. P. Sharma. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34: 641-678.
- Prakash, B., G. Krishnappa, L. Muniyappa, y B. Santhosh Kumar. 2005. Epidemiological Characterization of Avian *Salmonella enterica* Serovar Infections in India. *International Journal of Poultry Science* 6: 388-395.

- Qin, Y.-Y., J.-Y. Yang, H.-B. Lu, S.-S. Wang, J. Yang, X.-C. Yang, M. Chai, L. Li, y J.-X. Cao. 2013. Effect of chitosan film incorporated with tea polyphenol on quality and shelf life of pork meat patties. *International Journal of Biological Macromolecules* 61: 312-316.
- Quintavalla, S., y L. Vicini. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* 62: 373-380.
- Rahman, S. M. E., J. Wang, y D.-H. Oh. 2013. Synergistic effect of low concentration electrolyzed water and calcium lactate to ensure microbial safety, shelf life and sensory quality of fresh pork. *Food Control* 30: 176-183.
- Renner, M., y R. Labas. 1987. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. *Meat Science* 19: 151-165.
- Restrepo, D., C. Arango, y R. Amézquita. 2001. *Industria de carne*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
- Reuben, A., H. Treminio, M. L. Arias, y C. Chaves. 2003. Presencia de *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en alimentos de origen animal en Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 53: 389-392.
- Rickert, J., L. Bressler, C. Ball, y E. Stier. 1957. Factors affecting quality of prepackaged meat. II. Colour studies. C. Effects of air and oxygen under different pressures upon colour of product. *Food Technology* 11: 625-632.
- Robertson, G. L. 2013. *Food packaging: principles and practice*. Third ed. CRC press.
- Roeder, R. K. 2013. Chapter 3 - Mechanical Characterization of Biomaterials. In: A. B. Bose (ed.) *Characterization of Biomaterials*. p 49-104. Academic Press, Oxford.
- Rojano, B. A., C. A. Gaviria, y J. A. Sáez. 2008. Determinación de la actividad antioxidante de un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Vitae* 15: 212-218.
- Rossi, R., G. Pastorelli, S. Cannata, S. Tavaniello, G. Maiorano, y C. Corino. 2013. Effect of long term dietary supplementation with plant extract on carcass characteristics meat quality and oxidative stability in pork. *Meat Science* 95: 542-548.
- Rudnik, E. 2013. 13 - Compostable Polymer Properties and Packaging Applications. In: S. Ebnesajjad (ed.) *Plastic Films in Food Packaging*. p 217-248. William Andrew Publishing, Oxford.
- Ruiz-Navajas, Y., M. Viuda-Martos, E. Sendra, J. A. Perez-Alvarez, y J. Fernández-López. 2013. In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control* 30: 386-392.
- Ryu, Y. C., y B. C. Kim. 2005. The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolic rate, and meat quality of pig longissimus dorsi muscle. *Meat Science* 71: 351-357.
- Sakai, T., K. Yamauchi, S. Kuwazuru, y N. Gotoh. 1998. Relationships between 4-hydroxy-2-nonenal, 2-thiobarbituric acid reactive substances and n-6 polyunsaturated fatty acids in refrigerated and frozen pork. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 62: 2028-2029.
- Sánchez-González, L., M. Vargas, C. González-Martínez, A. Chiralt, y M. Cháfer. 2009. Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids* 23: 2102-2109.

- Sayas-Barberá, E., J. Quesada, E. Sánchez-Zapata, M. Viuda-Martos, F. Fernández-López, J. A. Pérez-Alvarez, y E. Sendra. 2011. Effect of the molecular weight and concentration of chitosan in pork model burgers. *Meat Science* 88: 740-749.
- Schreiber, S. B., J. J. Bozell, D. G. Hayes, y S. Zivanovic. 2013. Introduction of primary antioxidant activity to chitosan for application as a multifunctional food packaging material. *Food Hydrocolloids* 33: 207-214.
- Schumacher, E. F. 2011. Lo pequeño es hermoso. Ediciones AKAL.
- Sebti, I., y V. Coma. 2002. Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. *Carbohydrate Polymers* 49: 139-144.
- Secretaría-de-Salud. NOM-092-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Bienes y servicios. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- Secretaría-de-Salud. NOM-194-SSA1-2004. Norma oficial mexicana. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos. Productos y Servicios. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- Shahidi, F., J. K. V. Arachchi, y Y.-J. Jeon. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology* 10: 37-51.
- Shojaee-Aliabadi, S., H. Hosseini, M. A. Mohammadifar, A. Mohammadi, M. Ghasemlou, S. M. Hosseini, y R. Khaksar. 2014a. Characterization of κ -carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers* 101: 582-591.
- Shojaee-Aliabadi, S., M. A. Mohammadifar, H. Hosseini, A. Mohammadi, M. Ghasemlou, S. M. Hosseini, M. Haghshenas, y R. Khaksar. 2014b. Characterization of nanobiocomposite kappa-carrageenan film with Zataria multiflora essential oil and nanoclay. *International Journal of Biological Macromolecules* 69: 282-289.
- Shrestha, S., y Z. Min. 2006. Effect of lactic acid pretreatment on the quality of fresh pork packed in modified atmosphere. *Journal of Food Engineering* 72: 254-260.
- SIAP. 2012. Ganadería: producción anual. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=369 Accessed agosto 13 2013.
- Siripatrawan, U., y S. Noipha. 2012. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids* 27: 102-108.
- Srinivasa, P. C., M. N. Ramesh, y R. N. Tharanathan. 2007. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids* 21: 1113-1122.
- Suman, S. P., R. A. Mancini, P. Joseph, R. Ramanathan, M. K. R. Konda, G. Dady, y S. Yin. 2011. Chitosan inhibits premature browning in ground beef. *Meat Science* 88: 512-516.
- Sun, X., Z. Wang, H. Kadouh, y K. Zhou. 2014. The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films. *LWT - Food Science and Technology* 57: 83-89.
- Tao, L., y J. D. Lambert. 2014. Chapter 89 - Antioxidant and Pro-Oxidant Activities of Green Tea Polyphenols in Cancer Prevention. In: R. R. Watson, V. R. Preedy

- and S. Zibadi (eds.) *Polyphenols in Human Health and Disease*. p 1191-1198. Academic Press, San Diego.
- Torrescano, G., A. Sánchez-Escalante, B. Giménez, P. Roncalés, y J. A. Beltrán. 2003. Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. *Meat Science* 64: 85-91.
- Vargas, M., A. Albors, A. Chiralt, y C. González-Martínez. 2009. Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids* 23: 536-547.
- Veberg, A., O. Sørheim, J. Moan, V. Iani, P. Juzenas, A. N. Nilsen, y J. P. Wold. 2006. Measurement of lipid oxidation and porphyrins in high oxygen modified atmosphere and vacuum-packed minced turkey and pork meat by fluorescence spectra and images. *Meat Science* 73: 511-520.
- von Staszewski, M., A. M. R. Pilosof, y R. J. Jagus. 2011. Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chemistry* 125: 186-192.
- Wang, L., Y. Dong, H. Men, J. Tong, y J. Zhou. 2013. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids* 32: 35-41.
- Wiegand, I., K. Hilpert, y R. E. W. Hancock. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protocols* 3: 163-175.
- Wood, J. D., G. R. Nute, R. I. Richardson, F. M. Whittington, O. Southwood, G. Plastow, R. Mansbridge, N. da Costa, y K. C. Chang. 2004. Effects of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs. *Meat Science* 67: 651-667.
- Xi, J., D. Shen, Y. Li, y R. Zhang. 2011. Ultrahigh pressure extraction as a tool to improve the antioxidant activities of green tea extracts. *Food Research International* 44: 2783-2787.
- Yin, X., X. Zhang, Q. Lin, Y. Feng, W. Yu, y Q. Zhang. 2004. Metal-coordinating controlled oxidative degradation of chitosan and antioxidant activity of chitosan-metal complex. *Arkivoc* 9: 66-78.
- Zakrys, P. I., S. A. Hogan, M. G. O’Sullivan, P. Allen, y J. P. Kerry. 2008. Effects of oxygen concentration on the sensory evaluation and quality indicators of beef muscle packed under modified atmosphere. *Meat Science* 79: 648-655.
- Zhang, Y., Q. Li, H. Xing, X. Lu, L. Zhao, K. Qu, y K. Bi. 2013. Evaluation of antioxidant activity of ten compounds in different tea samples by means of an on-line HPLC–DPPH assay. *Food Research International* 53: 847-856.

ANEXO 1

Ficha técnica de Extracto Industrial



Rosa Elena Dueñas, S.A. de C.V.
LABORATORIO DE REMEDIOS HERBOLARIOS
FABRICACIÓN DE EXTRACTOS FLUIDOS Y SECOS



Té Verde

DATOS GENERALES

Nombre científico: Camellia sinensis L.1,2,3
Familia: Teaceas2,3
Te verde, Arbol o arbusto, que alcanza hasta 10 m de altura y cultivado 1 –2 m. las hojas perenes, de color verde oscuro. Las flores son grandes, blancas y olorosas.2,3
Su origen, Originario del sudeste de Asia, China y la India, donde todavía crece espontáneamente. Se cultiva ampliamente en estos países, además de Brasil y en las regiones tropicales de África. 2,3
Parte utilizada, Las hojas.1,2,3
Principales constituyentes: El té verde contiene polifenoles y compuestos aromáticos bases xánticas (3 – 4%): mayoritariamente cafeína (teína) de acuerdo a la farmacopea Francesa no menos de 2.0% calculados referente al fármaco desecado. Contiene catequinas; teaflavinas; del 8 – 25% de taninos catéticos (libres y combinados a bases xánticas); flavonoides (kempferol, quercetina, miricetina); ácidos cafeilquinicos; antocianidinas y saponinas (assamsaponinas, tesaponina).1,2
Acción Farmacológica: La cafeína es un estimulante del sistema nervioso central, uniéndose a los receptores cerebrales adenosinicos. Aumentando el estado de vigilia y tiene un efecto erogenico (aumenta la capacidad de realizar esfuerzo físico). Produce estimulación cardíaca (efecto inotropo positivo) vasodilatación periférica y vasoconstricción a nivel craneal, por lo que se ha sugerido su empleo como antimigrañoso. Estimula la musculatura esquelética y el centro de la respiración. Además, aumenta la secreción ácida gástrica y la diuresis.1

Las catequinas poseen propiedades antioxidantes y se ha propuesto su posible acción quimiopreventiva en diferentes patologías cancerígenas.1
Los polifenoles, inhiben la actividad enzimática carcinogénica, inhiben carcinogenesis inducida por nitroguanidina, además de presentar una acción antioxidante.3
Las teaflavinas han mostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria e inmunomoduladora.1
Indicaciones: Astenia psico-física, diarrea, en la disentería presenta una actividad bactericida para varios tipos de bacteria patógenas, además de inactiva la toxina de cólera. Coadyuvante en el tratamiento preventivo de cáncer.1,3
Contraindicaciones: Contraindicado en alergias a cafeína o a otras xántinas, así como a pacientes con alteraciones cardiovasculares, úlcera gastroduodenal, epilepsia, insomnio, embarazo, lactancia y niños menores de 12 años. 1,2
Efectos Secundarios: Los efectos adversos de la cafeína son, en general leves y transitorios, aunque frecuentes. Puede producir estreñimiento, acidez de estómago, insomnio y nerviosismo.1,2
Posología:
Bibliografía

1.- Vanaclocha, B. Y Carigüeral, S. Fitoterapia Vademecum de Prescripción 4ª Edición. Ed. Masson, España. 2003	2.- Plantas que Curan. Enciclopedia de las Plantas Medicinales. Ed. Planeta DeAgostini. España. 1997	3.- Herbal Drug and Phytopharmaceuticals A Handbook for Practice on a Scientific Basis, Third Edition Ed. Max Wichtl
--	--	--

PARÁMETROS DE CONTROL DE CALIDAD (REDSA) PRESENTACIÓN EXTRACTO FLUIDO

Propiedades Organolépticas

Apariencia	Líquida
Color	Ambas oscuro
Olor	Herbáceo característico

Propiedades Físicoquímicas

Densidad relativa	= 1.0595
Densidad del alcohol	0 – 10° G.L.
pH relativo	= 5.59

Total de valoración:

Cafeína	2.2%/ml	Mínimo 2.0% pH: 5.5
---------	---------	---------------------

Pruebas de disolución (50% v/v)

Eanol	Miscible
Alcohol etílico 70%	Miscible
Agua desmineralizada	Miscible

Informe microbiológico

Determinación	Límite (UFC/ml)	Método utilizado
Mesofílicos aerobios	105	NOM-092-SSA1-1994
Hongos y levadura	103	NOM-111-SSA1-1994
Escherichia coli	10	NOM-113-SSA1-1994
Salmonella sp.	Ninguna	NOM-114-SSA1-1994

Disolvente de extracción: Mezcla hidroalcohólica.