

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

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE MIEL DE ABEJA Y CAPE
SOBRE LA VIDA ÚTIL DE SALCHICHAS DE CERDO SIN
COCINAR Y COCINADAS

POR:

NOHEMÍ SOTO REYES

TESIS APROBADA POR LA
**COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE
ORIGEN ANIMAL**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS

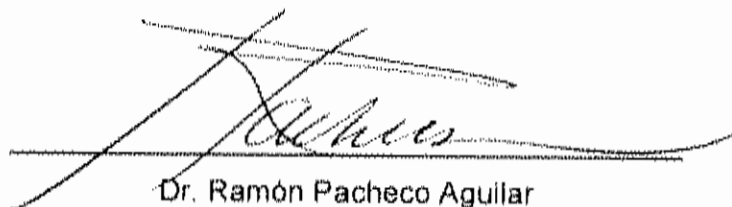
HERMOSILLO, SONORA

NOVIEMBRE DE 2007

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la producción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD).

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

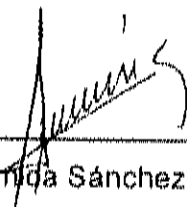
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Pacheco', is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

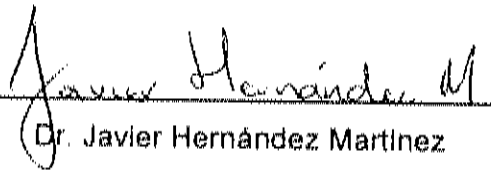
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Ing. en Alimentos Nohemi Soto Reyes, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



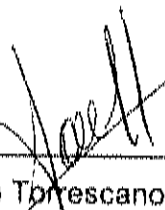
Dra. Armida Sánchez Escalante

Directora de tesis



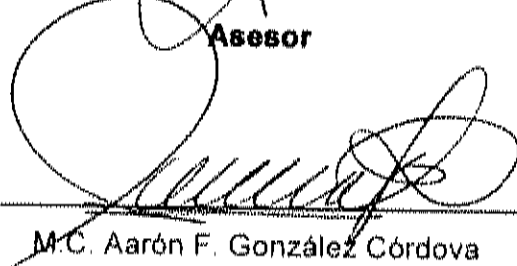
Dr. Javier Hernández Martínez

Asesor



Dr. Gastón Torrescano Urrutia

Asesor



M.C. Aarón F. González Córdova

Asesor

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por darme la oportunidad de realizar mi Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme el apoyo económico para mi manutención y para la realización de mis estudios de Posgrado.

A mi Directora de tesis, Dra. Armida Sánchez Escalante, por haberme apoyado tanto en lo académico como en cuestiones personales. Gracias por sus consejos y conocimientos que compartió conmigo a lo largo de 2 años.

A mis Asesores de tesis, Dr. Javier Hernández Martínez, Dr. Gastón R. Torrescano Urrutia y M.C. Aarón F. González Córdova, por su apoyo en la realización de este trabajo de investigación.

A la Q.B. Karla G. Martínez por la asesoría y entrenamiento en los diferentes análisis en HPLC de mi trabajo experimental. Gracias por todo su apoyo y amistad.

Al Laboratorio de Biopolímeros, por permitirme usar sus instalaciones para realizar una buena parte de este trabajo.

Al Laboratorio de Lácteos, por darme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones, donde se realizó la parte microbiológica de esta investigación.

Al Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos por facilitarme el espectrofotómetro CARY 50 Bio, especialmente al Dr. Rogerio Sotelo y la M.C. Karina García.

A todo el Equipo del Laboratorio de Investigación en Productos Cárnicos: Libertad Zamorano, Martín Valenzuela, Georgina Hernández, Germán Cumplido y Humberto González, por brindarme su ayuda técnica cuando lo necesité.

A Lucía Pérez, quien estuvo conmigo apoyándome en la etapa más pesada del experimental. Sin su ayuda habrían sido muy pesados los días de muestreo.

A mis amigos de la maestría, Tere, Cipa, Margarito, Iván, Cecy, Alfonso, Luis Enrique M., Isabel y Luis Enrique G. quienes hicieron que me sintiera en familia.

A mi esposo Olmo quien siempre estuvo y está en los momentos más difíciles y en los más felices de mi vida.

DEDICATORIA

A Dios quien me dio paciencia, entendimiento, una familia hermosa, un buen esposo y grandes amigos.

A mis padres, Nohemi y Alberto, quienes me dieron la vida y me han apoyado en todo lo que he hecho hasta el momento. Los amo y siempre están en mi corazón y pensamiento a pesar de la distancia.

A mis hermanas quienes con su risa y entusiasmo me han acompañado y ayudado en toda mi vida.

A Olmo, con todo mi amor, quien con su cariño, paciencia y comprensión me ayudó en la realización de esta tesis y me dio ánimos para seguir adelante y no flaquear en los momentos más difíciles.

A mis amigas Tere, Cipa y Cecy quienes me animaron en los momentos difíciles que se me presentaron durante la realización de esta investigación.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES	5
Oxidación de Lípidos	5
Antioxidantes Naturales	7
Crecimiento Microbiano	8
Miel de Abeja	10
Éster Fenillico del Ácido Cafeico (CAPE).....	13
Miel y CAPE en Productos Cárnicos.....	16
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Caracterización de la Miel de Abeja.....	23
Contenido de Humedad	23
Análisis de Polen.....	23

Extracción de Compuestos Fenólicos Totales de la Miel de Abeja	23
Análisis por HPLC de los Compuestos Fenólicos	24
Síntesis del CAPE.....	25
Elaboración de Salchichas sin Cocinar y Cocinadas	27
Análisis de las Salchichas.....	28
Contenido de Grasa	28
Contenido de Humedad	29
pH.....	29
Color.....	29
Porcentaje de Metamioglobina	29
Cuantificación de las Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	30
Evaluación de la Calidad Microbiológica	31
Contenido de CAPE	32
Diseño Experimental.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
Caracterización de la Miel.....	34
Contenido de Humedad	34
Análisis del Polen	34
Extracción e Identificación de los Compuestos Fenólicos de la Miel.....	36
Estandarización de la Formulación de las Salchichas	44
Metodología para la Extracción del CAPE en la Carne.....	46

Evaluación de la Capacidad Antioxidante de la Miel y del CAPE en las Salchichas de Cerdo	47
Salchichas Cocinadas	51
Salchichas sin Cocinar	57
Evaluación de la Capacidad Antimicrobiana de la Miel y del CAPE en las Salchichas de Cerdo para Desayuno.....	68
Salchichas Cocinadas	68
Salchichas sin Cocinar	72
Cuantificación del CAPE en las Salchichas de Cerdo	76
CONCLUSIONES.....	82
REFERENCIAS	83
ANEXO	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones del mecanismo de autoxidación de los lípidos.	6
Figura 2. Estructuras químicas de ácidos fenólicos y del CAPE.	15
Figura 3. Esquema de la reacción de la síntesis del CAPE.	26
Figura 4. Cromatogramas de la mezcla de estándares leídos a 340 nm y 290 nm.	38
Figura 5. Cromatogramas del primer extracto etéreo obtenidos a 290 nm y 340 nm.	40
Figura 6. Cromatogramas del segundo extracto etéreo obtenidos a 340 nm y 290 nm.	41
Figura 7. Curva de calibración para la cuantificación del CAPE.	48
Figura 8. Cromatogramas del estándar CAPE a una concentración de 100 ppm y de carne con 100 ppm de CAPE obtenidos a 340nm.	49
Figura 9. Cromatogramas de estándares de ácido caféico y del CAPE obtenidos a 340 nm.	50
Figura 10. Valores de pH para las salchichas de cerdo cocinadas, durante el tiempo de almacenamiento.	52
Figura 11. Valores de TBARS para las salchichas de cerdo cocinadas, durante el tiempo de almacenamiento.	54
Figura 12. Valores de pH para las salchichas de cerdo sin cocinar, durante el tiempo de almacenamiento.	58

Figura 13. Valores de TBARS para las salchichas de cerdo sin cocinar, durante el tiempo de almacenamiento.	60
Figura 14. Valores de L* para las salchichas de cerdo sin cocinar.	62
Figura 15. Valores de b* para las salchichas de cerdo sin cocinar.	63
Figura 16. Valores de a* para las salchichas de cerdo sin cocinar.	64
Figura 17. Porcentajes de metamioglobina para las salchichas de cerdo sin cocinar.	67
Figura 18. Cuenta total de mesófilos aerobios en las salchichas de cerdo cocinadas.	69
Figura 19. Cuenta total de psicrótrofos aerobios en las salchichas de cerdo cocinadas.	71
Figura 20. Cuenta total de mesófilos aerobios en las salchichas de cerdo sin cocinar.	73
Figura 21. Cuenta total de psicrótrofos aerobios en las salchichas de cerdo sin cocinar.	74
Figura 22. Cromatogramas de la cuantificación de CAPE en salchichas sin cocinar con 100 ppm (340 nm).	79
Figura 23. Cromatogramas de la cuantificación de CAPE en salchichas de cerdo cocinadas con 100 ppm (340 nm).	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios realizados con miel de abeja adicionada a productos cárnicos para evaluar su actividad antioxidante.	17
Tabla 2. Clasificación y parámetros de crecimiento óptimos de microorganismos patógenos y deteriorativos de alimentos.	19
Tabla 3. Variedades y porcentajes de los granos de polen encontrados en la miel utilizada en el presente estudio.	35
Tabla 4. Estándares y tiempos de retención utilizados para la identificación de los compuestos fenólicos en la miel.	37
Tabla 5. Cuantificación de los 10 compuestos fenólicos identificados en la miel ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ de miel).	42
Tabla 6. Porcentajes de humedad y grasa del recorte 80/20 y de la grasa firme.	45
Tabla 7. Porcentajes de humedad y grasa de las salchichas de cerdo sin cocinar.	45
Tabla 8. Valores de la pérdida por cocción de las salchichas de cerdo	53
Tabla 9. Cuantificación de CAPE en salchichas de cerdo sin cocinar y cocinadas durante su almacenamiento.	77

RESUMEN

La vida útil de los productos cárnicos frescos se ve limitada principalmente por el crecimiento microbiano y pérdida de color; mientras que para los productos cocinados el principal factor limitante es la oxidación de los lípidos. Para prevenir estos cambios indeseables se emplean compuestos antimicrobianos y antioxidantes, ya sean sintéticos o naturales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de miel de abeja (5% y 10%, p/p) y diferentes concentraciones del éster fenílico del ácido cafeico (CAPE) (100 ppm y 200 ppm) sobre la vida útil de salchichas de cerdo sin cocinar y cocinadas durante su almacenamiento en refrigeración, mediante el análisis de su capacidad antioxidante y antimicrobiana. Se midieron parámetros de calidad como: oxidación de lípidos (TBARS), inhibición del crecimiento microbiano y pH durante su almacenamiento en refrigeración. Además, en las salchichas sin cocinar se determinaron el porcentaje de metamioglobina y color, mediante los parámetros L^* , a^* , b^* . En las salchichas con CAPE se cuantificó el contenido de CAPE durante su almacenamiento. La miel utilizada en este trabajo experimental fue caracterizada, se identificó su origen botánico y se identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos en ésta. Así, la miel utilizada fue miel monofloral de mezquite y se pudieron identificar 10 compuestos de tipo fenólico: el ácido cafeico, CAPE y ocho flavonoides (rnicentina, luteolina, kaempferol, apigenina, pinocembrina, crisina, galangina y acacentina). Con respecto a la actividad antioxidante de la miel tanto en producto cocinado como sin cocinar, se observó que retarda la oxidación de lípidos con un efecto similar al BHT, pero menor al CAPE. El CAPE inhibe la oxidación de lípidos en las salchichas sin cocinar mientras que en las cocinadas la retarda; sin embargo, el CAPE no tiene un efecto protector marcado sobre el color rojo de las salchichas sin cocinar, siendo la miel (10%) más efectiva en conservar el color rojo por más tiempo. Los resultados microbiológicos de las salchichas sin cocinar mostraron que la miel tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de psicrótrofos aerobios, mientras que el CAPE no lo tiene.

marcado sobre el color rojo de las salchichas sin cocinar, siendo la miel (10%) más efectiva en conservar el color rojo por más tiempo. Los resultados microbiológicos de las salchichas sin cocinar mostraron que la miel tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de psicrótrofos aerobios, mientras que el CAPE no lo tiene. En general, los resultados mostraron que el factor que limita la vida de anaquel de las salchichas de cerdo sin cocinar con CAPE es el color, teniendo una vida de anaquel de 8 días. Por otro lado, la vida de anaquel de las salchichas con miel se ve limitada por la oxidación de lípidos, teniendo una vida de anaquel de 4-8 días, al igual que las salchichas con BHT, aun cuando el color se mantiene. En cuanto a las salchichas control sin cocinar, el factor limitante fue la oxidación de lípidos, teniendo una vida de anaquel máxima de 4 días. Con respecto al efecto antimicrobiano de la miel en las salchichas cocinadas, se observó que retrasa el crecimiento de mesófilos aerobios, además el 10% de miel inhibió el crecimiento de psicrótrofos aerobios, mientras que 5% de miel lo retrasó. El CAPE no afectó el crecimiento de mesófilos ni de psicrótrofos aerobios, Y respecto a los resultados de la cuantificación del CAPE en carne, estos mostraron que no se lograron establecer diferencias cuantitativas entre los días de almacenamiento, esto debido a la alta variabilidad y a la baja recuperación que se obtuvo del CAPE. Sin embargo, se logró identificar la presencia del CAPE en las salchichas sin cocinar y cocinadas a lo largo del almacenamiento. De acuerdo a los resultados de esta investigación el CAPE es una buena alternativa para su uso como antioxidante natural por su capacidad para retardar o inhibir la oxidación de lípidos, y sustituir el uso de antioxidantes sintéticos en un producto cárnico con alto contenido de grasa, La miel es un antimicrobiano natural, mientras que su capacidad antioxidante dependerá de su composición,

INTRODUCCIÓN

La apariencia de los alimentos es una de las características más importantes para atraer al consumidor, y por lo tanto para la venta del producto. La oxidación de lípidos y la contaminación bacteriana son los factores más importantes que determinan la pérdida de calidad de los alimentos y la reducción de su vida de anaquel. Por ello, la reducción de la oxidación de lípidos y la inhibición del crecimiento microbiano, son muy importantes para preservar la calidad de los alimentos y prolongar su vida de anaquel. El crecimiento de microorganismos en productos cárnicos puede causar el deterioro de estos y problemas de salud al consumidor. El proceso de oxidación en la carne conlleva a la degradación de lípidos y proteínas, lo que contribuye al deterioro del sabor, textura y color de los productos cárnicos (Fernández-López *et al.*, 2005). En la industria cárnica se usan aditivos sintéticos para mantener la calidad del producto y de esta forma satisfacer las exigencias del consumidor.

En la industria cárnica se emplean antioxidantes sintéticos como el t-butilhidroxitolueno (BHT), t-butilhidroxianisol (BHA), t-butilhidroxiquinona (TBHQ) y galato de propilo (PG) (Antony *et al.*, 2000), y se conoce que estos antioxidantes inhiben reacciones catalíticas en cadena, las cuales inician y propagan la peroxidación de lípidos. No obstante, se ha encontrado que el BHT, al ser usado en alimentos induce carcinogénesis, causando daño pulmonar en ratones, necrosis del hígado y hemorragia mortal en ratas, mientras que el BHA induce neoplasia del estómago en ratas (Milić *et al.*, 1998). Por esta razón, existe la preocupación por la presencia de residuos químicos en alimentos, por lo que la demanda de conservadores naturales no tóxicos ha aumentado (Nagai *et al.*, 2006).

Una de las ventajas al emplear conservadores naturales en los alimentos es su fácil aceptación por el consumidor, al considerarlos seguros y no "químicos". Además, aunque no están regulados legalmente, se les considera como compuestos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) (Pokorný, 1991). Sin embargo, es necesario realizar trabajos de investigación para determinar las condiciones óptimas de funcionamiento del conservador natural como antioxidante, antimicrobiano o ambos.

La miel de abeja se ha utilizado en productos cárnicos para mejorar el sabor, aumentar el rendimiento de cocción y para retrasar la oxidación de los lípidos. El efecto que tiene la miel sobre la oxidación de los lípidos ha sido estudiado principalmente en carne molida de pavo (Antony *et al.*, 2000; Antony *et al.*, 2002; McKibben y Engeseth, 2002), mientras que en carne de cerdo no ha sido estudiado. La actividad antioxidante del éster fenilico del ácido cafeico (CAPE) ha sido probada en sistemas modelo (Chen y Ho, 1997; Son y Lewis, 2002), sin embargo no ha sido estudiada en un producto cárnico. Y, para ambos antioxidantes, tampoco se ha establecido su actividad antimicrobiana en carne de cerdo.

En este trabajo de investigación se propone estudiar el efecto antioxidante y antimicrobiano de la miel de abeja y del CAPE, aplicados en salchichas de cerdo (sin cocinar y cocinadas), conocidas como "salchichas para desayuno", durante su almacenamiento en refrigeración.

ANTECEDENTES

Oxidación de Lípidos

La oxidación de lípidos en productos cárnicos sin cocinar se lleva a cabo principalmente mediante el mecanismo de autooxidación, el cual está bien establecido (Figura 1), así como sus efectos en el sabor y color. Después de la cocción, la oxidación lipídica es considerada como un sinónimo del olor y sabor a rancio (rancidez oxidativa) e involucra varios promotores. Esto se debe a la liberación de hierro hemo, no-hemo y de fosfolípidos de las membranas celulares dañadas durante la cocción (Grün *et al.*, 2006).

Investigadores anteriores han postulado que existe una interrelación entre la oxidación de lípidos y los pigmentos de la carne y los productos cárnicos. El oxígeno (O_2) puede iniciar la peroxidación de lípidos permitiendo la formación de sustancias pro-oxidantes capaces de reaccionar con la oximioglobina (OMb), resultando en la formación de metamioglobina (MMb). Sin embargo, la OMb no solo puede ser oxidada por radicales lipídicos sino también por otros radicales pro-oxidantes generados por el O_2 . Por lo tanto, la susceptibilidad de la mioglobina a la autooxidación es el principal factor que explica la estabilidad del color en la carne y productos cárnicos (Fernández-López *et al.*, 2005). Así para prevenir los cambios que provoca la oxidación de lípidos (color, olor, sabor y valor nutricional) se emplean antioxidantes, los cuales se definen como moléculas orgánicas, de origen sintético o natural, capaces de evitar o retardar el desarrollo o progreso del deterioro oxidativo a bajas concentraciones (Valenzuela y Nieto, 1996).

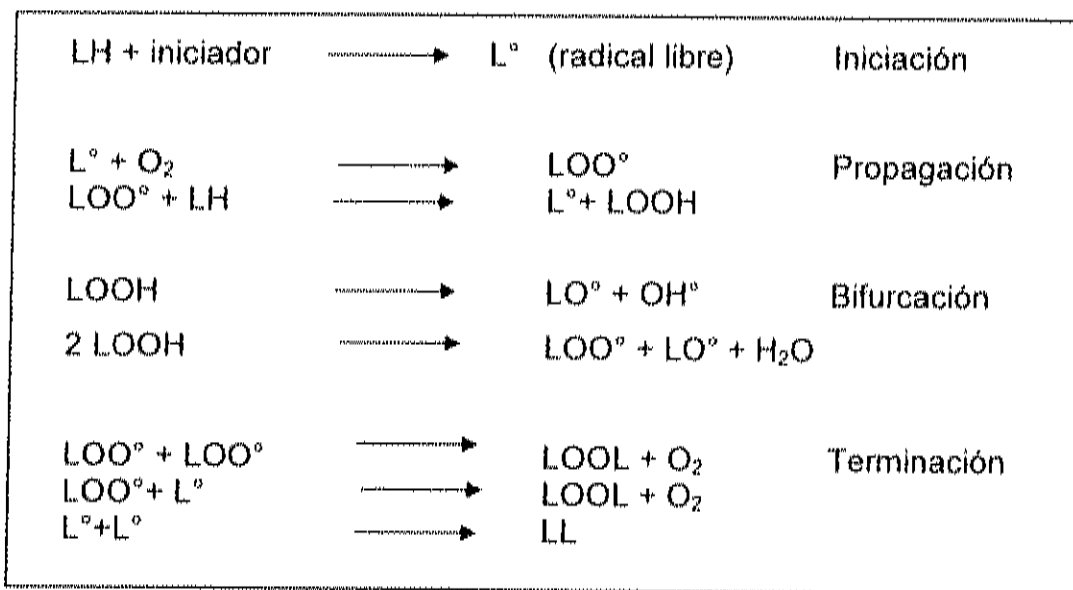


Figura 1. Reacciones del mecanismo de autoxidación de los lípidos (Monahan, 2000).

Antioxidantes Naturales

Los antioxidantes naturales pueden ser compuestos fenólicos (tocoferoles, carotenos, flavonoides y ácidos fenólicos, entre otros), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos, y aminas), así como ácido ascórbico (Al-Mamary *et al.*, 2002). La estructura química de los antioxidantes naturales está relacionada con la estructura de los antioxidantes sintéticos; la mayoría son derivados del pirocatecol o pirogalol, dihidrocromanoles o flavonoides (Pokorný, 1991). Se les considera aditivos porque se añaden al alimento intencionalmente, sin el propósito de cambiar su valor nutritivo, pero con la finalidad de favorecer su conservación (Valenzuela y Nieto, 1996).

Un antioxidante puede actuar de distintas formas: compitiendo por la unión al oxígeno, retardando la iniciación o bloqueando la propagación de la oxidación, inhibiendo catalizadores o estabilizando hidroperóxidos (Valenzuela y Nieto, 1996). Un antioxidante natural debe ser efectivo a bajas concentraciones, ser compatible química y físicamente con el alimento, y no debe influir sensorialmente, ni ser tóxico (Milić *et al.*, 1998). En los productos cárnicos, el romero y sus extractos son probablemente los antioxidantes naturales más estudiados, pero se ha investigado sobre muchos otros. Estos incluyen el aloe vera, fenogreco, ginseng, mostaza, salvia, rábano, orégano, hisopo, mejorana, albahaca, tomillo, jengibre, alcaravea, clavo, menta y nuez moscada. También se han analizado con este fin el curry, canela, miel de abeja, catequinas del té, vitamina C, naranja, limón, pimienta negra, té verde, café, cáscara y semilla de uva, y extractos de la corteza del pino (Grün *et al.*, 2006).

Sebranek *et al.* (2005) compararon el efecto antioxidante de diferentes concentraciones de un extracto de romero (1500 y 2500 ppm) en salchichas de

cerdo congeladas y congeladas precocinadas y en salchichas de cerdo sin cocinar refrigeradas (500 a 3000 ppm) contra la mezcla de BHA/BHT (200 ppm). Los resultados de ese estudio mostraron que las salchichas refrigeradas con 2500 ppm de romero presentaron un efecto antioxidante similar al del BHA/BHT. Lo mismo sucedió en las salchichas de cerdo precocinadas congeladas. Sin embargo, se encontró que al extracto de romero fue más efectivo que el BHA/BHT como antioxidante de lípidos y de pigmentos en las salchichas sin cocinar refrigeradas. Este estudio muestra claramente, no solo la efectividad antioxidante del extracto de romero sino que también la importancia del procesamiento y de los métodos de almacenamiento sobre la efectividad de los antioxidantes.

Otro estudio en el que se evaluó la actividad antioxidante de diferentes extractos de plantas fue el realizado por Mc Carthy *et al.* (2001), quienes compararon la actividad antioxidante de aloe vera, fenogreco, ginseng, mostaza, romero, salvia, proteína de soya, catequinas de té, proteínas del suero de leche, vitamina E, y BHA/BHT en hamburguesas de puerco cocinadas y sin cocinar. Y encontraron que los cinco mejores antioxidantes fueron el romero, catequinas de té, vitamina E y BHA/BHT, además de que la eficiencia de los antioxidantes varió a lo largo del tiempo de almacenamiento. Los resultados de este trabajo al igual que del anterior mostraron que el procesamiento afecta la actividad antioxidante además del almacenamiento.

Crecimiento Microbiano

Además de la oxidación de lípidos hay otros factores que determinan la vida útil de un producto cárnico, uno de estos es el crecimiento microbiano. El deterioro que se detecta organolépticamente es usualmente atribuido a

descomposición y putrefacción inducida por los microorganismos, por lo que no hay duda de que ese producto no es apto para consumo humano. Algunos cambios fisicoquímicos que se presentan en el deterioro de la carne y en productos cárnicos son producidos por microorganismos deteriorativos durante su almacenamiento. Estos microorganismos pueden ser aerobios o anaerobios, dependiendo de esto causarán determinados cambios fisicoquímicos en la carne. Dentro de los microorganismos aerobios que causan cambios fisicoquímicos en la carne tenemos a *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, entre otros; mientras que los microorganismos anaerobios comprenden a bacterias lácticas, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Clostridium*, principalmente (Pascual y Calderón, 2000).

Para evitar el deterioro causado por microorganismos en la carne y productos cárnicos se emplean diferentes métodos de preservación. El efecto conservador de cada método radica en eliminar, restringir y/o inhibir la actividad microbiana, impidiendo las reacciones enzimáticas, químicas y físicas que darían lugar a cambios organolépticos y a la alteración total del alimento. Esta restricción de la actividad microbiana se consigue modificando las variables intrínsecas del alimento (pH, temperatura, humedad, etc.) (Gallego, 2005).

La seguridad microbiana y la vida de anaquel de los alimentos aumenta al minimizar el nivel inicial de microorganismos, destruir la población microbiana y prevenir o controlar el nivel de crecimiento microbiano (Serdengecti *et al.*, 2006). Actualmente, para mejorar la calidad microbiológica de los productos cárnicos se utilizan las sales de ácidos orgánicos como el lactato de sodio o lactato de potasio y diacetato de sodio como tratamiento posterior al sacrificio (Serdengecti *et al.*, 2006). Al igual que con los antioxidantes naturales, actualmente se realizan estudios para encontrar compuestos naturales con

actividad antimicrobiana. Por ejemplo, Fernández-López *et al.* (2005) evaluaron la actividad antibacteriana de extractos de romero, ajo, naranja y limón en albóndigas de res cocinadas, ellos encontraron que los extractos de limón, naranja y ajo solo fueron efectivos contra una, dos y tres especies de bacterias, respectivamente. Mientras que el romero tuvo efecto antibacteriano contra todas las especies bacterianas probadas (*Listeria* spp, *Brochothrix* spp y bacterias ácido lácticas). En este trabajo de investigación se probó la efectividad de la miel de abeja y del CAPE como antimicrobianos en un producto cárnico de alto contenido en grasa.

Miel de Abeja

La miel es una sustancia natural producida por las abejas, *Apis mellifera*, a partir del néctar y secreciones de las plantas. Después de ser recolectadas estas secreciones, son combinadas con sustancias específicas propias de las abejas, quienes posteriormente depositan la mezcla en la colmena donde se almacena, deshidrata y madura (Burboa, 2004), formándose un semilíquido muy complejo que contiene al menos 181 sustancias distintas.

La composición típica de la miel es: humedad, 17.7%; azúcares totales, 76.4%; cenizas, 0.18%; y ácidos totales (como el ácido fórmico), 0.08% (Nagai *et al.*, 2006). Tiene un rango de pH de 3.42 a 6.10 y un contenido de proteína (total) de 168.6 mg/ 100 g de miel (NBH, 2003).

La miel de abeja, usada tradicionalmente como agente edulcorante, también puede actuar como un conservador de alimentos debido a su actividad antioxidante y antibacteriana (Nagai *et al.*, 2001). Weston *et al.* (1999)

mencionaron que la actividad antibacteriana se debe parcialmente al peróxido de hidrógeno, el cual es formado por la enzima glucosa oxidasa durante la maduración de la miel, enzima que proviene de las glándulas de las abejas. Sin embargo, esta enzima es susceptible a ser dañada por el calor y la luz, aún con 10 min de exposición de la miel a la luz hay una disminución de la generación de peróxido de hidrógeno (Mundo *et al.*, 2004). Si la enzima es destruida, las mieles conservan actividad antibacteriana residual debido a la presencia de otras sustancias no-peróxido. Parte de esta actividad parece deberse a la pinocembrina y posiblemente a otros compuestos fenólicos (ácidos aromáticos y flavonoides) con actividad antibacteriana (D'Arcy, 2005; Weston *et al.*, 1999). También la baja actividad de agua de la miel y su pH ácido contribuyen a la actividad antibacteriana de ésta (NBH, 2003). De acuerdo a Nagai *et al.* (2001), la miel de abeja contiene sustancias que actúan como conservadores; éstas incluyen al α -tocoferol, ácido ascórbico, flavonoides y otros compuestos fenólicos y enzimas como glucosa oxidasa, catalasa, y peroxidasa.

Con respecto a la actividad antioxidante de la miel, ciertos componentes pueden interaccionar en forma sinérgica aportando capacidad antioxidante (Nagai *et al.*, 2001; Gheldof *et al.*, 2002; Gheldof y Engeseth, 2002; Wang *et al.*, 2004; Johnston *et al.*, 2005). Los sinérgicos más importantes son ácidos orgánicos polisustituidos, aminoácidos, fosfolípidos y productos de la reacción de Maillard (PRM), los cuales pueden quelar metales pesados (Pokorný, 1991).

La composición particular de una muestra de miel, y por lo tanto su actividad antioxidante y antimicrobiana, dependen de la fuente floral de la cual proviene (Al-Mamary, *et al.*, 2002; Gheldof *et al.*, 2002; Mato *et al.*, 2003). Sus componentes también varían de acuerdo a la época del año, factores ambientales y al procesamiento (Gheldof *et al.*, 2002). La capacidad antioxidante de la miel puede disminuir después de ser procesada y

almacenada; sin embargo, los niveles de compuestos antioxidantes son aún suficientes para proteger contra la oxidación de lípidos en sistemas alimenticios (Wang *et al.*, 2004).

Turkmen *et al.* (2006) estudiaron el tratamiento térmico de la miel y encontraron que el incremento de la temperatura favorece la actividad antioxidante y la formación de pigmentos oscuros. Gheldof *et al.* (2002) encontraron que los tratamientos térmicos ligeros y/o almacenamiento prolongado de la miel ocasionan un cambio de composición atribuyéndoselo a la caramelización de los carbohidratos, reacción de Maillard, y descomposición de la fructosa. Estas reacciones pueden formar hidroximetilfuraldehído (HMF) y otros productos de la reacción de Maillard como pirroles, furanos y tiofenos, los cuales inhiben la oxidación (Turkmen *et al.*, 2006).

La miel se somete al tratamiento térmico por dos razones diferentes: (1) para modificar su tendencia a la cristalización o retardar su aparición y (2) para destruir microorganismos que la contaminan (Turkmen *et al.*, 2006).

Los ácidos fenólicos y flavonoides, aunque se encuentran en pequeñas concentraciones, contribuyen significativamente a la actividad antioxidante de la miel (Mato *et al.*, 2003). Entre los flavonoides que contiene se encuentran la apigenina, pinocembrina, kaempferol, quercetina, pinobanksina, galangina, crisina, hesperetina y ácidos fenólicos como elágico, cafeico, p-cumárico y ferúlico (Turkmen *et al.*, 2006). Los flavonoides tienen un rango amplio de efectos biológicos, incluyendo, antibacteriano, antiinflamatorio, antialérgico y acciones vasodilatadoras (Al- Mamary *et al.*, 2002). La acción antioxidante de los compuestos fenólicos puede estar relacionada con su capacidad para reducir o quelar el ion hierro, el cual cataliza la peroxidación de lípidos (Al- Mamary *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar de la propiedad de los polifenoles de quelar

metales, existen resultados ambiguos con respecto a su actividad antioxidante ya que pueden actuar como pro-oxidantes (Andjelković *et al.*, 2006).

Éster Fenilico del Ácido Cafeico (CAPE)

El ácido caféico y sus análogos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y es posible localizarlos en granos de café, aceitunas, propóleos, frutas y vegetales (Son y Lewis, 2002). Tienen actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antiateroesclerótica, antioxidativa, antiproliferativa, inmunoestimuladora y neuroprotectora. Son considerados antioxidantes naturales potenciales, con múltiples mecanismos que involucran secuestro de radicales libres, quelación de iones metálicos, y acciones inhibitorias sobre enzimas específicas que inducen la formación de radicales libres e hidropéroxidos lipídicos. Por lo tanto, pueden prevenir la rancidez oxidativa en alimentos y los posibles daños oxidativos *in vivo*, estos últimos relacionados con enfermedades como el cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, Alzheimer y Parkinson (Son y Lewis, 2002).

Milić *et al.* (1998) estudiaron la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos (gálico, caféico, clorogénico, vainillico y salicílico) en un sistema modelo de peroxidación lipídica. La actividad antioxidante en orden descendente de los compuestos en este estudio fue: gálico > caféico > clorogénico > vainillico > salicílico. El ácido gálico es un compuesto con tres grupos hidroxilo, el caféico con dos y el vainillico y salicílico con uno (Figura 2). Por lo tanto, la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos y sus derivados dependen del número y posición de los grupos hidroxilo unidos al anillo aromático; sin embargo, los ácidos *orto*-dihidroxilo presentan la mayor actividad antioxidante (Andjelković *et al.*, 2006). Los ésteres del ácido caféico son los

antioxidantes fenólicos más importantes provenientes de plantas, ya que tienen una alta actividad antioxidante en los niveles presentes en su fuente natural (Pokorný, 1991).

El CAPE es un compuesto activo de los propóleos y un derivado de plantas (Figura 2). Tiene actividad antiviral, antibacteriana, antiinflamatoria, antiateroesclerótica, antioxidante, inmunoestimulante e inhibe el crecimiento de tumores (Son *et al.*, 2001). Se han realizado estudios comparando la actividad antioxidante del CAPE y la del ácido caféico en una emulsión oxidada de ácido linoleico, encontrándose que el primero es mejor antioxidante (Son y Lewis, 2002).

Además de encontrarse en las plantas y los propóleos, el CAPE puede ser sintetizado a partir del ácido caféico mediante una esterificación catalítica ácida o básica (Son *et al.*, 2001). Nakanishi *et al.* (1991) sintetizaron CAPE haciendo reaccionar ácido caféico con alcohol fenillico utilizando como catalizador al ácido p-toluen-sulfónico (esterificación catalítica ácida) y como solvente, benceno o tolueno. Esta reacción tuvo un rendimiento del 40% utilizando una relación molar 1:15 (ácido caféico: alcohol fenillico). Así, el CAPE sintetizado es un polvo amarillo pálido con un punto de ebullición entre 124.5-126°C (Son *et al.*, 2001).

Por todo lo anterior la miel de abeja y el CAPE pueden ser empleados en productos cárnicos con el fin de inhibir la oxidación de lípidos en productos cárnicos crudos y cocinados, retardar el cambio de coloración en productos crudos e inhibir el crecimiento microbiano.

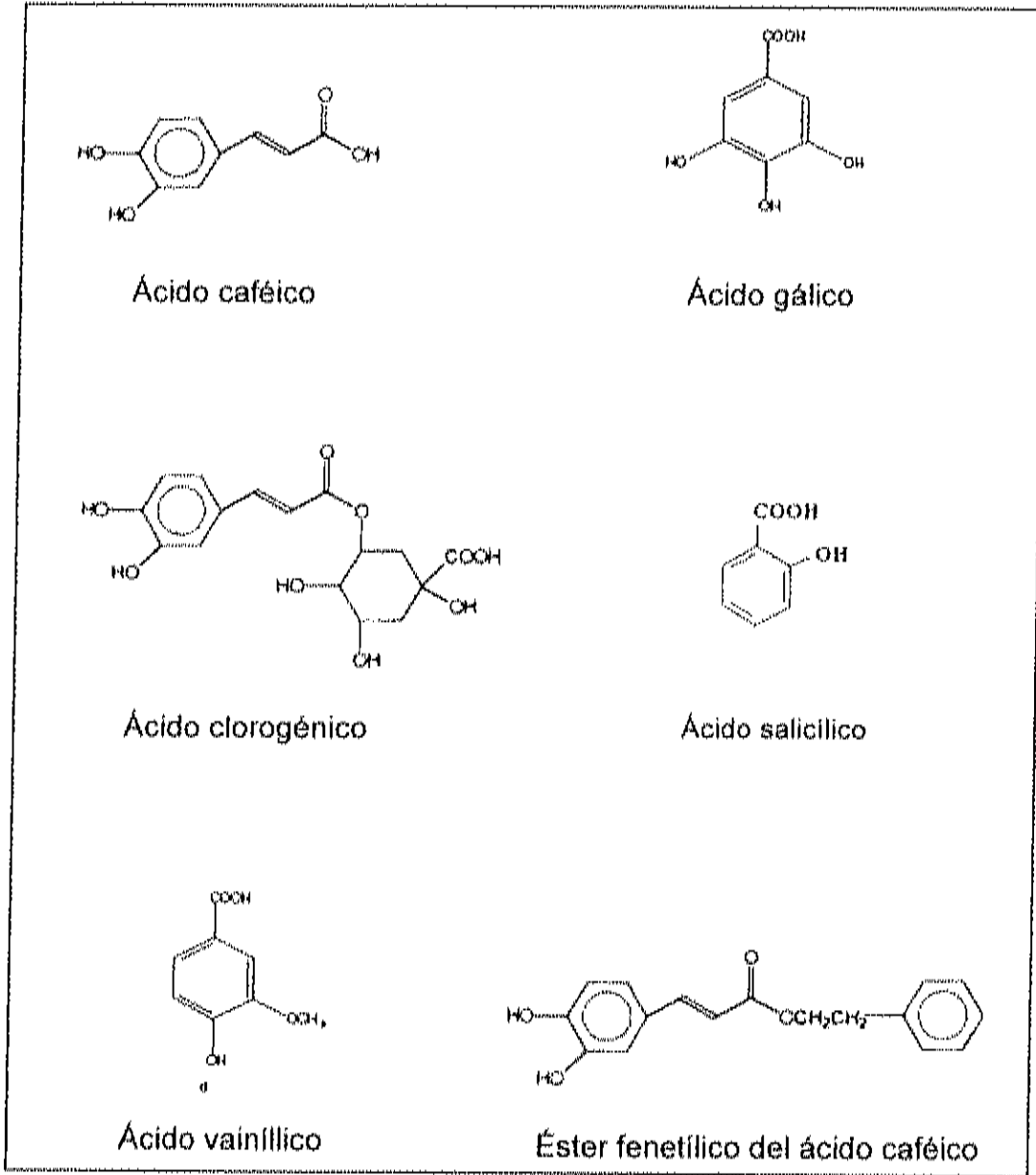


Figura 2. Estructuras químicas de ácidos fenólicos y del CAPE (Milić *et al.*, 1998).

Miel y CAPE en Productos Cárnicos

Algunos productos cárnicos procesados son particularmente susceptibles a la rancidez oxidativa debido a su exposición al oxígeno y/o temperaturas elevadas durante su procesamiento. Dentro de éstos se encuentran las salchichas frescas (no curadas), productos cocidos (no curados) y salchichas secas (Sebranek *et al.*, 2005). Toda la carne procesada utiliza antioxidantes para controlar los cambios oxidativos. El uso más común de los antioxidantes sintéticos en productos cárnicos, es en salchichas frescas y en productos secos como el pepperoni (Sebranek *et al.*, 2005).

Recientemente se ha aplicado miel de abeja para inhibir la oxidación de lípidos. La relación de algunos estudios, donde se ha evaluado la actividad antioxidante de la miel en productos cárnicos, se presenta en la Tabla 1. Antony *et al.* (2000) encontraron que los niveles de miel deshidratada empleados (1 a 20%) inhibieron la oxidación en pechugas de pavo. Los porcentajes de inhibición fueron de 50 al 76% para la carne de pavo recién cocida y de 34 al 88% para la pechuga de pavo cocinada almacenada durante 48 horas. Antony *et al.* (2002) compararon el efecto antioxidante de los PRM formados de miel (miel-lisina-PRM) y de la miel, y observaron que conforme se incrementa el nivel de PRM o de miel (5 y 15%) la oxidación lipídica de pechugas de pavo se reduce; sin embargo, la miel tuvo mejor actividad antioxidante.

McKibben y Engeseth (2002) estudiaron el efecto antioxidante de mieles de diferente fuente floral (Tabla 1) en hamburguesas de pavo cocinadas. Estos autores encontraron que el color de la miel está relacionado con su capacidad antioxidante, siendo la miel oscura (alforfón) la que presentó la mejor actividad

Tabla 1. Estudios realizados con miel de abeja adicionada a productos cárnicos para evaluar su actividad antioxidante.

Producto cárnico	Tipo de miel	Concentraciones	Referencia
Pechuga de pavo cruda, recién cocinada y almacenada por 48 horas	Miel deshidratada	1, 5, 10, 15, 20%	Antony <i>et al.</i> , 2000
Pechuga de pavo recién cocinada y almacenada por 48 horas	Miel seca y miel-lisina-PRM	5 y 15%	Antony <i>et al.</i> , 2002
Hamburguesas de pavo cocinadas	Acacia, soya, alforfón, trébol de olor	5%	McKibben y Engeseth, 2002
Hamburguesas de res cocinadas refrigeradas y congeladas	Flor silvestre, trébol de olor	5, 10, 15%	Johnston <i>et al.</i> , 2005
Filetes de res, puerco y pollo	Alforfón, acacia, abeja japonesa, arveja china	5%	Nagai <i>et al.</i> , 2006

antioxidante, en comparación con la clara (acacia). Basado en lo anterior, se puede aseverar que el color de la miel está relacionado con el contenido de compuestos fenólicos, es decir, a mayor contenido de compuestos fenólicos más oscura es la miel.

Una alternativa natural a los fosfatos podría ser la miel de abeja, con el fin de retrasar la oxidación de lípidos. En el estudio realizado por Johnston *et al.* (2005) (Tabla 1) se evaluó la capacidad antioxidante de la miel de trébol de olor y la de flor silvestre a distintas concentraciones (5, 10 y 15%), encontrando que la inhibición de la oxidación de lípidos producida por las diferentes concentraciones de las mieles, añadidas a hamburguesas de res, fue comparada con la del tripolifosfato de sodio (0.25% del peso de la carne). Además, la miel mejoró el rendimiento por cocción de las hamburguesas de res precocidas.

Nagai *et al.* (2006) estudiaron el efecto antioxidante y antibacteriano de diferentes mieles. El 5% de miel de alforfón fue tan efectiva como 1mM α -tocoferol, inhibiendo la oxidación en un sistema modelo de peroxidación. Las mieles empleadas (alforfón, acacia, abeja japonesa y arveja china) fueron añadidas a filetes de res, puerco y pollo para estudiar su actividad antibacteriana, en la población microbiológica total. Este estudio demostró que las mieles de diferente fuente floral poseen diferente actividad antioxidante y antibacteriana y son secuestradoras de especies activas del oxígeno.

Mundo *et al.* (2004) estudiaron el efecto antimicrobiano de 27 mieles crudas (sin pasteurizar) contra algunos microorganismos patógenos y deteriorativos de los alimentos. Los microorganismos estudiados, el medio de cultivo, su clasificación y tiempo de incubación empleados, se muestran en la Tabla 2. En este estudio se encontró que cada microorganismo patógeno o

Tabla 2. Clasificación y parámetros de crecimiento óptimos de microorganismos patógenos y deteriorativos de alimentos (Mundo *et al.*, 2004).

Microorganismo	Clasificación	Medio	Temperatura de incubación (°C)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Patógeno	Nutritivo	37
<i>Salmonella enterica</i> Ser. Typhimurium	Patógeno	Nutritivo	37
<i>Bacillus cereus</i>	Patógeno	Nutritivo	30
<i>Listeria monocytogenes</i>	Patógeno	Infusión cerebro-corazon	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	Patógeno	Nutritivo Soya tripticasa Infusión cerebro-corazón	37
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Deteriorativo	Nutritivo	25
<i>Geotrichum candidum</i>	Deteriorativo	Moho levadura	25
<i>Penicillium expansum</i>	Deteriorativo	Extracto de malta	25
<i>Aspergillus niger</i>	Deteriorativo	Papa dextrosa	25
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Deteriorativo	Nutritivo	37
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Deteriorativo	Lactobacillus MRS	37
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Deteriorativo	Nutritivo	55

deteriorativo mostró diferente sensibilidad a la miel, desde el más sensible (*B. stearothermophilus*) hasta aquellos que no se vieron afectados (*S. aureus*, *P. expansum*, *A. niger*, *G. candidum*). Algunas mieles inhibieron el crecimiento tanto de deteriorativos como de patógenos, por lo que estas mieles se podrían aplicar a alimentos con condiciones apropiadas. Sin embargo, es necesario realizar estudios en los que se evalúe la capacidad antimicrobiana de la miel en sistemas alimenticios.

Con respecto al CAPE, es conocido que éste tiene actividad antibacteriana y antioxidante, sin embargo, su utilización en productos cárnicos no se ha investigado. Un estudio en el que se evaluó la actividad antioxidante del CAPE fue realizado por Russo *et al.* (2002), quienes encontraron que en concentraciones de 200, 400 y 800 μM tiene un efecto contra la peroxidación de lípidos en grasa de cerdo.

En sistemas modelo el CAPE inhibe la oxidación lipídica. Sin embargo, no hay estudios en los que se emplee este compuesto en productos cárnicos. Esto da cabida al estudio de la adición de CAPE en productos cárnicos para evaluar su actividad antioxidante; además de evaluar su posible actividad antimicrobiana en un producto cárnico.

JUSTIFICACIÓN

La oxidación de lípidos y la contaminación bacteriana influyen en la pérdida de calidad de los productos cárnicos, así como en la reducción de su vida de anaquel. La utilización de compuestos naturales con actividad antioxidante y antimicrobiana en estos productos, permite alargar su vida de anaquel. Debido a que el CAPE y la miel han mostrado tener actividad antioxidante y antimicrobiana, es motivo de estudio su aplicación en productos cárnicos con alto contenido de grasa.

HIPÓTESIS

El uso de miel de abeja o CAPE permite alargar la vida útil de salchichas de cerdo frescas y cocinadas durante su almacenamiento en refrigeración.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de miel de abeja o CAPE sobre la vida útil de salchichas de cerdo sin cocinar y cocinadas durante su almacenamiento en refrigeración, mediante la evaluación de su capacidad antioxidante y antimicrobiana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar los componentes fenólicos de la miel de abeja.
2. Estandarizar la formulación de salchichas de cerdo con un alto contenido de grasa, adicionadas con miel de abeja (5 y 10%) y CAPE (100 y 200 ppm).
3. Establecer la metodología de extracción del CAPE e implementar su metodología de cuantificación por HPLC en las salchichas sin cocinar y cocinadas durante su almacenamiento en refrigeración.
4. Evaluar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de la miel de abeja y del CAPE en salchichas de cerdo sin cocinar y cocinadas durante su almacenamiento en refrigeración para determinar su vida útil.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de la Miel de Abeja

Contenido de Humedad

El contenido de humedad se analizó acorde a la metodología 969.38 de la AOAC 44.4.04 (2002) el cual se basa en la relación del índice de refracción y el porcentaje de humedad que aparece en la tabla 969.38.

Análisis de Polen

El análisis melisopalinológico de la miel de abeja fue realizado en el laboratorio de palinología del Instituto de Geología de la UNAM, por el Dr. Enrique Martínez Hernández, mediante la metodología descrita por Maurizio (1975). Este análisis se realizó con el fin de saber el origen floral de la miel utilizada en este trabajo de investigación.

Extracción de Compuestos Fenólicos Totales de la Miel de Abeja

La extracción e identificación de los compuestos fenólicos totales se realizó aplicando las metodologías desarrolladas por Burboa-Zazueta (2004). Para la extracción de los compuestos fenólicos se mezclaron 100 g de miel con 5 partes de agua ácida (pH 2) hasta tener una solución completamente fluida. Esta mezcla se filtró a través de algodón con el fin de remover partículas

sólidas. El filtrado se pasó a través de una columna de Amberlite XAD-2 (tamaño de poro de 9 nm; y tamaño de partícula de 0.3-1.2 mm). Esta resina permite una recuperación de más del 95% de compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos fueron retenidos por la resina, mientras que los azúcares y otros compuestos polares fluyeron con el solvente acuoso. Posteriormente se realizaron lavados con 300 mL de agua ácida y después con 600 mL de agua destilada para eliminar azúcares y compuestos polares remanentes en la columna. Los compuestos fenólicos en la resina fueron liberados utilizando 400 mL de metanol. El extracto metanólico se concentró en un evaporador rotatorio a 40°C al alto vacío (10^{-4} mm Hg). Por último, el extracto fenólico fue disuelto en 5 mL de agua y se realizaron extracciones con dietil éter (30 mL x 3). Los extractos etéreos se combinaron, concentraron y se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Análisis por HPLC de los Compuestos Fenólicos

Los extractos etéreos secos se resuspendieron en metanol, grado HPLC, y se filtraron a través de filtros 0.2 μ m (Varian, Inc. México). Se inyectaron manualmente 20 μ L de este extracto a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) para analizar cualitativamente los flavonoides presentes en la miel. El análisis de estos compuestos se realizó en un equipo HPLC Varian ProStar 320 (Chromatography Systems, Walnut Creek CA, USA) con un detector de UV-Vis y una columna Agilent C18 (Agilent Technologies Inc, Santa Clara CA, USA) de fase reversa con 15 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 5 μ m de diámetro de partícula. Se usó como fase móvil una solución de ácido fórmico acuoso (5%, v/v) y metanol a una velocidad de flujo constante (1.5 mL/min) y un programa de elusión de gradiente. El gradiente que se utilizó fue 0% metanol al minuto 0, incrementándose a 30% metanol a los 10 min; se

mantuvo en 30% metanol isocrático por 5 min, se fue incrementando hasta 40% metanol a los 20 min, 45% metanol a los 30 min, 60% metanol a los 50 min, 80% metanol a los 52 min. Se mantuvo en 80% metanol por 10 min, y al minuto 65 se incrementó a 100% metanol; por último se disminuyó a 0% metanol al minuto 70, manteniéndose así por 1 min. Los cromatogramas fueron monitoreados a 290 y 340 nm.

Síntesis de CAPE

Se realizó una esterificación del ácido caféico catalizada por el ácido p-toluensulfónico (APTS, ver Figura 3), empleando el método de Nakanishi *et al.* (1991) con modificaciones. El ácido caféico se hizo reaccionar con alcohol fenilílico manteniendo una relación molar 1:15, respectivamente. El ácido caféico, el alcohol fenilílico y el catalizador (APTS) fueron disueltos en tolueno anhidro, manteniendo esta mezcla en reflujo por 4 días. El agua formada durante la reacción de esterificación fue removida empleando una trampa Dean-Stark. Posteriormente, el tolueno fue eliminado bajo presión reducida (0.1 mm Hg) y el CAPE fue purificado del crudo de la reacción utilizando cromatografía en columna. Para la purificación se siguió el método de Díaz (2002) quien utilizó sílica gel como fase estacionaria y una mezcla 90/10 hexano/acetato de etilo como fase móvil. La purificación fue monitoreada utilizando cromatografía en capa fina. Finalmente el CAPE se recristalizó y se caracterizó mediante resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e IR.

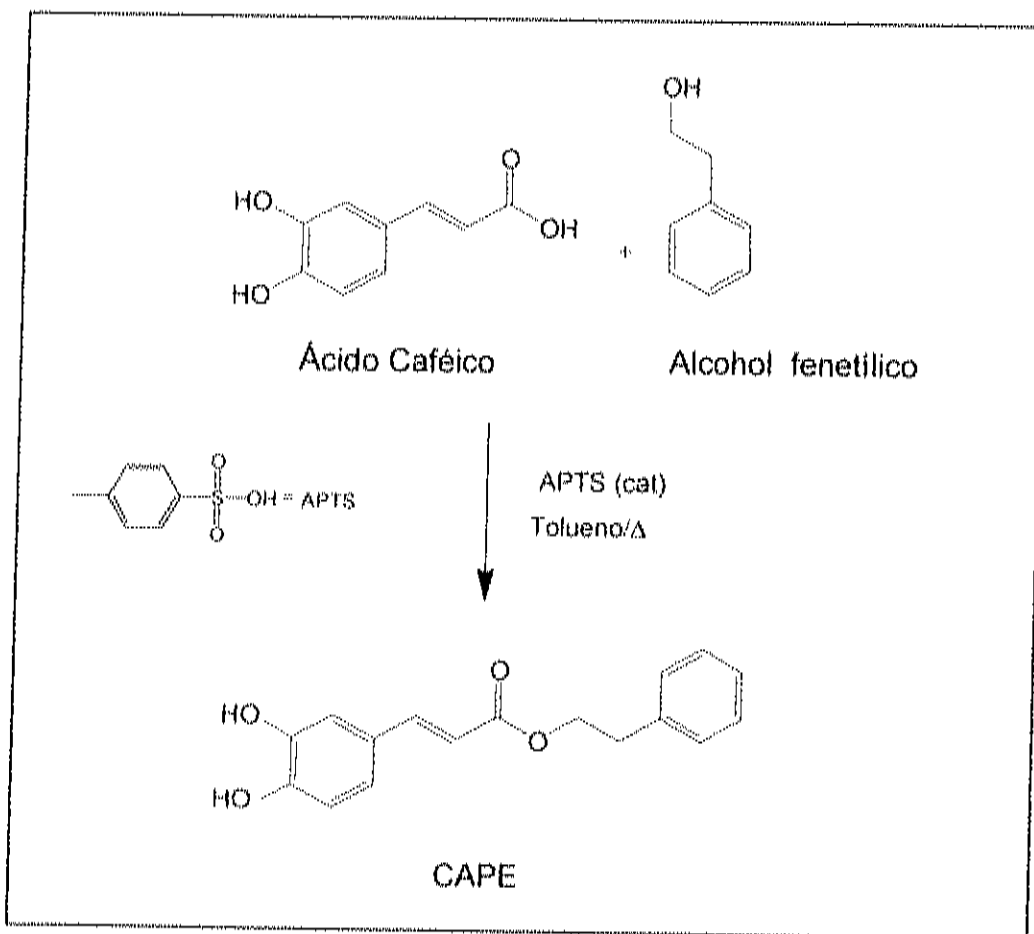


Figura 3. Esquema de la reacción de la síntesis del CAPE.

Elaboración de Salchichas sin Cocinar y Cocinadas

Para la elaboración de las salchichas se utilizó carne de cerdo obtenida con un productor de la ciudad de Hermosillo, Sonora. La miel de abeja añadida a las salchichas fue proporcionada por un apicultor de Ures, Sonora, mientras que el CAPE fue sintetizado en el laboratorio de Biopolímeros (CIAD), bajo la supervisión del Dr. Javier Hernández, siguiendo la metodología descrita por Nakanishi *et al.* (1991) con modificaciones, las cuales se mencionaron anteriormente.

Para este trabajo de investigación se elaboraron salchichas control, salchichas con miel (5% y 10%), salchichas con CAPE (100 ppm y 200 ppm) y salchichas con BHT (0.02%, base grasa). Todas las salchichas fueron formuladas con un contenido de 1.5% de sal.

El proceso de elaboración que se utilizó fue el siguiente: la carne y la grasa de cerdo se cortaron en trozos y se molieron en un molino (Hobart, modelo 4152; Ohio, USA) usando un plato de 3/16" (4.8 mm). Posteriormente se realizó la incorporación de los ingredientes, en el caso de las salchichas con CAPE, primero se incorporó el CAPE a la grasa, posteriormente la carne y la sal. En el caso de las salchichas con miel, se agregó la grasa, la carne, la sal y la miel. Una vez hecha la mezcla se embutió en una funda natural de cordero (diámetro 15mm) utilizando una embutidora (Smith, modelo RS-2050; New Jersey, USA). La molienda, el mezclado de ingredientes y el embutido se realizaron a temperatura de refrigeración (5°C). Para el caso de las salchichas cocinadas, el proceso de cocción se realizó en plancha hasta alcanzar una temperatura interna de 71°C. Las salchichas cocinadas y sin cocinar se empacaron en emplegado, es decir, en una charola de poliestireno y envueltas con una película auto adherible permeable al oxígeno. Las salchichas, tanto sin

cocinar como cocinadas fueron almacenadas a 2°C durante 16 días, en condiciones de obscuridad.

Análisis de las Salchichas

Durante el almacenamiento de las salchichas crudas se midió el pH, color (L*, a*, b*), porcentaje de metamioglobina, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), calidad microbiológica (mesófilos y psicrótrofos) y cuantificación del CAPE. Los análisis para las salchichas cocinadas fueron los mismos, exceptuando el color y porcentaje de metamioglobina. Los muestreos en esta etapa del estudio se realizaron cada 4 días, y cada análisis se llevó a cabo por triplicado, exceptuando la microbiología y la cuantificación del CAPE, los cuales se realizaron por duplicado.

Para la estandarización de la formulación se consideraron tanto el contenido de grasa como el de humedad. Las metodologías de las técnicas usadas en esta parte del trabajo experimental se mencionan a continuación.

Contenido de Grasa

Para la determinación de grasa se usó el método 960.39 de la AOAC 39.1.50 (2002), el cual se basa en una extracción con un equipo goldfich. El porcentaje de grasa se expresó en base húmeda.

Contenido de Humedad

Esta medición se realizó siguiendo el método 950.46 de la AOAC 39.1.02 (2002), en donde las unidades son en porcentaje.

pH

El pH de las salchichas sin cocinar y cocinadas fue medido con un potenciómetro Corning Ion Analyzer 255 (Corning Science Products, Corning NY, USA), después de pesar 3 g de muestra y homogenizarse con 27 mL de agua destilada.

Color

La medición instrumental de color se realizó en el exterior de las salchichas crudas utilizando un espectrofotómetro de reflectancia CM 2600d (Konica-Minolta Sesing Inc., Japón). Se registraron los parámetros CIE (Comisión Internacional de l'Eclairage) L* (luminosidad), a* (Índice de rojo) y b* (Índice de amarillo) (CIE, 1978).

Porcentaje de Metamioglobina

El porcentaje de formación de metamioglobina (MetMb) en la superficie de las salchichas frescas fue determinado siguiendo la metodología propuesta por Stewart *et al.* (1965), por medio de la medida espectrofotométrica de la reflectancia en la superficie de las salchichas a longitudes de onda de 525 y 572

nm, con un espectrofotómetro Minolta CM 2600d. A partir de los valores de la relación K/S_{525nm} y K/S_{572nm} registrados por el equipo se determinó el porcentaje de metamioglobina.

El valor máximo de la relación K/S_{525nm} y K/S_{572nm} al principio del experimento fue fijado como 0% de MetMb, y el correspondiente al 100% de MetMb fue obtenido realizando el mismo procedimiento de medición de la reflectancia en la superficie de las salchichas después de ser oxidadas con una solución de ferrocianuro de potasio al 1% (p/v). Con los datos obtenidos se elaboró una curva de calibración que permitió calcular el porcentaje de metamioglobina para cada día de muestreo.

Cuantificación de las Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para conocer el grado de oxidación de los lípidos en las salchichas se cuantificaron las TBARS siguiendo la metodología descrita por Pfalzgraf *et al.* (1995). Con esta técnica se determinaron los productos secundarios de la oxidación lipídica.

Para este análisis se mezclaron 10 g de muestra con 20 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, que se homogeneizaron por 20 seg (11000 rpm) empleando un homogeneizador Ultra-Turrax® modelo T25 (IKA® Works, Inc., Wilmington NC, USA). El homogeneizado se centrifugó a 3500 g por 15 min en una centrífuga refrigerada Allegra® modelo X-12R (Beckman Coulter Inc., Palo Alto CA, USA). El sobrenadante se decantó y filtró a través de papel filtro Whatman 41.

En un tubo se mezclaron 2 mL del filtrado con 2 mL de una solución de TBA 20 mM recién preparada (300 mg de ácido 2-tiobarbitúrico en 100 mL de agua). Los tubos con esta mezcla fueron homogeneizados en un Vortexer 2 modelo G-560 (Scientific Industries Inc., Bohemi, NY, USA) durante 30 s y se incubaron en un baño de agua a 97°C por 20 min, posteriormente se enfriaron a temperatura ambiente. Finalmente se realizó la lectura de la absorbancia a 531 nm, en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (Termo Electron Scientific Instruments, Madison Wisconsin, USA).

Para las lecturas de los extractos de las muestras con miel se prepararon dos blancos uno para las muestras con 5% de miel y otro para las muestras con 10% de miel (ver Anexo). En el caso del blanco 5% de miel, se mezclaron 10 ml de una solución de 5% (p/v) de miel en agua, con 30 ml de TCA al 10%, posteriormente se filtró a través de papel filtro Whatman 41, después en un tubo de ensaye se mezclaron 2 ml de la solución de miel filtrada con 2 ml TBA 20 mM, finalmente fueron homogeneizados e incubados a 97°C junto con los tubos de las muestras. El blanco 10% de miel se preparó siguiendo el mismo procedimiento que el de 5% de miel, preparando una solución 10% (p/v) de miel. La concentración de TBARS se calculó mediante una curva patrón usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), expresándose los resultados como mg de malonaldehído (MA) por kilogramo de muestra.

Evaluación de la Calidad Microbiológica

Para evaluar la calidad microbiológica se realizó el conteo total de psicrótrofos aerobios y mesófilos aerobios. Para esto se prepararon diluciones decimales seriadas con agua peptonada y posteriormente en cajas petri estériles se colocaron 1 mL de las diluciones y se le vació agar para recuento

en placa (PCA; Merck; Darmstadt, Germany) previamente temperado a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$. Las cajas se rotaron cuidadosamente para lograr una distribución uniforme antes de permitir que se solidificara y posteriormente se invirtieron e incubaron. En el caso de los psicrótrofos, las placas se incubaron a 7°C durante 10 días y para los mesófilos a 37°C durante 24 a 48 h. El conteo se realizó en las placas que contenían entre 20 y 200 colonias. Los recuentos se expresaron como \log_{10} de las unidades formadoras de colonia por gramo (\log_{10} UFC/g).

Contenido de CAPE

A las salchichas, tanto cocinadas como sin cocinar, se les determinó el contenido de CAPE durante su almacenamiento (16 días). Estas salchichas fueron sometidas a un proceso de extracción, el cual fue desarrollado en este trabajo de investigación, posteriormente, el extracto obtenido fue inyectado manualmente (20 μL) en un equipo HPLC Varian ProStar 320 (Chromatography Systems, Walnut Creek CA, USA) provisto con un detector de UV-Vis y con una columna Microsorb C18 (Varian Inc., Lake Forest CA, USA) de fase reversa con 10 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 3 μm de diámetro de partícula. Se usó como fase móvil una solución de ácido fórmico (5% v/v) y metanol. La metodología de extracción y los gradientes de los solventes utilizados en el HPLC se especifican en la sección de resultados.

Diseño Experimental

El diseño experimental del estudio de almacenamiento fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial en el que se tuvieron 6 tratamientos (5% de miel, 10% de miel, 100 ppm de CAPE, 200 ppm de CAPE, 0.02% (base

grasa) de BHT y Control) y 5 tiempos de muestreo (0, 4, 8 12 y 16 días). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias de medias fueron analizadas mediante la prueba de Tukey-Kramer, con un nivel de confianza del 95% utilizando el paquete estadístico Number Cruncher Statistical Systems (NCSS) versión 2001. Se hicieron dos repeticiones experimentales y las mediciones para cada variable de calidad analizada se realizaron por triplicado a excepción de la microbiología y de la cuantificación del CAPE, las cuales se realizaron por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la Miel

Contenido de Humedad

El valor del índice de refracción promedio para la miel de abeja fue de 1.4971 ± 0.0003 , índice que fue utilizado para calcular el porcentaje de humedad de la miel y éste fue de 15.81 ± 0.126 . Este valor se encuentra dentro del rango establecido por la NMX-F-036-1997-NORMEX, donde se establece que la miel de abeja debe tener un máximo de 20% de humedad. Una humedad mayor al 20% favorece la fermentación, lo cual afecta negativamente la calidad de la miel.

Análisis del Polen

Los resultados del conteo de los granos de polen de la miel utilizada en este trabajo de investigación se muestran en la Tabla 3, donde se observa que el polen predominante es el de mezquite (*Prosopis juliflora*) con 67% de los granos totales. La identificación de los granos de polen mostró que las especies dominantes fueron *Prosopis juliflora* (mezquite), *Olneya tesota* (palo fierro) y *Desmodium* sp y en menor proporción *Cercidium floridum* (palo verde), *Acacia* sp, *Dalea*, *Brassica*, *Citrus* (naranja), *Ambrosia*, *Acanthaceae*, *Malvaceae* y *Cactaceae*.

Tabla 3. Variedades y porcentajes de los granos de polen encontrados en la miel utilizada en el presente estudio.

Variedad	Porcentaje
<i>Prosopis juliflora</i> (mezquite)	67
<i>Olneya tesota</i> (palo fierro)	16
<i>Desmodium</i> sp	7
<i>Cercidium floridum</i> (palo verde)	2
<i>Acacia</i> sp	2
<i>Brassica</i> (dos especies)	2
<i>Dalea</i> (dos especies)	1
<i>Citrus</i>	1
Otras*	2

* Ambrosia, Acanthaceas, Malvaceas y Cactaceas (dos especies), que están en menos del 1%

De acuerdo a los resultados, la miel utilizada en este trabajo de investigación se clasificó como una miel monofloral de mezquite. Esta última aseveración se hace debido a que se considera que una miel es monofloral cuando posee al menos el 45% de granos polen de una misma flor (Louveaux *et al.*, 1978). Burboa-Zazueta (2004), quien analizó diferentes mieles de la región de Ures, Sonora, también encontró que la mayoría de las mieles fueron monoflorales de mezquite.

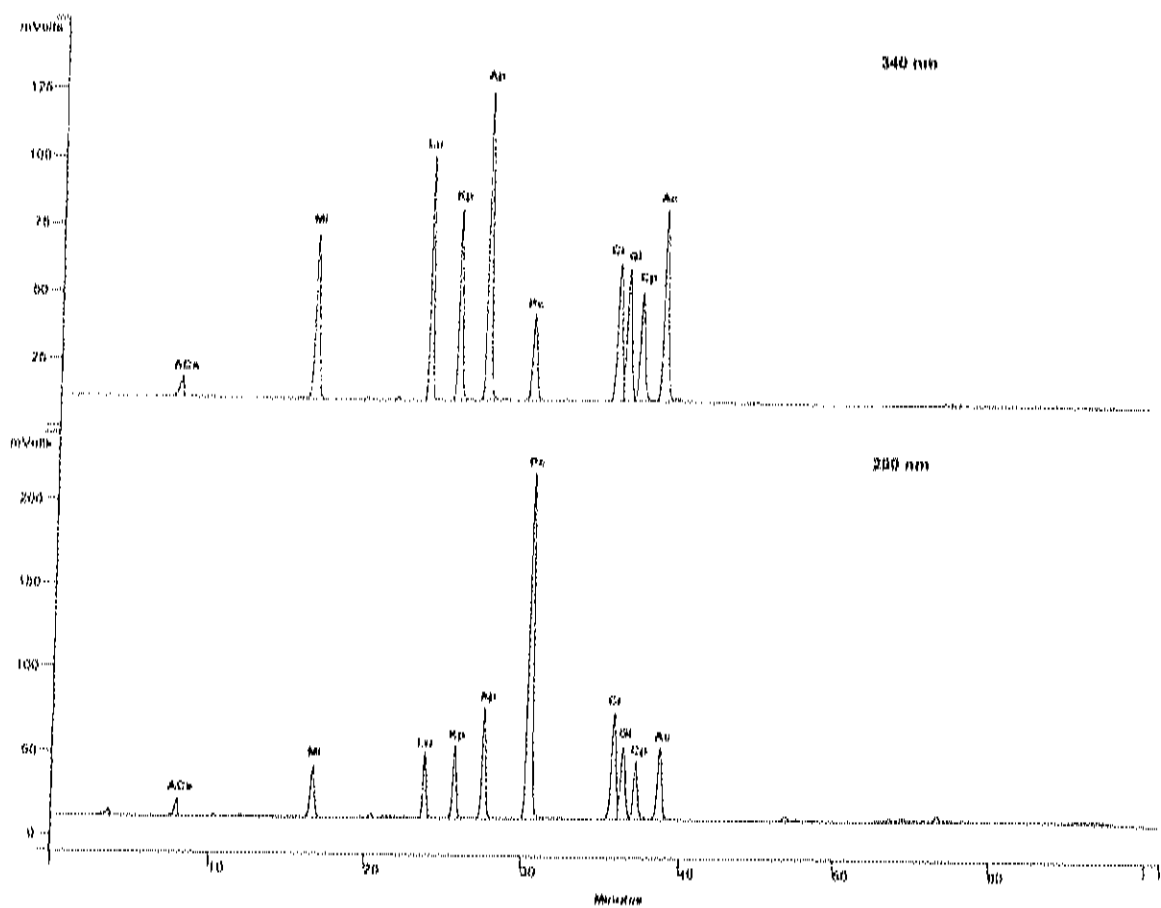
Extracción e Identificación de los Compuestos Fenólicos de la Miel

La extracción de los compuestos fenólicos de la miel se realizó por duplicado y se logró satisfactoriamente. La cantidad de compuestos fenólicos en el extracto metanólico fue de 61.66 y 127.74 mg/ 100 g de miel, y en el extracto etéreo fue de 8.44 y 5.0 mg/ 100 g de miel. En el 2004, Burboa-Zazueta cuantificó la cantidad de compuestos fenólicos en miel de mezquite y encontró cantidades similares en el extracto metanólico, en el rango de 41.2-89.0 mg/ 100 g de miel; mientras que en el extracto etéreo obtuvo cantidades mayores de compuestos fenólicos, en el rango de 13.5-37.1 mg/ 100 g de miel.

Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, la identificación de los compuestos fenólicos se realizó en el extracto etéreo, mediante HPLC. Los estándares que se utilizaron y los tiempos de retención de cada uno se muestran en la Tabla 4. En la Figura 4 se muestran los cromatogramas de la mezcla de los estándares obtenidos a 340 nm y 290 nm, en esta figura se observa que a 340 nm los estándares presentan una mejor absorción que a 290 nm, a excepción de pinocebrina.

Tabla 4. Estándares y tiempos de retención utilizados para la identificación de los compuestos fenólicos en la miel.

Estándar	Tiempo de Retención (min)	Abreviación
Ácido Caféico	7.685	ACa
Miricentina	16.181	Mi
Luteolina	23.544	Lu
Kaempferol	25.392	Kp
Apigenina	27.217	Ap
Pinocebrina	30.181	Pc
Crisina	35.562	Cr
Galangina	36.141	Gl
CAPE	37.006	Cp
Acacetina	38.501	Ac

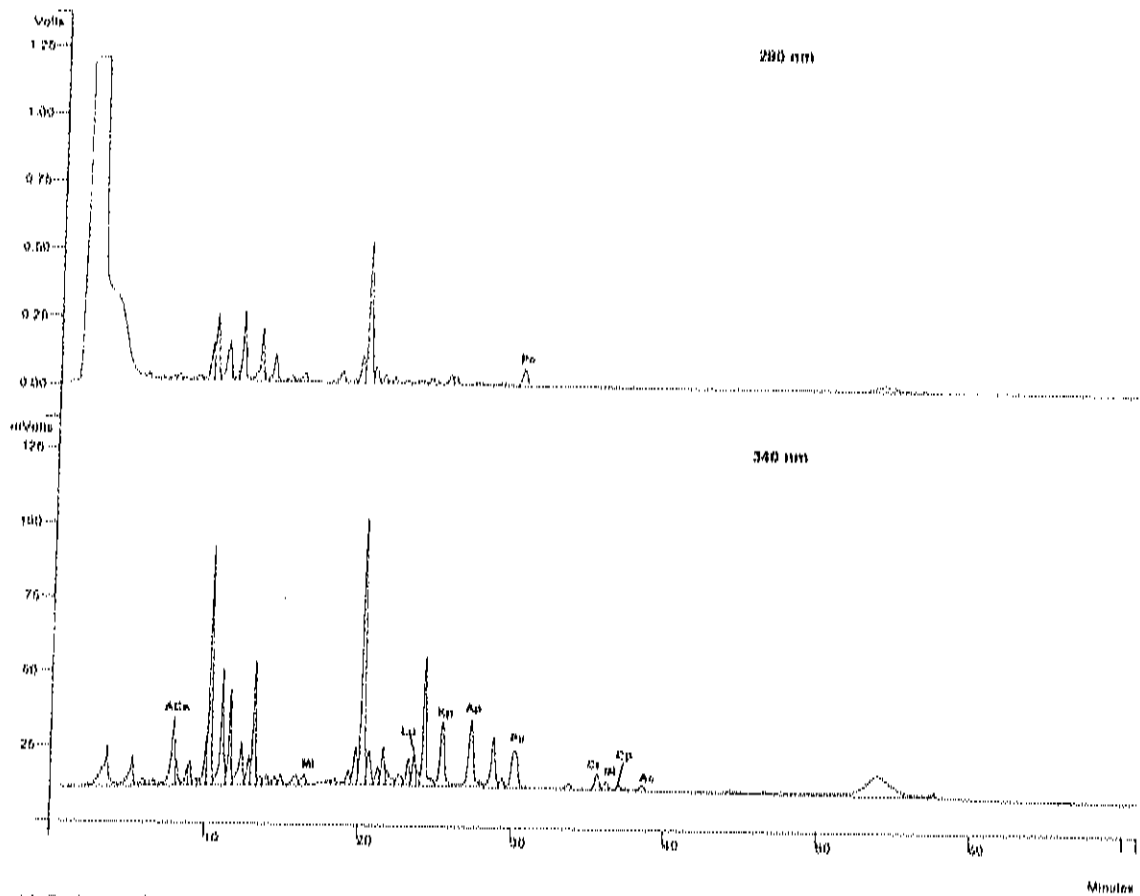


* (Aca) ácido cafeico, (Mi) miricentina, (Lu) luteolina, (Kp) kaempherol, (Ap) apigenina, (Pc) pinocembrina, (Cr) crisina, (Gl) galangina, (Cp) CAPE, (Ac) acacetina.

Figura 4. Cromatogramas de la mezcla de estándares obtenidos a 340 nm y 290 nm.

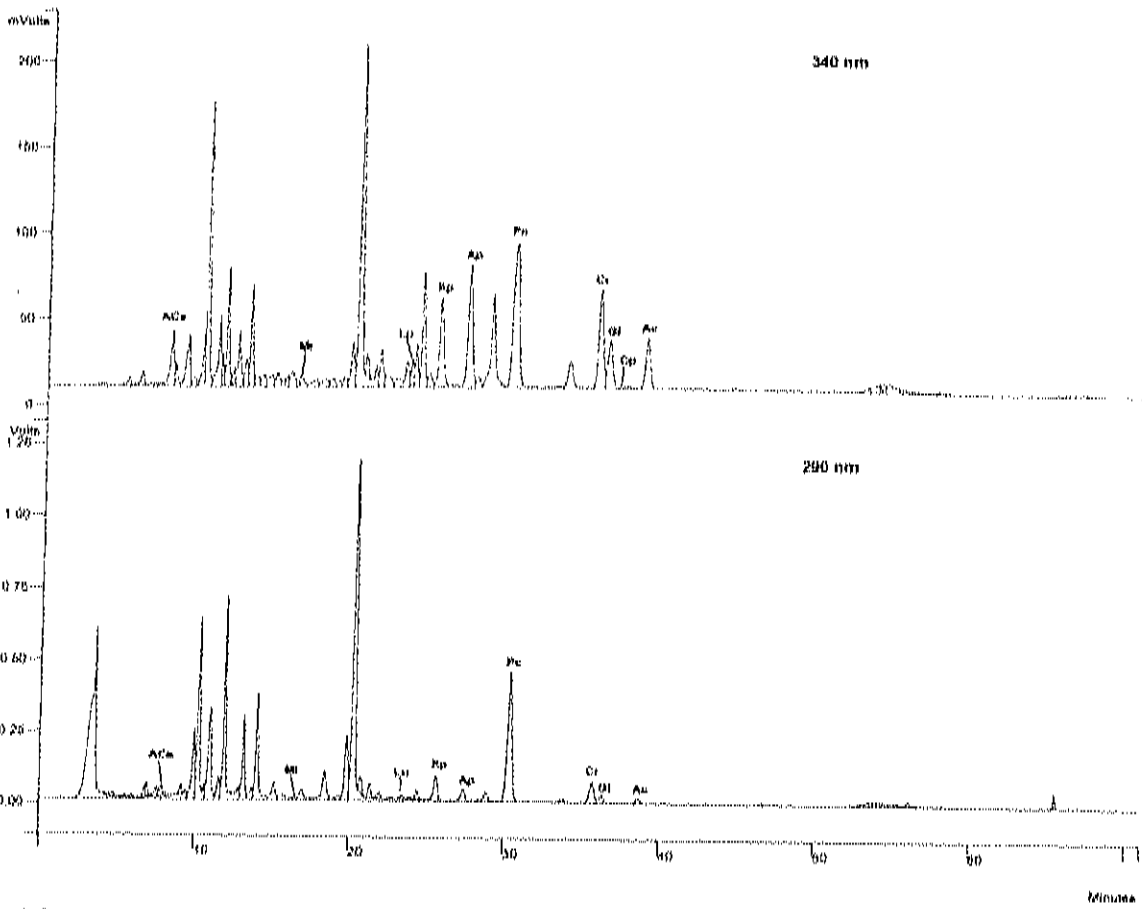
En las Figuras 5 y 6 se muestran los cromatogramas del primero y segundo extracto etéreo obtenidos, respectivamente. En la Figura 5 se observa que de los 10 compuestos identificados, ácido caféico, kaempferol, apigenina y pinocebrina, son los que se encuentran en mayor proporción, mientras que en la Figura 6 se observa que los compuestos mayoritarios fueron: ácido caféico, kaempferol, apigenina, pinocebrina, crisina, galangina y acacetina. Lo anterior considerando los cromatogramas obtenidos a 340 nm. Sin embargo, para poder establecer a los compuestos mayoritarios fue necesario cuantificar los compuestos identificados; las cantidades de compuestos fenólicos, expresados como $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de miel, se muestran en la Tabla 5. Cabe resaltar que aparte de los compuestos identificados existen otros compuestos que no pudieron ser identificados, sin embargo, considerando el orden de elución que obtuvo Burboa-Zazueta (2004) podemos inferir que el pico que se observa en el minuto 20, en ambos extractos, es pinobanksina.

Al analizar los cromatogramas de los dos extractos etéreos se observa que los compuestos se organizan en dos grupos; el primero comprende hasta el minuto 15 y el segundo del minuto 16 en adelante. Burboa-Zazueta (2004) también estableció dos grupos; el primero comprendió los compuestos con un tiempo de elución menor a 20 minutos, mientras que el segundo a los compuestos que eluyeron entre 21-80 minutos. Considerando los resultados de Burboa-Zazueta (2004), el primer grupo comprende a ácidos fenólicos, mientras que el segundo corresponde a compuestos de tipo flavonoide. Lo cual coincide con los estándares que se utilizaron en este trabajo experimental, ya que el ácido caféico aparece en el minuto 7.9, mientras que el resto de los estándares (flavonoides) después de 15 minutos.



* (ACa) ácido cafeico, (Mi) miricentina, (Lu) luteolina, (Kp) kaempherol, (Ap) apigenina, (Pc) pinocembrina, (Cr) crisina, (G) galangina, (Cp) CAPE, (Ac) acacetina.

Figura 5. Cromatogramas del primer extracto etéreo obtenidos a 290 nm y 340 nm.



* (Aca) ácido cafeico, (Mi) miricentina, (Lu) luteolina, (Kp) kaempferol, (Ap) apigenina, (Pc) pinocembrina, (Cr) crisina, (Gl) galangina, (Cp) CAPE, (Ac) acetina.

Figura 6. Cromatogramas del segundo extracto etéreo obtenidos a 340 nm y 290 nm.

Tabla 5. Cuantificación de los 10 compuestos fenólicos identificados en la miel ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ de miel).

Estándares	Extracto Etéreo 1	Extracto Etéreo 2
Ácido Caféico	160.36 ⁽³⁾	40.23 ⁽³⁾
Miricentina	78.00 ⁽⁵⁾	23.39 ⁽⁶⁾
Luteolina	127.51 ⁽⁴⁾	31.96 ⁽⁴⁾
Kaempferol	350.41 ⁽¹⁾	164.71 ⁽²⁾
Apigenina	32.23 ⁽⁶⁾	17.02 ⁽⁷⁾
Pínocembrina	166.19 ⁽²⁾	195.47 ⁽¹⁾
Crísina	12.15 ⁽⁷⁾	25.58 ⁽⁵⁾
Galangina	4.54 ⁽⁸⁾	8.27 ⁽⁹⁾
CAPE	2.45 ⁽¹⁰⁾	0.30 ⁽¹⁰⁾
Acacetina	3.24 ⁽⁹⁾	8.34 ⁽⁸⁾

⁽¹⁻¹⁰⁾ Orden descendente de los compuestos, tomando en cuenta la cantidad presente en la miel.

Después de cuantificar los compuestos fenólicos (Tabla 5) en los dos extractos etéreos, se observó que los compuestos mayoritarios en el primer extracto etéreo son kaempferol, pinocembrina, ácido caféico y luteolina en orden descendente. La cantidad de compuestos fenólicos mayoritarios se situó en el rango de 350.41-127.5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de miel, para kaempferol y luteolina, respectivamente. Mientras que en el segundo extracto etéreo los compuestos mayoritarios fueron pinocembrina y kaempferol con 195.47 y 164.71 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de miel, respectivamente. El resto de los compuestos identificados en el segundo extracto estuvo por debajo de 41 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de miel, mientras que en el primer extracto estuvieron por debajo de 79 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de miel. Como se puede observar, desde la extracción, el primer extracto etéreo fue mayor en comparación al segundo.

Gheldof *et al.* (2002) identificaron y cuantificaron los componentes antioxidantes de diferentes mieles de América del Norte, ellos identificaron a pinobanksina, pinocembrina, crisina y galangina, como los flavonoides principales en las mieles que analizaron. Además, midieron la capacidad antioxidante como valores ORAC (capacidad de absorber radicales oxígeno) de las mieles y de los diferentes extractos (fase acuosa ácida, fase acuosa neutra, fase acuosa después de la extracción con éter y fase metanólica); encontraron que las fases acuosas tuvieron mayor capacidad antioxidante que la fase metanólica, esta última contenía a los flavonoides y ácidos fenólicos que identificaron. Además, encontraron que la suma de la capacidad antioxidante de las cuatro fracciones fue menor que la capacidad antioxidante de la miel entera. Por lo que se sugiere que existen interacciones sinérgicas entre los diferentes compuestos de las diferentes fases. La conclusión de este estudio fue que la capacidad antioxidante total de la miel es el resultado de la actividad combinada y de interacciones entre un amplio rango de compuestos incluyendo fenólicos,

péptidos, ácidos orgánicos, enzimas, productos de la reacción de Maillard y posiblemente otros componentes minoritarios.

En este trabajo se identificaron los componentes fenólicos con el propósito de conocerlos y cuantificarlos, ya que existen muy pocos estudios en los que se ha trabajado con miel de mezquite. Posteriormente se muestran los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante de la miel de mezquite en un producto cárnico (salchichas de cerdo).

Estandarización de la Formulación de las Salchichas

Para la formulación de las salchichas se empleó recorte de cerdo 80/20 (carne/grasa) y grasa firme (lomo). Para obtener una formulación con 30% de grasa fue necesario conocer el contenido de humedad y grasa de la materia prima (Tabla 6). Ya conociendo estos datos se aplicó el cuadrado de Pearson, obteniéndose que de recorte 80/20 fue necesario utilizar 61.25% y de grasa de lomo el 38.75%.

Después de elaborar las salchichas se analizó el contenido de grasa y humedad para corroborar que tuvieran el 30% de grasa. Sin embargo, esto no fue así ya que el contenido de grasa final de las salchichas sin cocinar fue de alrededor de 40% (base húmeda) para las dos repeticiones (ver Tabla 7). El hecho de haber obtenido salchichas con 40% de grasa y no con 30% de grasa se debe a que se tuvo que comprar la materia prima en un establecimiento diferente al que se utilizó para analizar el contenido de grasa y humedad del recorte 80/20 y de la grasa de lomo. Sin embargo, 40% de grasa cae dentro del rango permitido por la USDA para llamar a nuestro producto como salchicha de

Tabla 6. Porcentajes de humedad y grasa del recorte 80/20 y de la grasa firme.

	Recorte 80/20	Grasa Firme
Humedad (%)	67.50 ± 0.90	33.34 ± 1.01
Grasa (%)	14.86 ± 0.19	53.93 ± 1.30

Tabla 7. Porcentajes de humedad y grasa de las salchichas de cerdo sin cocinar.

	Repetición 1	Repetición 2
Humedad (%)	44.92±2.87	43.10±1.17
Grasa (%)	38.49±3.55	41.55± 1.47

cerdo sin cocinar (fresh pork sausage), ya que según el estándar de identidad este tipo de salchicha puede tener un máximo de 50% de grasa (USDA, 1999).

Metodología para la Extracción del CAPE en la Carne

Para establecer la metodología de extracción del CAPE en las salchichas se prepararon formulaciones con 50 ppm. Para el análisis del contenido de CAPE se pesaron 5 g de muestra, los cuales fueron mezclados con 100 mL de etanol. Esta mezcla fue calentada durante 5 h entre 60-70°C, transcurrido este tiempo se filtró a través de papel filtro Whatman 41. Para eliminar el etanol, el filtrado fue colocado en un matraz balón el cual se concentró utilizando un evaporador rotatorio a 64°C al alto vacío (10^{-4} mm Hg). Posteriormente se añadieron 10 mL de hexano, los cuales fueron evaporados a 64°C al alto vacío. Después se agregaron 5 mL de metanol grado HPLC; de este extracto metanólico se inyectaron manualmente 20 μ L a un HPLC Varian ProStar 320 (Chromatography Systems, Walnut Creek CA, USA) con un detector de UV-Vis y con una columna Microsorb C18 (Varian Inc., Lake Forest CA, USA) de fase reversa con 10 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno.

En el equipo HPLC se utilizó como fase móvil una solución de ácido fórmico (5% v/v) y metanol a una velocidad de flujo constante (1.5 mL/min) y un programa de elusión de gradiente. El gradiente con el que se inició fue: 45% metanol y 55% de la solución de ácido fórmico, el porcentaje de metanol fue incrementándose hasta llegar al 60% en el tiempo de 12 min y 18 seg. Posteriormente fue incrementándose hasta 100% metanol a los 14 minutos, se mantuvo 100% metanol hasta los 15 minutos. Finalmente fue disminuyendo la concentración de metanol hasta alcanzar el 45% en el minuto 17. Los cromatogramas fueron monitoreados a 340 nm.

Para conocer la concentración de CAPE en las salchichas se elaboró una curva de calibración, la cual se muestra en la Figura 7. Con las lecturas de los estándares se observó que el tiempo de retención del CAPE se estableció en el intervalo de 7.191 – 9.938 minutos. Conociendo el tiempo de retención y con la curva de calibración se procedió a calcular el porcentaje de recuperación. Para calcularlo se prepararon 5 g de muestra con 100 ppm de CAPE y se obtuvo un porcentaje de recuperación en el rango de 40.3% a 61.7%. Por lo que se puede observar que hubo una recuperación baja y muy variable. Los cromatogramas del estándar de 100 ppm de CAPE y de una muestra utilizada para calcular el porcentaje de recuperación se observa en la Figura 8, que el CAPE aparece en el minuto 9.2, además que en la muestra de carne aparece un pico al inicio del cromatograma, este pico puede ser ácido caféico ya que se corrió un estándar de ácido caféico (Figura 9), y se observó que éste sale al inicio del cromatograma. La baja recuperación del CAPE y la variabilidad también se observó en la cuantificación del CAPE en las salchichas sin cocinar y cocinadas, por lo que es necesario realizar más en la metodología de extracción de CAPE.

Evaluación de la Capacidad Antioxidante de la Miel y del CAPE en las Salchichas de Cerdo

En esta etapa del trabajo experimental se analizaron salchichas cocinadas y sin cocinar; los tratamientos y condiciones de almacenamiento ya fueron descritos. Los resultados que se reportan a continuación son el pH y la cuantificación de TBARS de las salchichas cocinadas. Posteriormente se reportan los resultados de pH, pérdida de peso por cocción, TBARS, color (L^* , a^* , b^*), porcentaje de formación de metamioglobina y la calidad microbiológica de las salchichas sin cocinar.

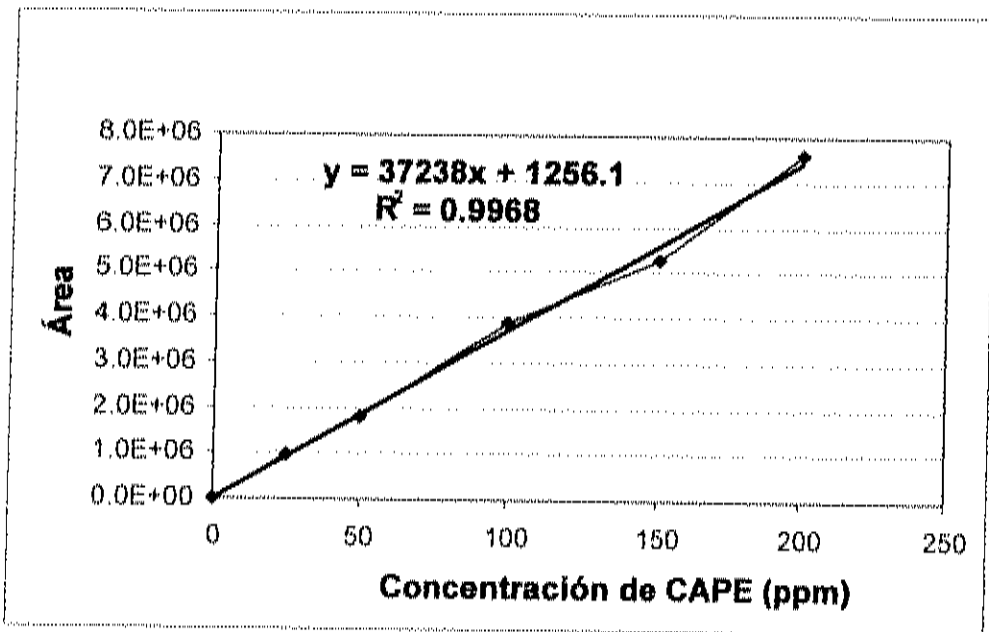


Figura 7. Curva de calibración para la cuantificación del CAPE.

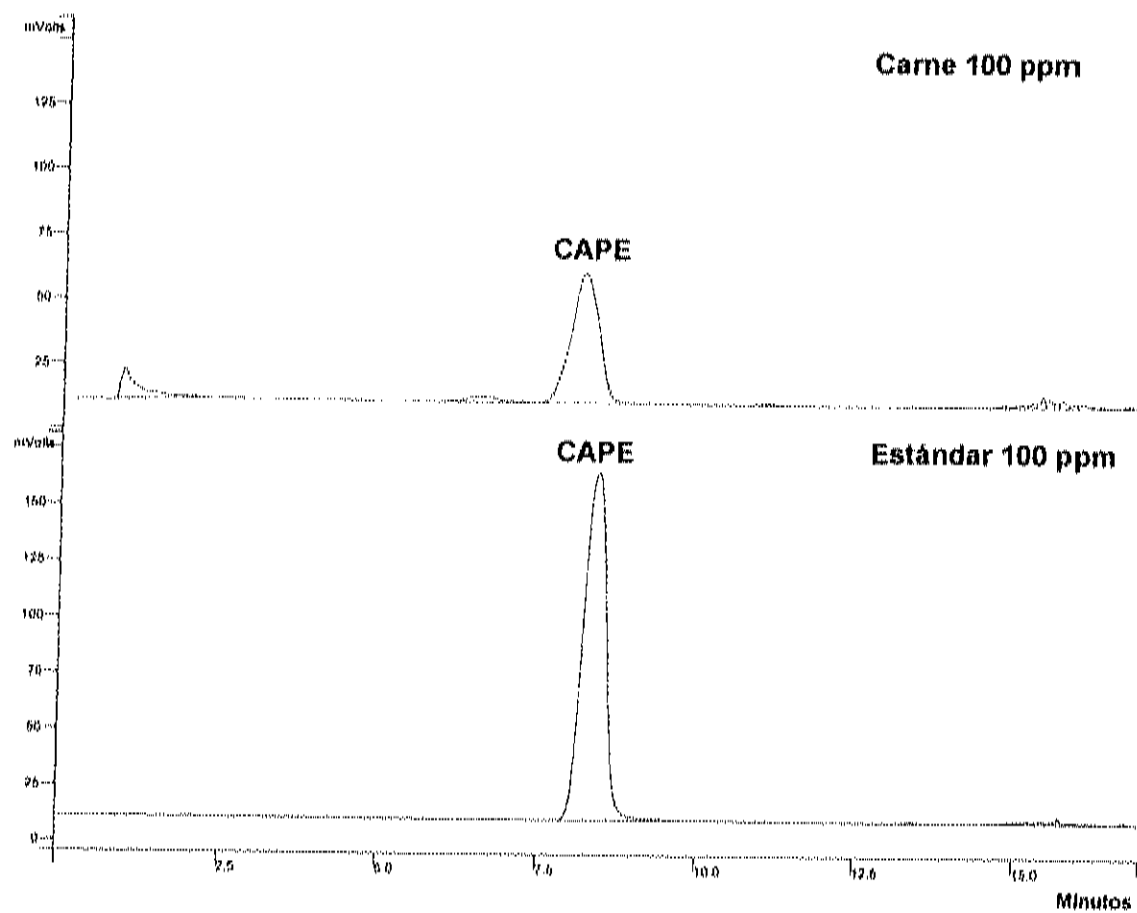


Figura 8. Cromatogramas del estándar CAPE a una concentración de 100 ppm y de carne con 100 ppm de CAPE obtenidos a 340nm.

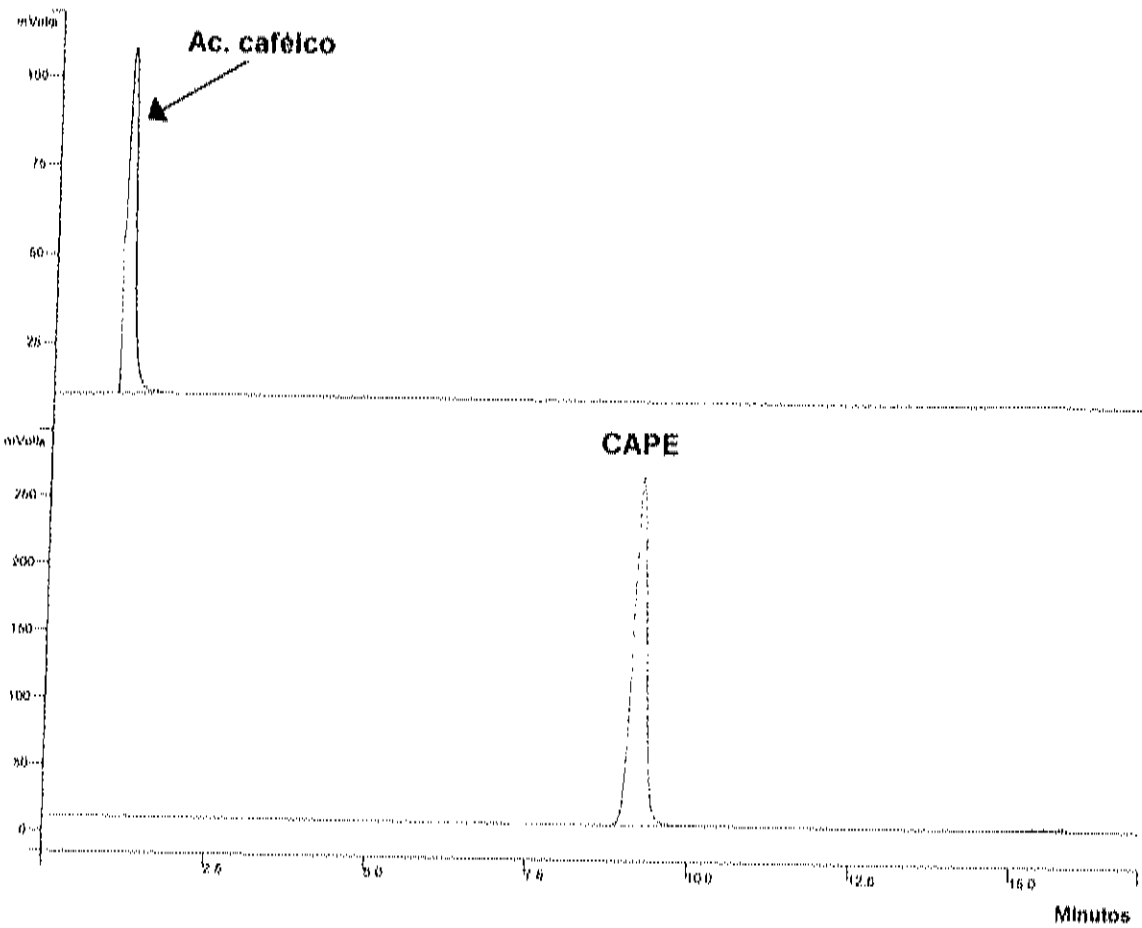


Figura 9. Cromatogramas de estándares de ácido caféico y del CAPE obtenidos a 340 nm.

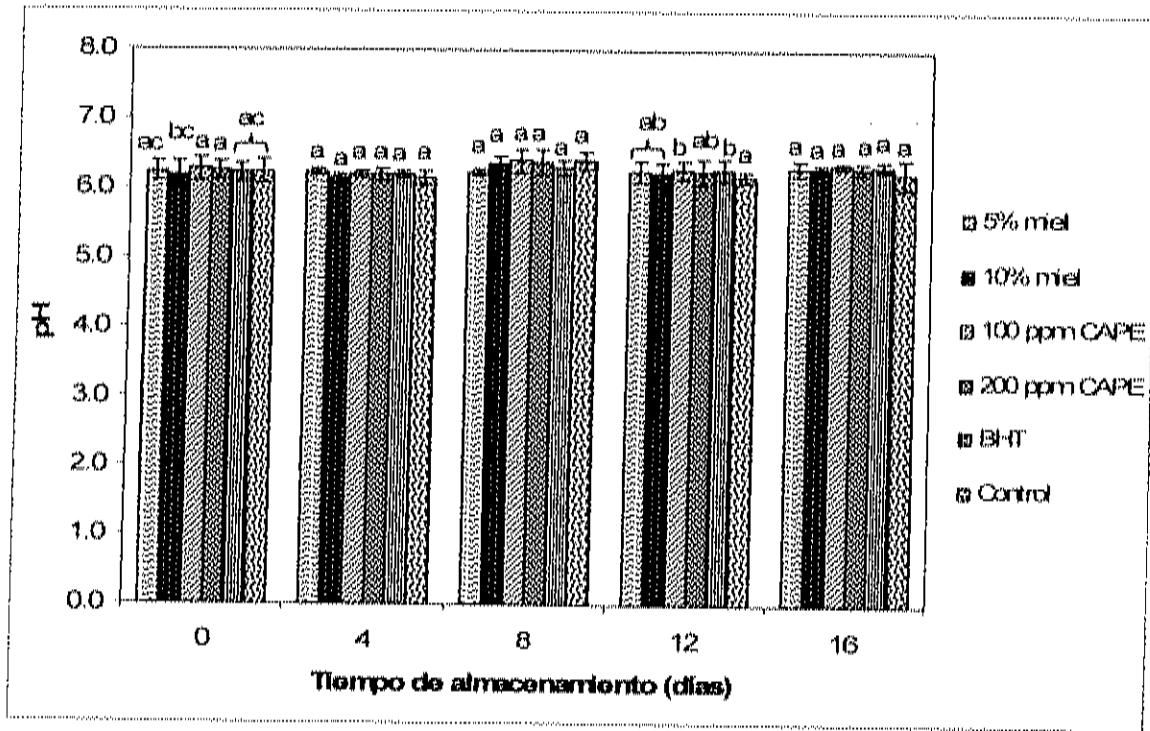
Salchichas Cocinadas

pH. En la Figura 10 se muestran los valores de pH para las salchichas cocinadas, donde se observa que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el pH de los diferentes tratamientos durante todo el tiempo de almacenamiento, manteniendo un pH promedio de 6.27 ± 0.14 . Por lo que ni la miel ni el CAPE tienen un efecto sobre el pH de las salchichas.

El pH de las salchichas cocinadas fue mayor al pH reportado por Rojas y Brewer (2007), quienes elaboraron hamburguesas de puerco cocinadas (30% grasa), con un contenido de sal del 2% y el pH promedio de estas hamburguesas fue de 5.9. Posiblemente el contenido de grasa, sal, CAPE y miel están influyendo en el pH de las salchichas de cerdo cocinadas.

La pérdida de peso por cocción (Tabla 8) fue mayor al 40% en todos los tratamientos, sin embargo, las salchichas con 200 ppm de CAPE y BHT fueron las que menores ($p < 0.05$) pérdidas presentaron.

TBARS. En la Figura 11 se muestran los valores de TBARS de las salchichas cocinadas. Sin embargo, antes de analizar los resultados de oxidación es importante resaltar que las diferencias entre tratamientos encontradas no son atribuidas a un contenido diferente de grasa en las salchichas cocinadas. En la Tabla 8 se muestra el porcentaje de pérdida por cocción de cada tratamiento. Este porcentaje fue calculado después del proceso de cocción, y no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos, por lo tanto las diferencias en la oxidación de lípidos no son debidas a posibles variaciones en el contenido de grasa de las salchichas cocinadas.

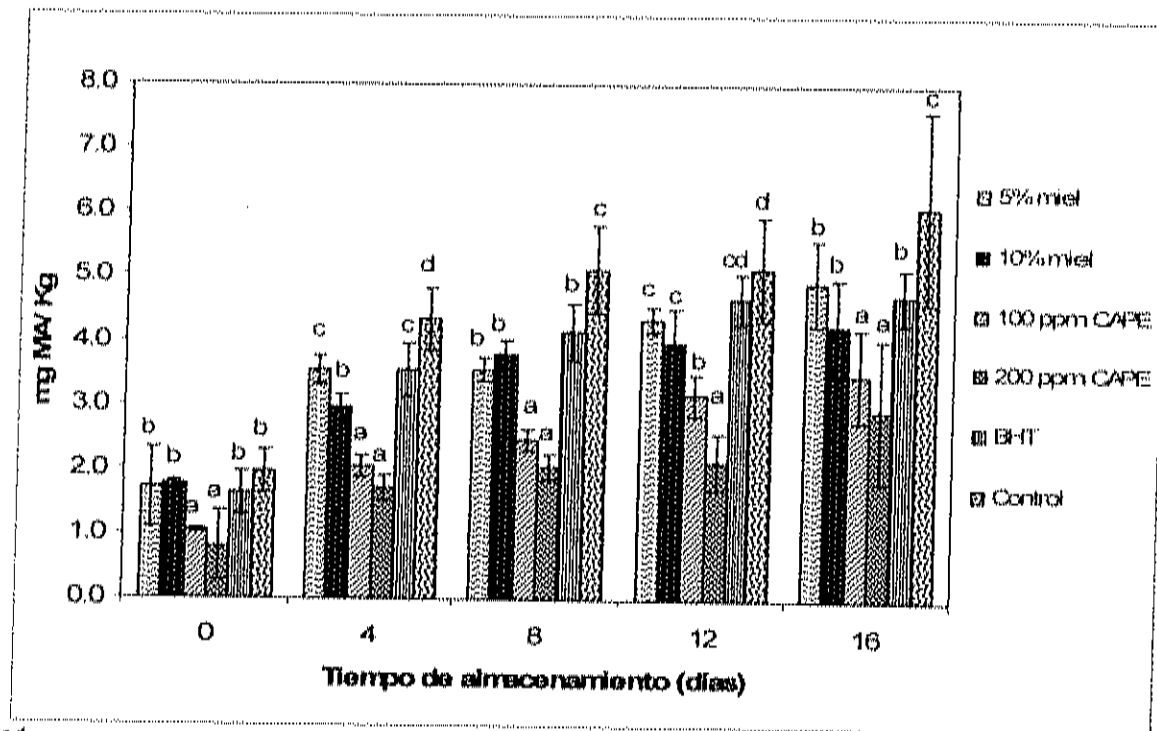


*c Literales diferentes en el mismo día son estadísticamente diferentes

Figura 10. Valores de pH para las salchichas de cerdo cocinadas, durante el tiempo de almacenamiento.

Tabla 8. Valores de la pérdida por cocción de las salchichas de cerdo

Tratamiento	Pérdida por cocción (%)
5% miel	48.68±3.14
10% miel	45.66±4.32
100 ppm CAPE	47.90±4.29
200 ppm CAPE	43.74±5.40
BHT	44.72±5.41
Control	50.52±2.34



^{a-d} Literales diferentes en el mismo día son estadísticamente diferentes

Figura 11. Valores de TBARS para las salchichas de cerdo cocinadas, durante el tiempo de almacenamiento.

En la Figura 11 también se observa que el contenido de TBARS aumenta ($p < 0.05$) conforme avanza el tiempo en todos los tratamientos. Al inicio del almacenamiento (día 0) el CAPE fue el único que protegió a las salchichas de la oxidación de lípidos teniendo valores de TBARS promedio de 0.9324 ± 0.1325 mg de MA/ kg. Mientras que en el resto de los días se observa que, tanto la miel como el CAPE inhiben la oxidación de lípidos, obteniendo valores de TBARS menores a los de las salchichas control.

Comparando la efectividad de la miel y del CAPE como antioxidante con respecto a la del BHT, se encontró que la miel tiene un efecto antioxidante similar al de éste mientras que el CAPE es mejor antioxidante que el BHT y que la miel. Con respecto a los tratamientos con diferentes concentraciones de miel, no se encontraron diferencias significativas en los valores de TBARS de éstos, excepto en el día 4 en el que el tratamiento con 10% de miel tuvo un mejor efecto antioxidante que el que contenía 5% de miel.

El efecto que tuvieron las dos concentraciones de miel (5% y 10%) sobre los valores de TBARS en las salchichas de cerdo cocinadas en el día 4 también fue observado por Johnston *et al.* (2005) y Antony *et al.* (2000), quienes encontraron que a mayor concentración de miel los valores de TBARS disminuyeron en carne de res y pavo, respectivamente. Sin embargo, en el resto de los días, al igual que McKibben y Engeseth (2002), Dawson y Mathew (2000) no se encontraron diferencias significativas entre usar 5% y 10% de miel. Es importante resaltar que la miel es efectiva para reducir la oxidación de lípidos de salchichas de cerdo cocinadas, almacenadas a 2°C durante 16 días en condiciones de oscuridad. Por lo que la miel es un antioxidante natural que puede sustituir el uso de antioxidantes artificiales como el BHT.

La miel contiene varios componentes que pueden actuar como conservadores, y entre estos se incluyen flavonoides, ácido ascórbico, tocoferoles, compuestos fenólicos, productos de la reacción de Maillard, enzimas como glucosa oxidasa, catalasa y peroxidasa, todos juntos dan un efecto antioxidante sinérgico (Johnston *et al.*, 2005; Nagai *et al.*, 2001). La presencia de productos de la reacción de Maillard son un factor importante en productos cocinados, debido a que la cocción acelera su formación (Johnston *et al.*, 2005). Vasavada y Cornforth (2006) propusieron que la actividad antioxidante de los PRM se debe a la reducción de hidroperóxidos, inactivación de radicales libres formados durante la degradación oxidativa de los ácidos grasos insaturados, secuestro de oxígeno y quelación de iones de metales pesados.

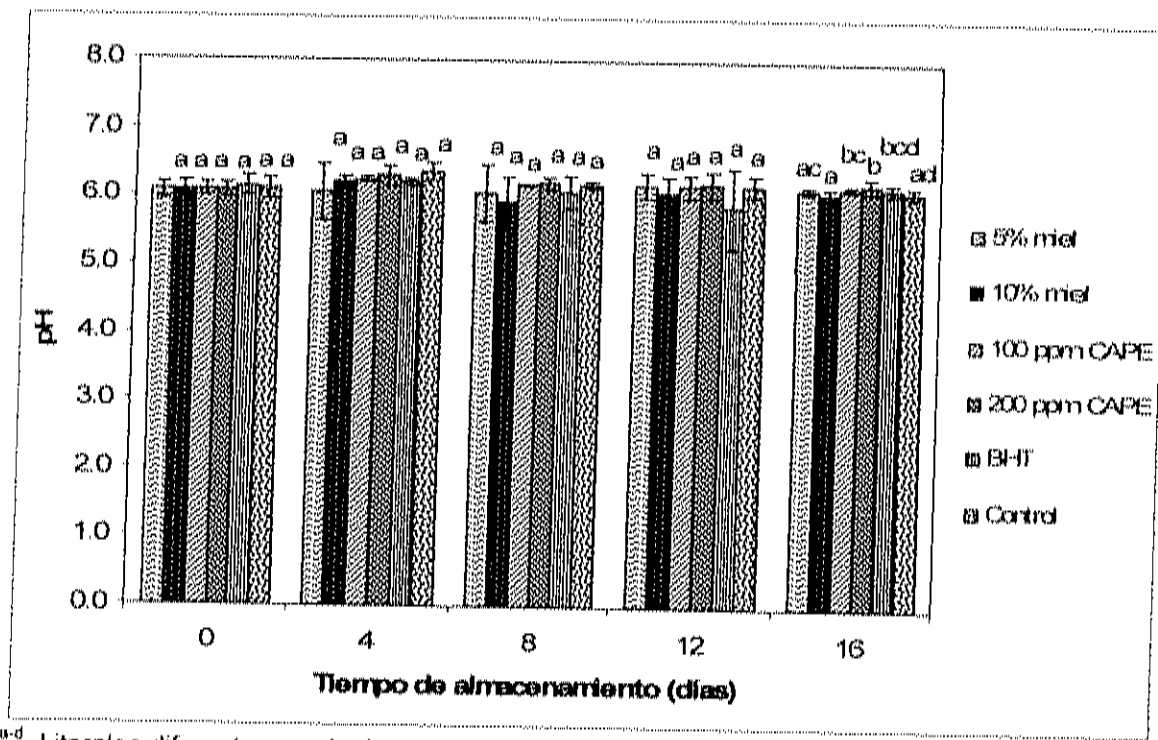
Con respecto a la actividad antioxidante del CAPE, en la Figura 11 se observa que no se encontraron diferencias entre las dos concentraciones de CAPE excepto en el día 12 en el que se observó que a mayor concentración hubo una mejor actividad antioxidante. Es importante recalcar que éste es el primer estudio en el que se evalúa la capacidad antioxidante del CAPE en un producto cárnico cocinado. Sin embargo, Chen y Ho (1997) evaluaron la capacidad antioxidante del CAPE utilizando grasa de cerdo y encontraron que el CAPE tuvo una capacidad antioxidante mayor a la de BHT, el mismo efecto se observó en este trabajo experimental. El CAPE al ser un compuesto polifenólico tiene la capacidad de donar sus grupos hidroxilos para estabilizar a los hidroperóxidos e inhibir la oxidación de lípidos. Chen y Ho (1997), mencionan que la presencia de un segundo grupo hidroxilo en la posición *orto* o *para* incrementan la actividad antioxidante debido a la estabilización por resonancia. Esto explica porque el CAPE es un mejor antioxidante que el BHT.

Salchichas sin Cocinar

pH. Los valores de pH para las salchichas sin cocinar se muestran en la Figura 12, estos mantuvieron un promedio de 6.14 ± 0.22 para todos los tratamientos durante los primeros 12 días de almacenamiento. En el día 16 se encontraron diferencias entre tratamientos, siendo el pH de las salchichas con 10% de miel, menor (6.08 ± 0.07) a los tratamientos con CAPE y BHT (6.19 ± 0.08 y 6.16 ± 0.07); sin embargo, entre estos dos últimos no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Martínez *et al.* (2006) reportaron que el pH de salchichas frescas de puerco empacadas en emplayado y almacenadas a $2 \pm 1^\circ\text{C}$, superó el valor de 6.0 en el día 12 de almacenamiento, el cual se incrementó hasta alcanzar un valor de 7.0 en el día 16. El valor de pH promedio de las salchichas de cerdo sin cocinar (6.14 ± 0.22) estuvo dentro del rango reportado por Martínez *et al.* (2006) durante todo el tiempo de almacenamiento, sin embargo, en el presente estudio no se observó incremento en el pH.

Comparando el pH de las salchichas cocinadas con el de las salchichas sin cocinar, estadísticamente si se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$). Las salchichas cocinadas presentaron un mayor valor de pH (6.27 ± 0.14) que las salchichas sin cocinar (6.14 ± 0.22). Posiblemente esto se deba a la protonación de algunos aminoácidos básicos terminales, los cuales se ven expuestos debido a la desnaturalización de las proteínas durante la cocción (Morin *et al.*, 2002).



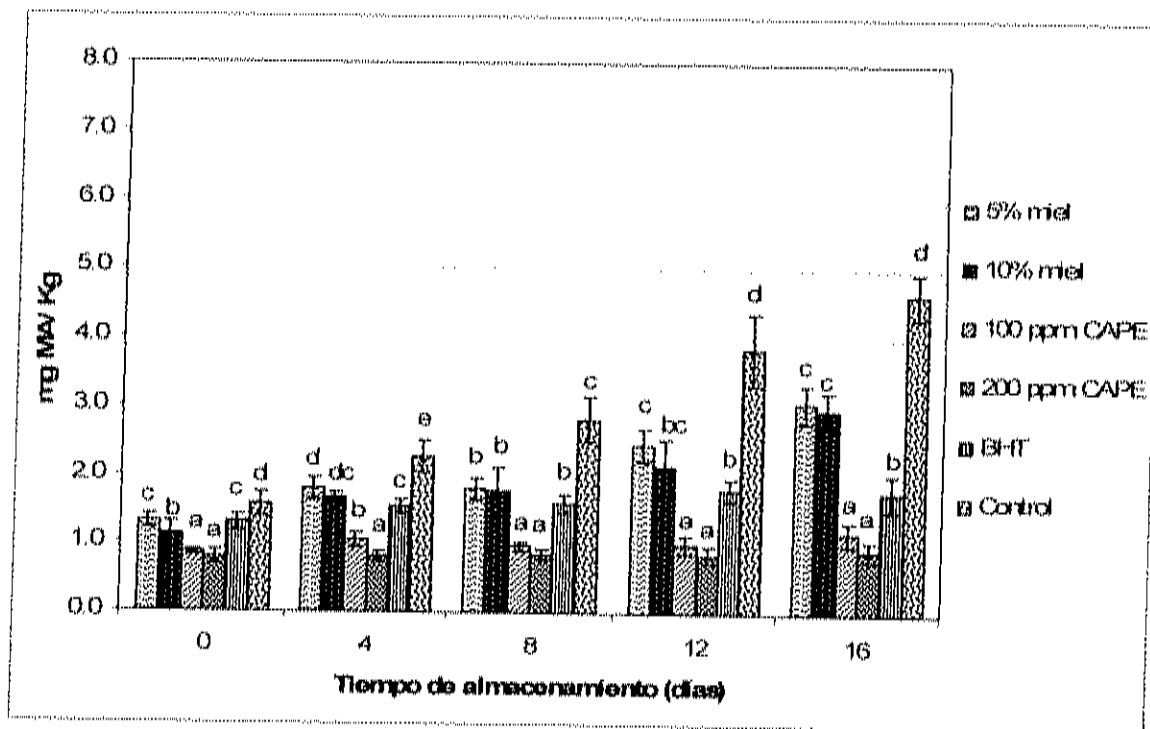
^{a-d} Literales diferentes en el mismo día son estadísticamente diferentes

Figura 12. Valores de pH para las salchichas de cerdo sin cocinar, durante el tiempo de almacenamiento.

TBARS. En la Figura 13 se muestran los valores de TBARS para las salchichas de cerdo frescas, en ésta se observa que desde el día 0, la miel, el CAPE y el BHT, cumplieron con su actividad antioxidante. Además se observa que los valores de TBARS aumentaron conforme avanzó el tiempo de almacenamiento en los tratamientos con miel, BHT y control. Mientras que en los tratamientos con CAPE hay una inhibición en la oxidación, manteniendo valores de TBARS alrededor de 0.93 ± 0.12 mg MA/ Kg durante todo el tiempo de almacenamiento.

La concentración de miel no tuvo un efecto en su actividad antioxidante en las salchichas crudas ya que no se encontró diferencia significativa entre 5% y 10%. Este mismo efecto lo observaron Antony *et al.* (2000), quienes no encontraron diferencias entre 1%, 5%, 10%, 15% y 20% de miel en pechuga de pavo molida cruda. Cabe resaltar que la miel tuvo un efecto antioxidante similar al del BHT hasta el día 12. En el día 16 se observa que la miel muestra valores de TBARS menores al control pero mayores al BHT. Hasta el momento este es el primer estudio en el que evalúa la capacidad antioxidante de la miel de abeja en un producto de cerdo, y que se compara con la del BHT.

Anteriormente, se comentó que en las salchichas cocinadas la formación de productos de la reacción de Maillard fue a lo que más se atribuyó la actividad antioxidante de la miel, debido a que la cocción favorecía su formación. Aunque en este caso, en las salchichas sin cocinar la actividad antioxidante de la miel se puede atribuir en mayor medida a los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en la miel. La actividad antioxidante de los flavonoides se debe a que estos pueden quelar metales pesados y secuestrar radicales libres de especies de oxígeno reactivas (Pedrielli y Skibsted, 2002). Mientras que los compuestos polifenólicos (como el ácido caféico y el CAPE) además de quelar metales y secuestrar especies de oxígeno reactivas, también pueden inhibir enzimas prooxidantes (Amorati *et al.*, 2006).



^{a-d} Literales diferentes en el mismo día son estadísticamente diferentes

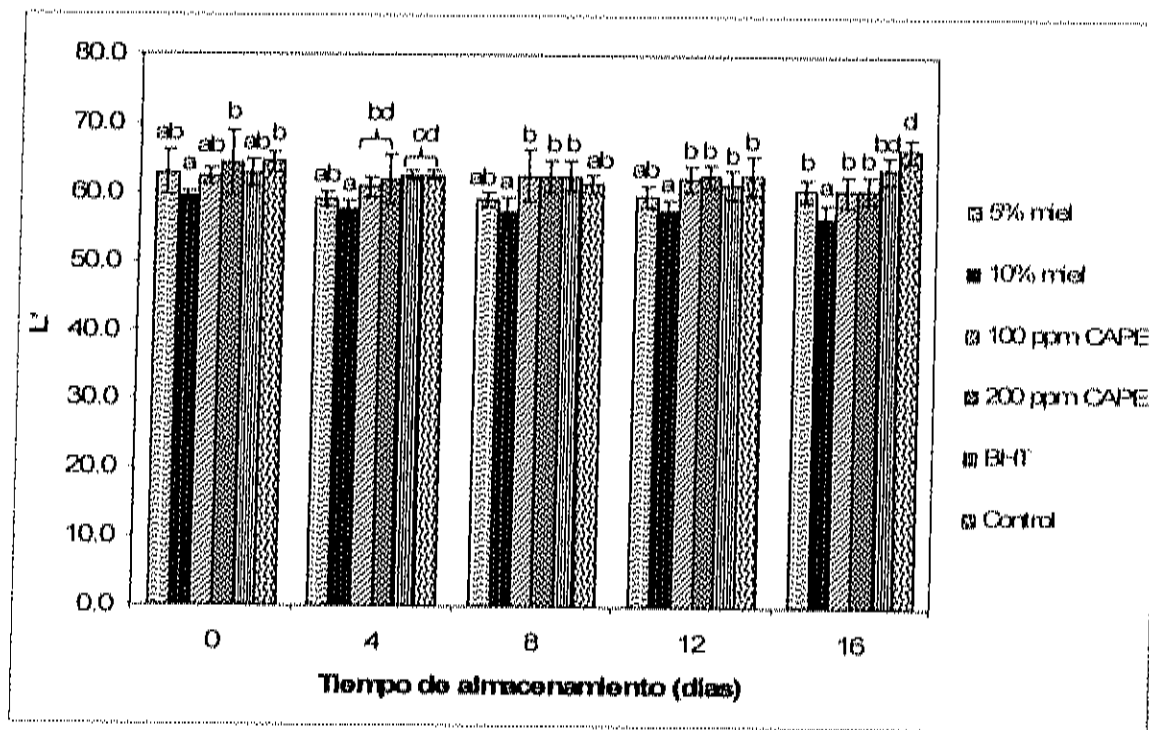
Figura 13. Valores de TBARS para las salchichas de cerdo sin cocinar, durante el tiempo de almacenamiento.

Con respecto a la actividad antioxidante del CAPE se observa que es mejor antioxidante que la miel y que el BHT. Además, para este caso, su actividad antioxidante fue independiente de la concentración, es decir, no hubo diferencia significativa entre 100 ppm y 200 ppm durante todo el tiempo de almacenamiento. En las salchichas cocinadas también se encontró que el CAPE es mejor antioxidante que BHT, lo que concuerda con lo reportado por Chen y Ho (1997), quienes encontraron que al probar la efectividad antioxidante de CAPE y BHT junto con otros ácidos hidroxycinámicos, CAPE presentó mayor capacidad para inhibir la oxidación de lípidos en grasa de cerdo.

De acuerdo a Martínez *et al.* (2007), el nivel máximo de oxidación aceptado en salchichas de cerdo frescas es 1.5 mg MA/ Kg, por lo cual, los resultados de este trabajo de investigación muestran que las salchichas con CAPE nunca alcanzaron ese nivel de oxidación, teniendo al final del almacenamiento un valor de TBARS de 1.05 ± 0.20 mg MA/ Kg. Mientras que las salchichas con BHT lo alcanzaron en el día 4, con miel entre los días 0-4, y las salchichas control desde el día 0.

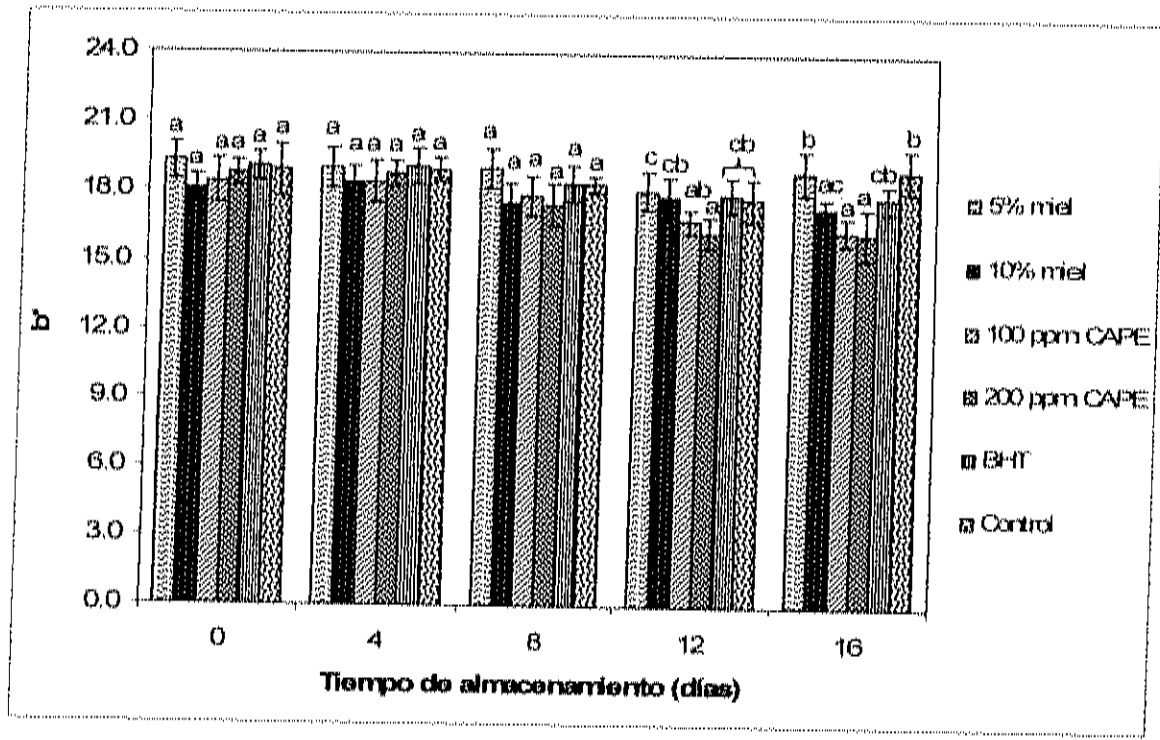
Color. Con respecto a los parámetros de color L* (luminosidad, Figura 14) y b* (índice amarillo, Figura 15) no se observó ninguna tendencia marcada, durante el almacenamiento, contrario a lo que sucedió con a* (índice de color rojo). Los valores de a* se muestran en la Figura 16, y se observa que disminuyeron conforme avanzó el tiempo para todos los tratamientos ($p < 0.05$).

En los primeros 8 días el valor de a* no se vio afectado por el tiempo, para todos los tratamientos. Al inicio del almacenamiento no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, teniendo un valor de a* promedio de 13.23 ± 1.66 . El cual se encontró a partir del día 12 con diferencias significativas



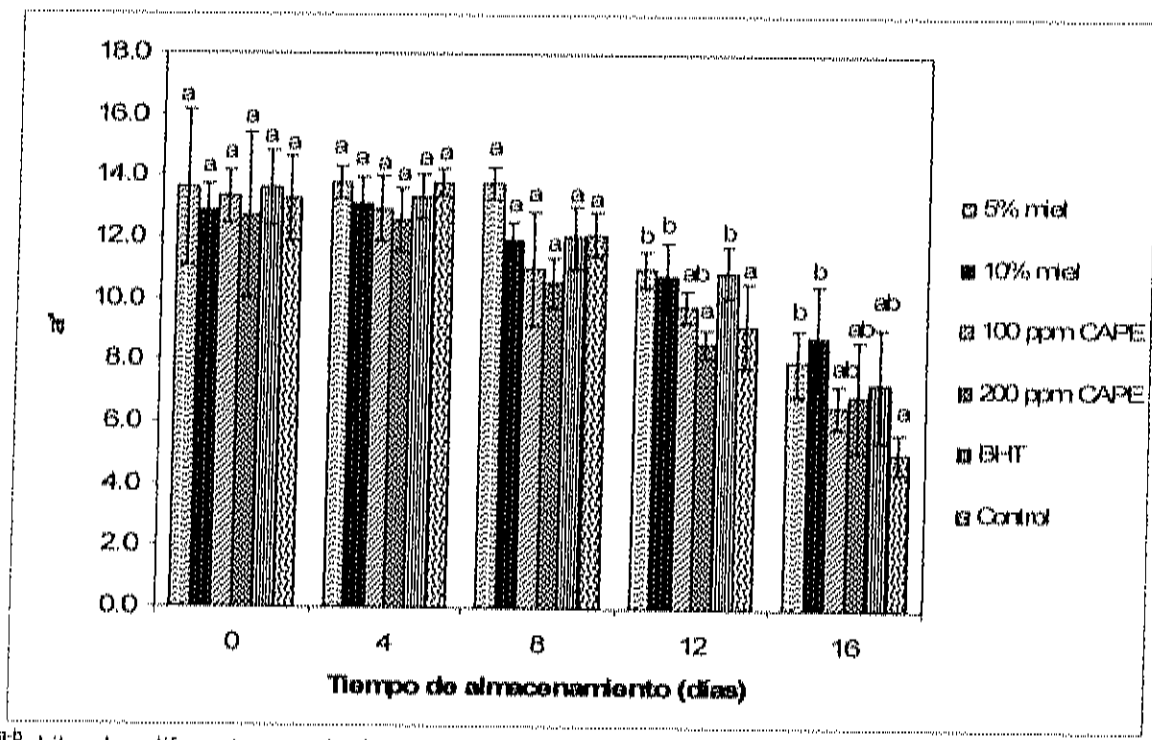
*-d Literales diferentes en el mismo día son estadísticamente diferentes

Figura 14. Valores de L* para las salchichas de cerdo sin cocinar.



^{a-c} Literales diferentes en el mismo día son estadísticamente diferentes

Figura 15. Valores de b^* para las salchichas de cerdo sin cocinar.



^{a-b} Literales diferentes en el mismo día son estadísticamente diferentes

Figura 16. Valores de a* para las salchichas de cerdo sin cocinar.

($p < 0.05$) entre los tratamientos; las salchichas con miel y con BHT presentaron valores de a^* mayores que las salchichas control y que las salchichas con 200 ppm de CAPE. En el día 16 se observó que sólo las salchichas con miel tuvieron valores de a^* mayores que las control. Las salchichas control al final del almacenamiento tuvieron un valor de a^* promedio de 5.07 ± 0.61 , mientras que las salchichas con 5% y 10% de miel mostraron valores de 7.99 ± 1.07 y 8.82 ± 1.67 , valores respectivamente, sin embargo entre las dos concentraciones de miel no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$).

Con respecto al valor inicial mostrado en las salchichas de cerdo frescas, se observa que este valor es alto en comparación a los valores iniciales de a^* reportados por Martínez *et al.* (2006) y Martínez *et al.* (2007) quienes al inicio de su almacenamiento reportaron un valor de a^* de 7.0, mientras que al final del almacenamiento (20 y 16 días) reportaron un valor de 3.8 y 1, respectivamente. Esto pone de manifiesto que el pH tiene un efecto significativo sobre el color, ya que en nuestro trabajo las salchichas tuvieron un pH inicial de 6.10 ± 0.12 mientras que en los trabajos de Martínez *et al.* (2006; 2007) tuvieron un pH inicial de 5.5-5.8.

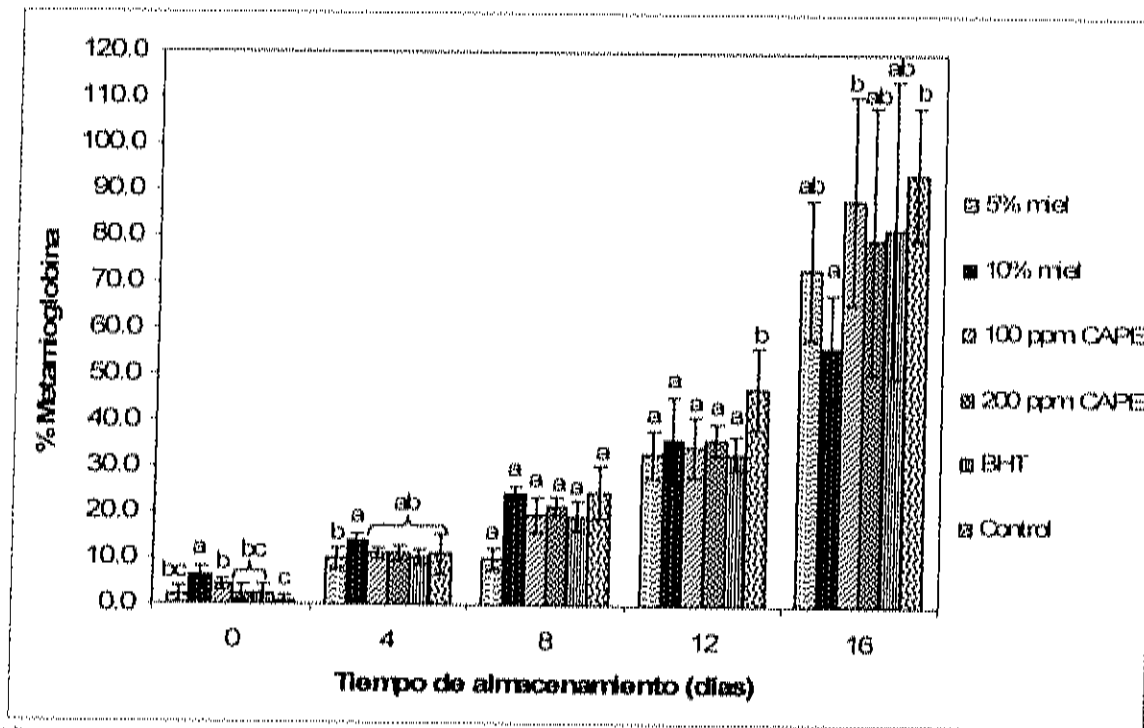
El efecto que tiene el tiempo sobre el valor a^* o índice de color rojo también fue observado por Sebranek *et al.* (2005), Martínez *et al.* (2006) y Martínez *et al.* (2007) en salchichas de cerdo frescas, es decir, ellos también observaron una disminución de a^* conforme avanzaba el tiempo de almacenamiento. Esto se debe a que las salchichas estuvieron expuestas al oxígeno, y hubo una oxidación del pigmento oximioglobina (rojo brillante) a metamioglobina (café), y por lo tanto una disminución del Índice de color rojo. En la sección siguiente se muestran resultados sobre la formación de metamioglobina, los cuales tuvieron un comportamiento contrario al índice de color rojo o valor a^* .

Comparando los efectos que tuvieron la miel y el CAPE sobre el color rojo de las salchichas de cerdo frescas, se observa que la miel permite conservar mejor el color rojo que el CAPE, por lo tanto, se observa que la miel al ser soluble en agua puede retardar la oxidación de la oximioglobina, mientras que el CAPE (insoluble en agua) inhibe la oxidación de lípidos y no tiene un efecto sobre el color de las salchichas frescas de cerdo.

Porcentaje de metamioglobina. En la Figura 17 se muestran los valores de formación de metamioglobina (%). En ésta se observa que la cantidad de metamioglobina en las salchichas sin cocinar aumenta ($p < 0.05$) conforme avanza el tiempo para todos los tratamientos. Como ejemplo tenemos a las salchichas control, las cuales iniciaron con un porcentaje de metamioglobina promedio de 0.87 ± 1.04 y terminaron con un porcentaje de 93.86 ± 14.43 .

Durante los primeros 8 días de almacenamiento no se encontró diferencia significativa en la cantidad de metamioglobina entre tratamientos. Fue a partir del día 12 en el que se observó que la miel, el CAPE y el BHT retrasaron la formación de metamioglobina, en comparación a las salchichas control; sin embargo, no se encontraron diferencias entre las salchichas con diferente antioxidante. Al final del almacenamiento (día 16) se observó que solo las salchichas con 10% de miel fueron diferentes a las salchichas control, retrasando la formación de metamioglobina con un porcentaje de metamioglobina promedio de 56.27 ± 11.49 .

Tomando en consideración lo reportado por Martínez *et al.* (2006), quienes encontraron que el límite de aceptación, para salchichas de cerdo frescas, es un porcentaje de metamioglobina entre 11-20%, todas las salchichas de cerdo frescas tendrían una vida de anaquel de 8 días. Sin embargo, Djenane *et al.* (2002) reportaron que entre el 30-40% de formación de



^{a,b} Literales diferentes en el mismo día son estadísticamente diferentes

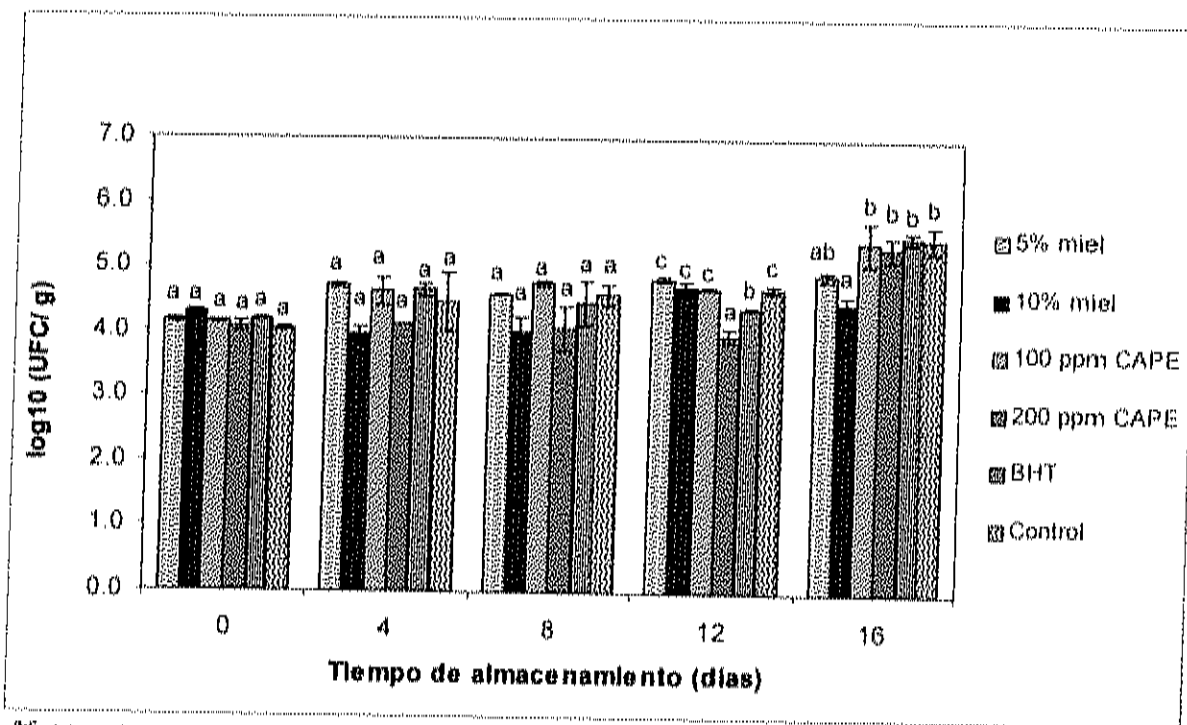
Figura 17. Porcentajes de metamioglobina para las salchichas de cerdo sin cocinar.

metamioglobina fue necesario para causar una decoloración relevante en la carne de vacuno, así todas las salchichas con antioxidante tendrían una vida de anaquel de 12 días mientras que las control tendrían una vida de anaquel de 8 días. Sin embargo, es necesario conocer la calidad microbiológica de las salchichas para poder determinar la vida de anaquel de las salchichas, resultados que se muestran en la siguiente sección.

Evaluación de la Capacidad Antimicrobiana de la Miel y del CAPE en las Salchichas de Cerdo para Desayuno.

Salchichas Cocinadas

Mesófilos aerobios. En la Figura 18 se muestra la cuenta total de mesófilos aerobios en las salchichas de cerdo cocinadas, donde se observa una carga inicial promedio de $4.15 \pm 0.09 \log_{10}$ UFC/g para todos los tratamientos. También se observa que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre tratamientos hasta el día 12, indicando que las salchichas con 200 ppm de CAPE tuvieron el conteo más bajo ($p < 0.05$); sin embargo, en el día 16 presentan un conteo similar al de las salchichas control. Al final del almacenamiento se observa que sólo las salchichas con miel fueron las que mostraron conteos diferentes a las salchichas control. Cabe resaltar que tanto en las salchichas con 5% de miel como las de 10% de miel, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los conteos de los diferentes días de almacenamiento. Además, tampoco se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la capacidad antimicrobiana entre estas dos concentraciones, manteniendo conteos de 4.64 ± 0.28 y $4.29 \pm 0.30 \log_{10}$ UFC/g, respectivamente, durante todo el tiempo de almacenamiento.



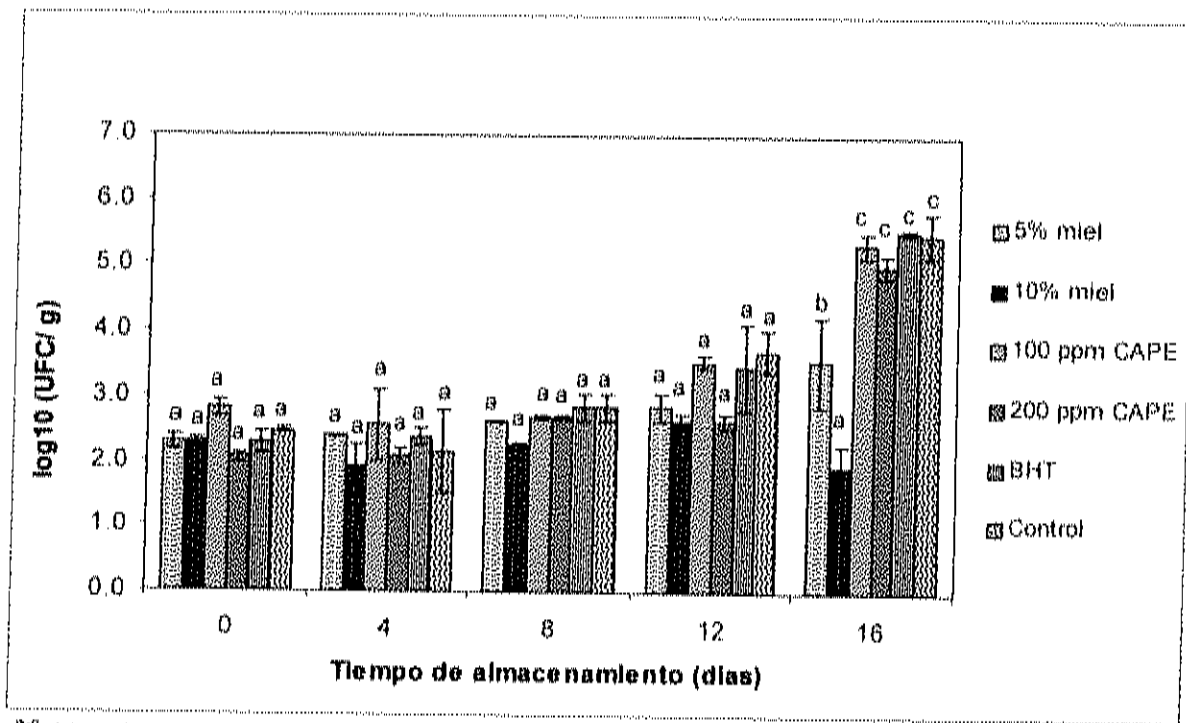
^{a-c} Literales diferentes en el mismo día son estadísticamente diferentes

Figura 18. Cuenta total de mesófilos aerobios en las salchichas de cerdo cocinadas.

Con respecto a los tratamientos con CAPE, BHT y control, al final del almacenamiento no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), teniendo un conteo promedio de $5.43 \pm 0.18 \log_{10}$ UFC/g. Considerando que la NOM-034-SSA1-1993 establece que el límite máximo permisible para carne molida es 5×10^6 UFC/g lo que equivale a $6.7 \log_{10}$ UFC/g, todas las salchichas cocinadas después de los 16 días de almacenamiento fueron consideradas aptas para consumo humano.

Psicrótrofos aerobios. En la Figura 19 se muestran los conteos totales de bacterias psicrótrofas para las salchichas de cerdo cocinadas. El conteo inicial promedio para todos los tratamientos fue de $2.38 \pm 0.26 \log_{10}$ UFC/g. En la misma figura se observa que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en el conteo de psicrótrofos entre tratamientos hasta el día 16, en el que las salchichas con miel mostraron los conteos más bajos en comparación al resto de los tratamientos. Las salchichas con CAPE y con BHT tuvieron conteos estadísticamente iguales ($p > 0.05$) a las salchichas control en el día 16. Con respecto a las dos concentraciones de miel, en el día 16 se observa que las salchichas con 10% de miel tuvieron conteos menores ($p < 0.05$) que las salchichas con 5% de miel.

Es importante resaltar que el 10% de miel inhibió el crecimiento de psicrótrofos en las salchichas cocinadas, ya que los conteos a lo largo del tiempo de almacenamientos permanecieron iguales estadísticamente, alrededor de $2.21 \pm 0.32 \log_{10}$ UFC/g. Mientras 5% de miel retardó el crecimiento de psicrótrofos teniendo un conteo de $3.55 \pm 0.69 \log_{10}$ UFC/g, en comparación a las salchichas control que tuvieron un conteo de $5.48 \pm 0.33 \log_{10}$ UFC/g, al final del almacenamiento.



^{a-c} Literales diferentes en el mismo día son estadísticamente diferentes

Figura 19. Cuenta total de psicrótrofos aerobios en las salchichas de cerdo cocinadas.

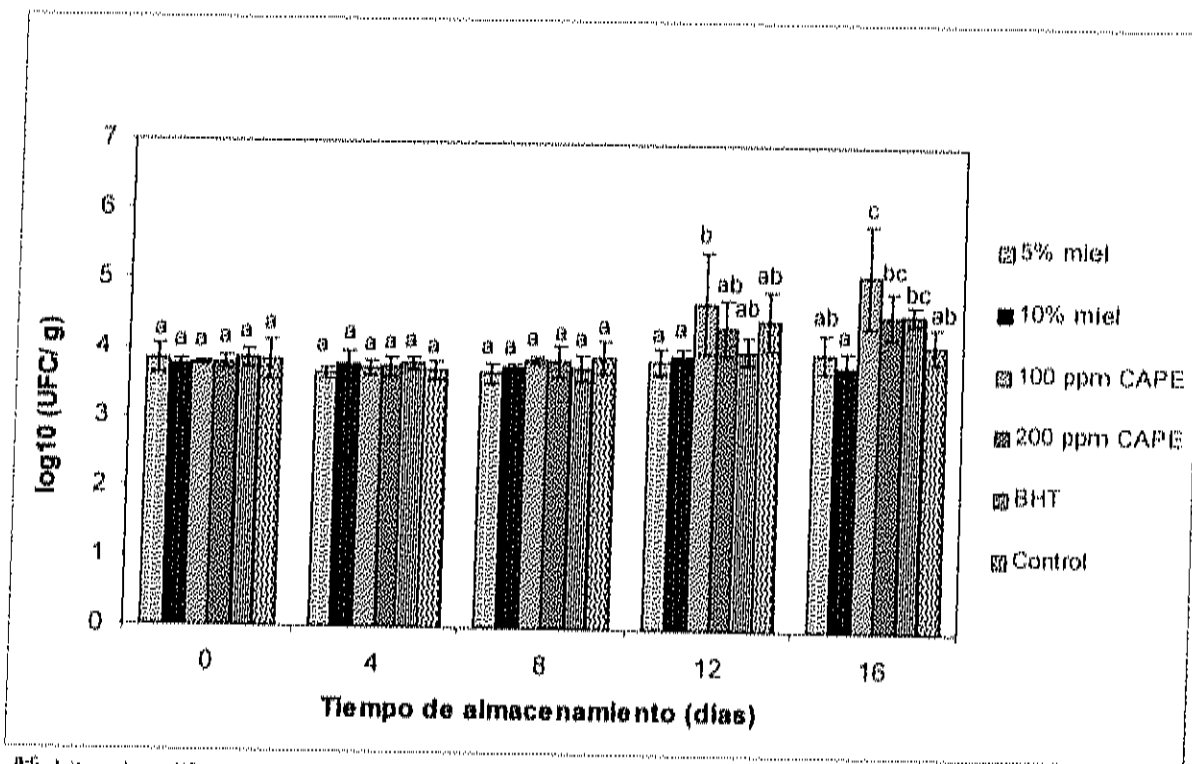
Hasta el momento no hay estudios en los que se haya probado la actividad antibacteriana de la miel y de CAPE en un producto cárnico cocinado; la efectividad como antimicrobianos sólo se ha probado *in vitro*. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo experimental la miel es un muy buen antibacteriano, mientras que el CAPE resulta ser muy efectivo como antioxidante, incluso más que la miel, pero no muestra un efecto antibacteriano.

Salchichas sin Cocinar

Mesófilos aerobios. En la Figura 20 se muestran las cargas promedio totales de los mesófilos aerobios para las salchichas de cerdo sin cocinar. En ésta se puede observar que éstos se mantuvieron alrededor de $3.79 \pm 0.15 \log_{10}$ UFC/g hasta el día 8 para todos los tratamientos. A partir del día 12 se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos, obteniendo 5% y 10% de miel conteos menores a 100 ppm de CAPE, pero iguales al control. En general en las salchichas sin cocinar no se observó inhibición del crecimiento de mesófilos aerobios por la adición de miel, CAPE o BHT, tomando como referencia a las salchichas control.

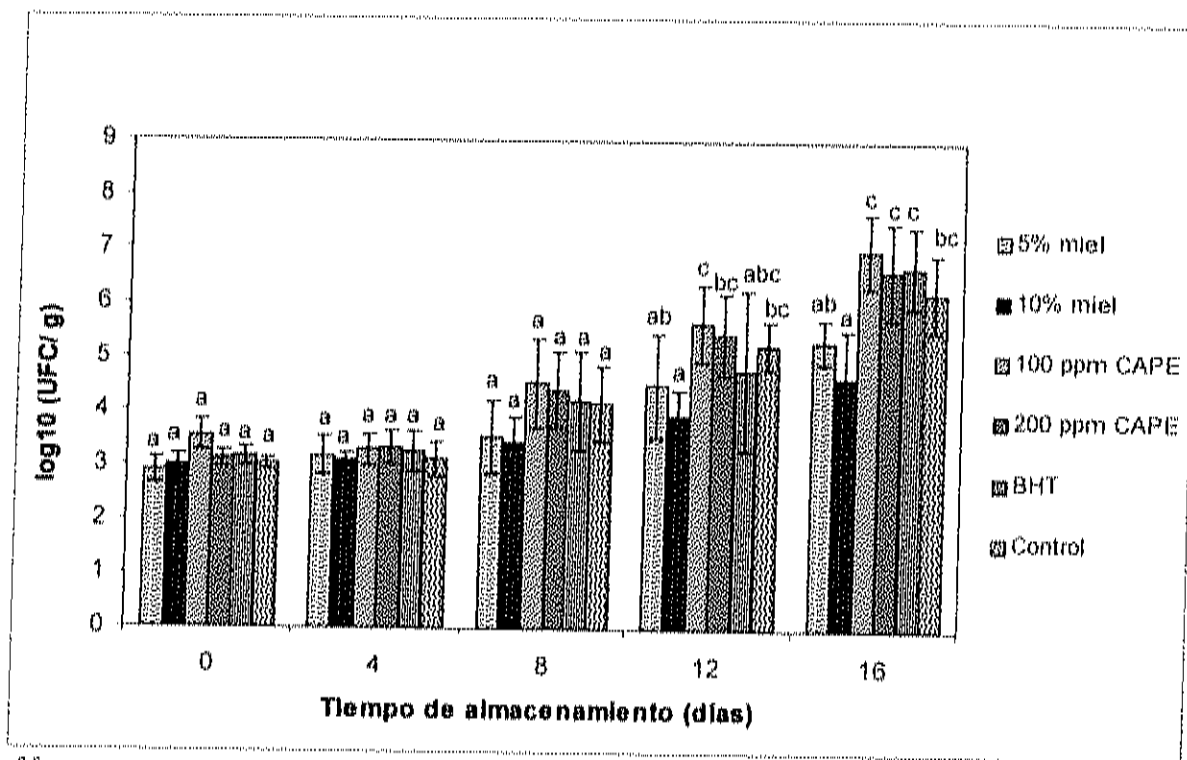
Con respecto al efecto del tiempo sobre la carga de mesófilos aerobios, solo se observó en los tratamientos con CAPE, ya que los valores iniciales fueron menores a los conteos finales. Al final del almacenamiento el tratamiento con 100 ppm de CAPE mostró conteos más altos que el control, teniendo conteos de 5.12 ± 0.73 y $4.14 \pm 0.25 \log_{10}$ UFC/g, respectivamente. El resto de los tratamientos tuvo conteos similares al control.

Psicrótrofos aerobios. En la Figura 21, se muestra el desarrollo de la población total de psicrótrofos aerobios en salchichas de cerdo sin cocinar; en



^{a-c} Literales diferentes en el mismo día son estadísticamente diferentes

Figura 20. Cuenta total de mesófilos aerobios en las salchichas de cerdo sin cocinar.



^{a-c} Literales diferentes en el mismo día son estadísticamente diferentes

Figura 21. Cuenta total de psicrótrofos aerobios en las salchichas de cerdo sin cocinar.

la que se observa que no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) en la carga psicrótrofa inicial teniendo un valor promedio de $3.13\pm 0.28 \log_{10}$ UFC/g. También se observa que aumentó conforme avanzó el tiempo para todos los tratamientos, para el caso de las salchichas control los conteos alcanzaron $6.23\pm 0.72 \log_{10}$ UFC/g.

Con respecto al efecto de los tratamientos sobre la población de psicrótrofos aerobios en las salchichas sin cocinar, se observa que fue hasta el día 12 en el que se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) entre tratamientos, obteniéndose que en el tratamiento con 10% de miel los conteos resultaron menores al control y a las dos concentraciones de CAPE.

Al final del almacenamiento se observa que sólo las salchichas con 10% de miel tuvieron cuentas bacterianas menores que las salchichas control, teniendo un conteo de $4.64\pm 0.41 \log_{10}$ UFC/g. Mientras que el resto de los tratamientos alcanzaron conteos estadísticamente iguales al control. Comparando los conteos de las dos concentraciones de CAPE con las dos concentraciones de miel, se observa que las dos concentraciones de miel retardan el crecimiento microbiano en comparación a las dos de CAPE. También se observa que las salchichas con miel no alcanzan el límite máximo de aceptabilidad en carne de $7 \log_{10}$ UFC/g (Kilsby, 1982), mientras que las salchichas control, con BHT y con CAPE, si mostraron conteos por encima de $7 \log_{10}$ UFC/g en el último día de almacenamiento.

Al igual que en las salchichas cocinadas la miel tiene un efecto antimicrobiano en las salchichas sin cocinar; sin embargo, no se encontró un efecto antimicrobiano del CAPE tanto en las salchichas cocinadas como en las sin cocinar. Nagai *et al.*, (2006) evaluaron la efectividad antibacteriana de algunas mieles con origen floral diferente en filetes crudos de res, puerco, pollo

y pescado, los cuales fueron sumergidos en una solución 5% (v/v) durante 30 min a 10°C, posteriormente los sacaron de la solución y los almacenaron a 10°C durante 7 días. Ellos encontraron que todas las mieles inhibieron el crecimiento bacteriano y no encontraron diferencias significativas entre ellas. Estos autores atribuyeron este efecto de la miel a su alto contenido de azúcar (efecto higroscópico) y al contenido de peróxido de hidrógeno, ya que White (1975) encontró que el efecto bactericida de la miel se debe a la acumulación de peróxido de hidrógeno producido por la enzima glucosa oxidasa presente en la miel de manera natural.

Esta actividad antibacteriana también es atribuida a los diferentes componentes de la miel derivados de la fuente floral (Molan y Russell, 1988). Weston *et al.* (1999) comprobaron que los compuestos fenólicos presentes en la miel de "manuka", son parcialmente responsables de la actividad antibacteriana. Por lo tanto, puede concluirse que la actividad antibacteriana de la miel es el resultado de la acción sinérgica entre el peróxido de hidrógeno y los compuestos fenólicos de la miel (ácidos fenólicos y flavonoides).

Cuantificación del CAPE en las Salchichas de Cerdo

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de CAPE tanto en las salchichas cocinadas como en las salchichas sin cocinar. En esta tabla se observa que en la mayoría de los datos la desviación estándar fue alta. En las salchichas cocinadas el coeficiente de variación llegó a ser del 70%, mientras que en las salchichas sin cocinar el máximo fue del 46%; y considerando que experimentalmente se acepta un coeficiente de variación máximo del 15% los resultados no fueron sometidos a un análisis estadístico. Sin embargo, como era de esperarse el contenido de CAPE en las salchichas

Tabla 9. Cuantificación de CAPE en salchichas de cerdo sin cocinar y cocinadas durante su almacenamiento.

Tratamientos		Días de almacenamiento				
		0	4	8	12	16
Cocinadas	100 ppm	56.88 ±5.01	60.07 ±28.17	54.76 ±38.08	38.25 ±8.47	54.12 ±23.37
	200 ppm	130.61 ±45.22	121.90 ±22.80	123.08 ±27.76	154.61 ±72.24	89.36 ±34.16
Crudas	100 ppm	50.09 ±10.74	40.62 ±4.32	42.28 ±11.91	44.53 ±19.19	24.20 ±7.36
	200 ppm	87.30 ±8.00	91.34 ±31.18	97.65 ±44.53	67.78 ±9.24	62.57 ±22.94

con 100 ppm fue menor que el de las salchichas con 200 ppm, tanto en aquellas sin cocinar como en las cocinadas.

Aunque en este trabajo experimental no se pudieron establecer diferencias cuantitativas entre los días de almacenamiento, si se logró extraer el CAPE y se pudo observar una diferencia en el comportamiento de los cromatogramas al inicio y al final del almacenamiento.

En la Figura 22 se muestran los cromatogramas de la extracción del CAPE en salchichas sin cocinar con 100 ppm obtenidos en el día 0 y 16 de almacenamiento. En esta figura se observa que en el día 16 el pico de CAPE disminuye su altura en comparación al día 0, también se observa que el pico identificado como (1) aumenta de altura, mientras que los picos (2) y (3) disminuyen; estos dos últimos picos al parecer están relacionados con la concentración del CAPE en la muestra, ya que presentan el mismo comportamiento que el pico del CAPE, en el día 16. Con respecto al pico (1) éste representa al ácido caféico y alcohol fenilico, que son los compuestos que forman la molécula del CAPE. Esta aseveración se establece debido a que se corrieron estándares de ácido caféico y alcohol fenilico, los cuales eluyeron en el rango de 1.08-1.21 minutos, que es el rango en el que sale el pico (1).

En la Figura 23 se observan los cromatogramas de la extracción del CAPE en salchichas de cerdo cocinadas obtenidos en el día 0 y 16 de almacenamiento. En esta figura se observa que la altura del pico del CAPE disminuyó en el día 16 en comparación al día 0, mientras que el pico (1) tuvo un ligero aumento. Los picos (2) y (3), al igual que en las salchichas crudas parecen estar relacionados con la concentración de CAPE en la muestra debido a que tienen el mismo comportamiento que el pico del CAPE. Es importante hacer notar que estos cromatogramas ponen en evidencia que el CAPE sigue

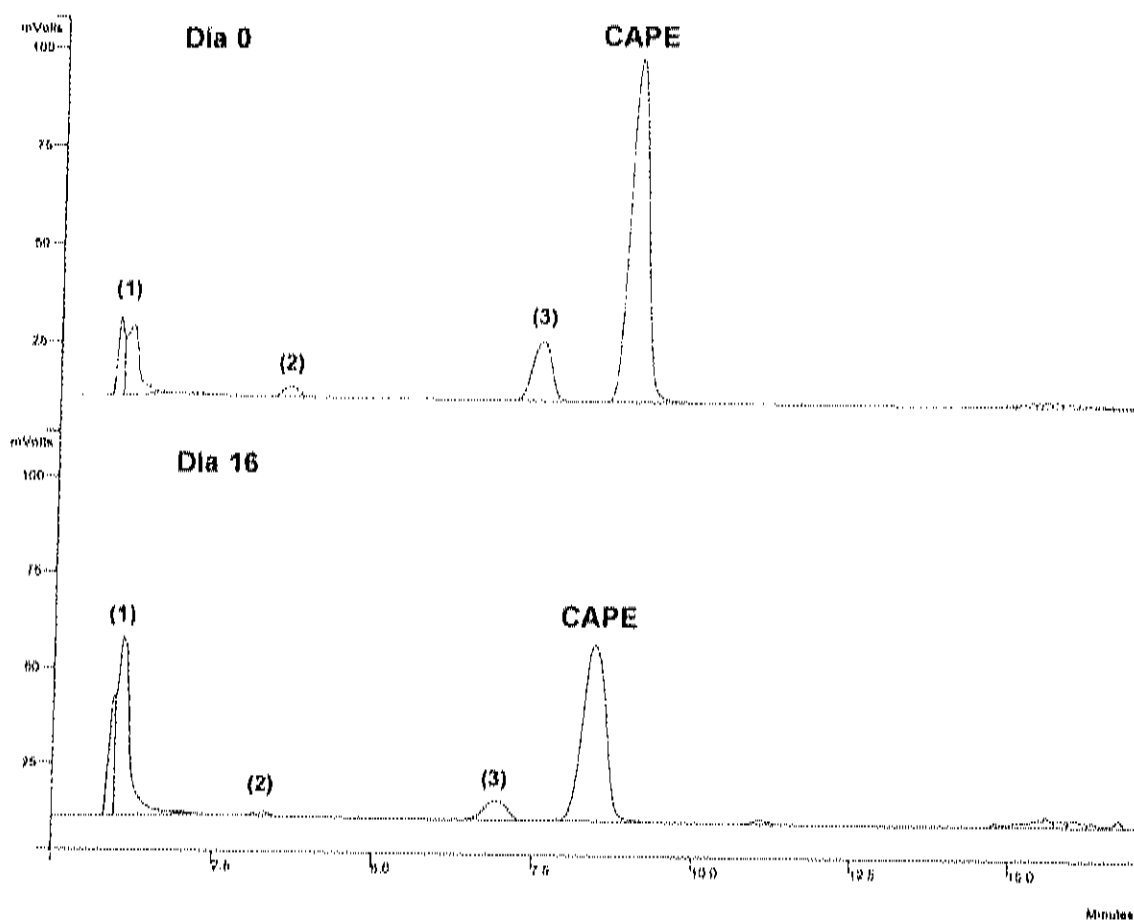


Figura 22. Cromatogramas de la cuantificación de CAPE en salchichas sin cocinar con 100 ppm (340 nm).

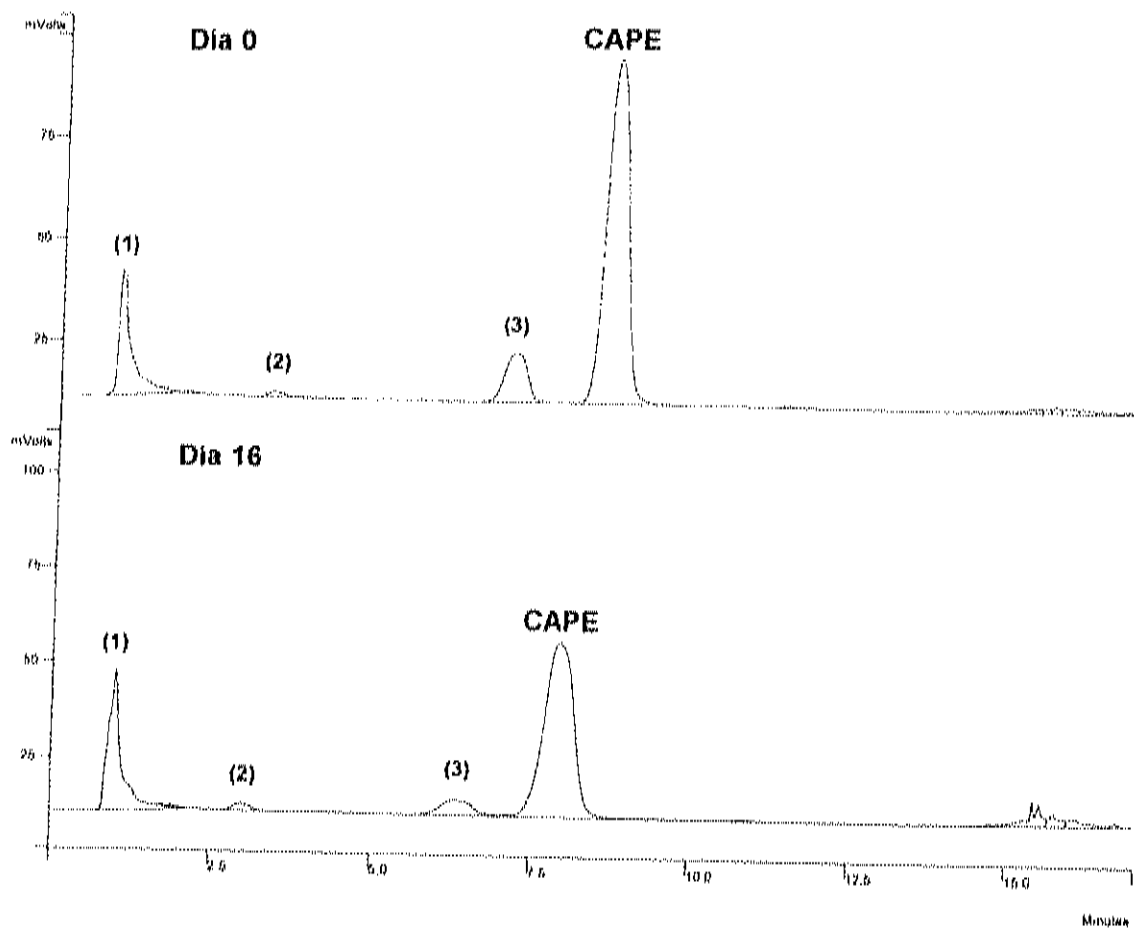


Figura 23. Cromatogramas de la cuantificación de CAPE en salchichas de cerdo cocinadas con 100 ppm (340 nm).

presente en las salchichas después del proceso de cocción (71°C), manifestando de esta manera su estabilidad térmica.

Comparando los cromatogramas de las salchichas sin cocinar con las cocinadas se observa que la única diferencia fue la forma del pico (1), ya que en las salchichas sin cocinar se observa una partición de este, mientras que en las cocinadas no sucede esto.

CONCLUSIONES

La miel de abeja utilizada en este trabajo fue clasificada como una miel monofloral de mezquite. Los compuestos fenólicos identificados y cuantificados en la miel fueron ácido caféico, miricentina, luteolina, kaempferol, apigenina, pinocembrina, crisina, galangina, CAPE y acacetina.

La miel de abeja y el CAPE retardan la oxidación de lípidos, siendo el CAPE más efectivo que la miel, tanto en producto sin cocinar como en cocinado.

Con respecto al efecto de la miel y del CAPE sobre el color de las salchichas crudas, con el uso del 10% de miel se permitió conservar mejor el color rojo de las salchichas; obteniéndose valores mayores de a^* y menor formación de metamioglobina, mientras que el CAPE no tiene un efecto protector marcado sobre el color de las salchichas sin cocinar.

La miel inhibe el crecimiento de mesófilos y psicrótrofos aerobios, teniendo más efecto sobre los psicrótrofos, mientras que el CAPE no presenta actividad antibacteriana en salchichas de cerdo cocinadas y sin cocinar.

La extracción del CAPE en las salchichas de cerdo se logró aunque con un bajo rendimiento, por lo que es necesario realizar más estudios sobre la metodología de extracción, para poder tener reproducibilidad en la cuantificación del CAPE.

REFERENCIAS

- Al-Mamary M., Al-Meerri A., y Al-Habori M. (2002) Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research* 22, 1041-1047.
- Amorati R., Pedulli G.F., Cabrini L., Zambonin L. y Landi L. (2006) Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic acid and other phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2932-2937.
- Andjelković M., Van Camp J., De Meulenaer B., Depaemelaere G., Socaciu C., Verloo M. y Verhe R. (2006) Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry* 98, 23-31.
- Antony S., Rieck J.R. y Dawson P.L. (2000) Effect of dry honey on oxidation in turkey breast meat. *Poultry Science* 79, 1846-1850.
- Antony S., Han I.Y., Rieck J.R., Dawson P.L. (2002) Antioxidative effect of maillard reaction products added to turkey meat during heating by addition of honey. *Journal of Food Science* 67 (5), 1719-1723.
- AOAC (2002) Official methods of analysis of AOAC International. Vol 2. 17th Edition.
- Burboa-Zazueta M.G. (2004) Identificación y caracterización de compuestos fenólicos presentes en la miel de mezquite (*Prosopis ssp.*) y palo fierro (*Olneya tesota*): Marcadores químicos del origen botánico. Tesis de doctorado en ciencias. CIAD A.C., Hermosillo, Sonora.

- Chen, J.H., & Ho, C.-T. (1997) Antioxidat activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2374-2378.
- CIE. (1978) Recommendations of uniform color spaces-color difference equations psychometric color terms. Commision International de l'Eclairage, Paris. Supplement No. 2 to CIE Publication No.15 (E-1.3.1) 1971/ (TC-1.3.).
- D'Arcy B.R. (2005) Antioxidants in australian floral honeys -- Identification of health- enhancing nutrient components. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Australian Government.
- Dawson P. L: y Mathew S. (2000) Antioxidative proprieties of Money in poultry meat. Summary of research funded by the National Honey Board (NBH) and conducted at Clemson University. Available from NBH (www.nbh.org).
- Díaz-Chavez J. (2002). Síntesis de 1,3,2,-dioxafosfolanos derivados del ester fenilíco del ácido caféico. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Djenane D., Sánchez- Escalante A, Beltrán J.A. y Roncalés P. (2002) Ability of α -tocoferol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmospheres. *Food Chemistry* 76: 407-415.

- Fernández-López J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Pérez-Alvarez J.A. y Kuri V. (2005) Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science* 69, 371-380.
- Gallego I. (2005) Procesos de higienización y conservación de los alimentos Disponible en <<http://www.analizacalidad.com/hig.pdf>> fecha de acceso, 24 noviembre 2005.
- Gheldof N. y Engeseth N. (2002) Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3050-3055.
- Gheldof N., Wang X.H. y Engeseth N.J. (2002) Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (21), 5870-5877.
- Grün I.U., Ahn J., Clarke A.D. y Lorenzen C.L. (2006) Reducing oxidation of meat. *Food Technology* 1, 36-43.
- Johnston J., Sepe H., Miano C., Brannan R. y Alderton A. (2005) Honey inhibits lipid oxidation in ready-to-eat ground beef patties. *Meat Science* 70, 627-631.
- Kilsby D.C. (1982) Sampling schemes and limits. In M. H. Brown (Ed.), *Meat microbiology* (pp. 387-421) London and New York: Applied Science Publishers.

- Louveaux J., Maurizio A. y Vorwohl G. (1978) Methods of melissopalynology. *Bee World* 59, 139-157.
- Martínez L., Djenane D., Cilla I., Beltrán J.A. y Roncalés P. (2006) Effect of varying oxygen concentrations on the shelf-life of fresh pork sausages packaged in modified atmospheres. *Food Chemistry* 94, 219-225.
- Martínez L., Cilla I., Beltrán J.A. y Roncalés P. (2007) Effect of illumination on the display life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. Influence of the addition of rosemary, ascorbic acid and black pepper. *Meat Science* 75, 443-450.
- Mato I., Huidobro J., Simal-Lozano J., Sancho M. (2003) Review: Significance of nonaromatic organic acids in honey. *Journal of Food Protection* 66 (12), 2371-2376.
- Maurizio A. (1975) Microscopy of honey. In *Honey, a comprehensive survey*, 2nd ed; Crane E., Ed.; Heinemann in cooperation with the International Bee Research Association. London. Chapter 7, pp 240-257.
- McCarthy T.L., Kerry J.P., Kerry J.F., Lynch P.B. y Buckley D.J. (2001) Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science* 57, 177-184.
- McKibben J. y Engeseth N. (2002) Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 592-595.

- Milić B.Lj., Djilas S.M. y Čanadanović-Brunet J.M. (1998) Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chemistry* 61, 443-447.
- Molan P. C. y Russell K. M. (1988). Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. *Journal of Apicultural Research*, 27, 62-67.
- Monahan F. (2000) Oxidation of lipids in muscle foods: fundamental and applied concerns. En *Antioxidants in muscle foods: nutritional strategies to improve quality*. Ed. Decker, Faustman y Lopez-Bote, Wiley-Interscience, E. U. pp 3-17.
- Morin L.A., Temelli F. y McMullen L. (2002) Physical and sensory characteristics of reduced-fat breakfast sausages formulated with barley β -glucan. *Journal of Food Science* 67 (6), 2391-2396.
- Mundo M.A., Padilla-Zakour O.I. y Worobo R.W. (2004) Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology* 97, 1 – 8.
- Nagai T., Sakai M., Inoue R., Inoue H. y Suzuki N. (2001) Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry* 75, 237-240.
- Nagai T., Inoue R., Kanamori N., Suzuki N. y Nagashima T. (2006) Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chemistry* 97, 256-262.

- Nakanishi K., Oltz E.M. y Grunberger D. (1991) Caffeic acid esters and methods of producing and using same. *United States Patent* 5008441.
- NHB, The National Honey Board (2003) Definition of honey and honey products. Disponible en <<http://www.nhb.org>>. Fecha de acceso: 30 noviembre 2005.
- NMX-F-036-1997-NORMEX Alimentos-Miel-Especificaciones y métodos de prueba. Declaratoria vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de abril de 1997.
- NOM-034-SSA1-1993. Bienes y servicios. Productos de la carne. Carne molida y carne molida moldeada. Envasadas. Especificaciones sanitarias. Declaratoria vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 29 de noviembre de 1994.
- Pascual M. y Calderón V. (2000) Microbiología Alimentaria, metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª edición. Díaz de Santos, España.
- Pedrielli P. y Skibsted L.H. (2002) Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)- epicatechin, and (+)-catechin on α -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7138-7144.
- Pfalzgraf A., Frigg M. y Steinhart H. (1995) α -Tocopherol contents and lipid oxidation in pork muscle and adipose tissue during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 1339-1342.

- Pokorný J. (1991) Review: natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science & Technology* 9, 223-227.
- Rojas M.C. y Brewer M.S. (2007) Effect of natural antioxidants on oxidative stability of cooked, refrigerated beef and pork. *Journal of Food Science* 72 (4), S282-S288.
- Russo A., Longo R. y Vanella A. (2002) Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 73 (Suppl. 1): S21-S29.
- Sebranek J.G, Sewalt V.J.H., Robbins K.L. y Houser T.A. (2005) Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Science* 69, 289-296.
- Serdengecti N., Yildirim I. y Gokoglu N. (2006) Effects of sodium lactate, sodium acetate and sodium diacetate on microbiological quality of vacuum-packed beef during refrigerated storage. *Journal of Food Safety* 26, 62-71.
- Son S. y Lewis B.A. (2002) Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 468-472.
- Son S., Lobkowsky E.B. y Lewis B.A. (2001) Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): synthesis and X-Ray Crystallographic Analysis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 49 (2), 236-238.

- Stewart M., Zipser M. y Walts B. (1965) The use of reflectance spectrophotometry for assay of raw meat pigments. *Journal of Food Science* 30, 464-469.
- Turkmen N., Sari F., Poyrazoglu E.S. y Velioglu Y.S. (2006) Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry* 95, 653-657.
- USDA. (1999) Safe practices for sausages production. Distance learning course manual.
<http://www.midwesternresearch.com/PDF/SausageFSIS.pdf#search='pork%20sausage%2C%20formulation>.
- Valenzuela A. y Nieto S. (1996) Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites* 47(3), 186-196.
- Vasavada M.N. y Cornforth D.P. (2006) Evaluation of antioxidant effects of raisin paste in cooked ground beef, pork, and chicken. *Journal of Food Science* 71 (4), C242-C246.
- Wang X., Gheldof N. y Engeseth N. (2004) Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *Journal of Food Science* 69 (2), 96-101.
- Weston R.J., Mitchell K.R. y Allen K.L. (1999) Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chemistry* 64, 295-301.
- White J.W. (1975) Minerals in honey. In E. Crane (Ed.), *Honey, a comprehensive study* (9th ed.). London: Heinemann.

ANEXO

Metodología para la Cuantificación de las Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en Muestras con Miel.

Al determinar la cuantificación de TBARS en las salchichas con miel se encontró que había interferencia debida a los azúcares presentes en la miel. En particular hubo interferencia de los productos de la reacción de Maillard que se formaron al momento de someter a calentamiento los extractos, lo cual se observó directamente, ya que los extractos de las muestras con miel mostraron un color amarillento y no desarrollaron el color rosa característico del cromóforo formado entre el ácido tiobarbitúrico y el malonaldehído. Por esta razón se realizó un pequeño experimento en el que se elaboraron hamburguesas cocinadas y sin cocinar con 10% de miel y sin miel, a estas muestras se les cuantificaron las TBARS, siguiendo la metodología descrita en la sección de Materiales y Métodos, solo que a los extractos se les realizó un barrido espectrofotométrico de 350 nm a 650 nm, en un espectrofotómetro Varian CARY 50 Bio.

En la Figura 1 se observa que el blanco con miel absorbe a 531 nm (segundo pico), longitud a la cual se realiza la cuantificación de TBARS, por lo que en la evaluación de la capacidad antioxidante de la miel se empleó el blanco con miel para restarle la absorbancia no relacionada a las TBARS en las muestras con miel. En la Figura 2 se observa el barrido espectrofotométrico del blanco y de muestras sin miel que representa el comportamiento esperado.

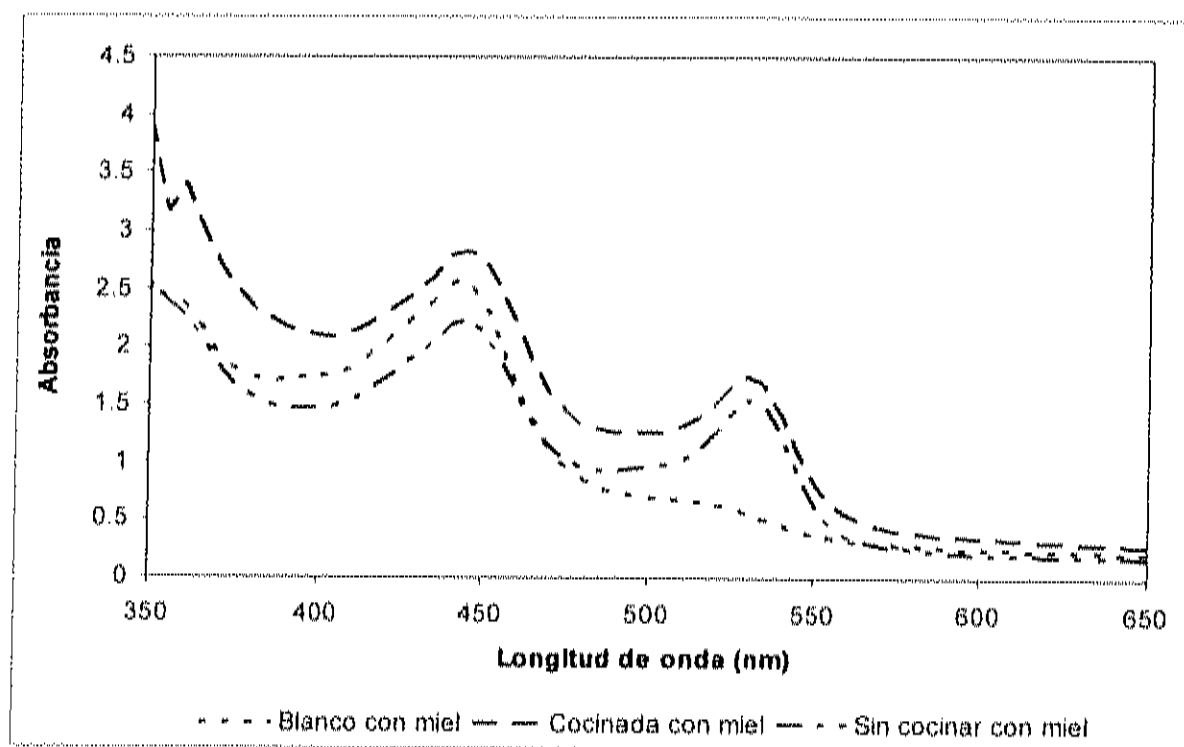


Figura 1. Absorbancia de extractos de hamburguesas con miel para la cuantificación de TBARS.

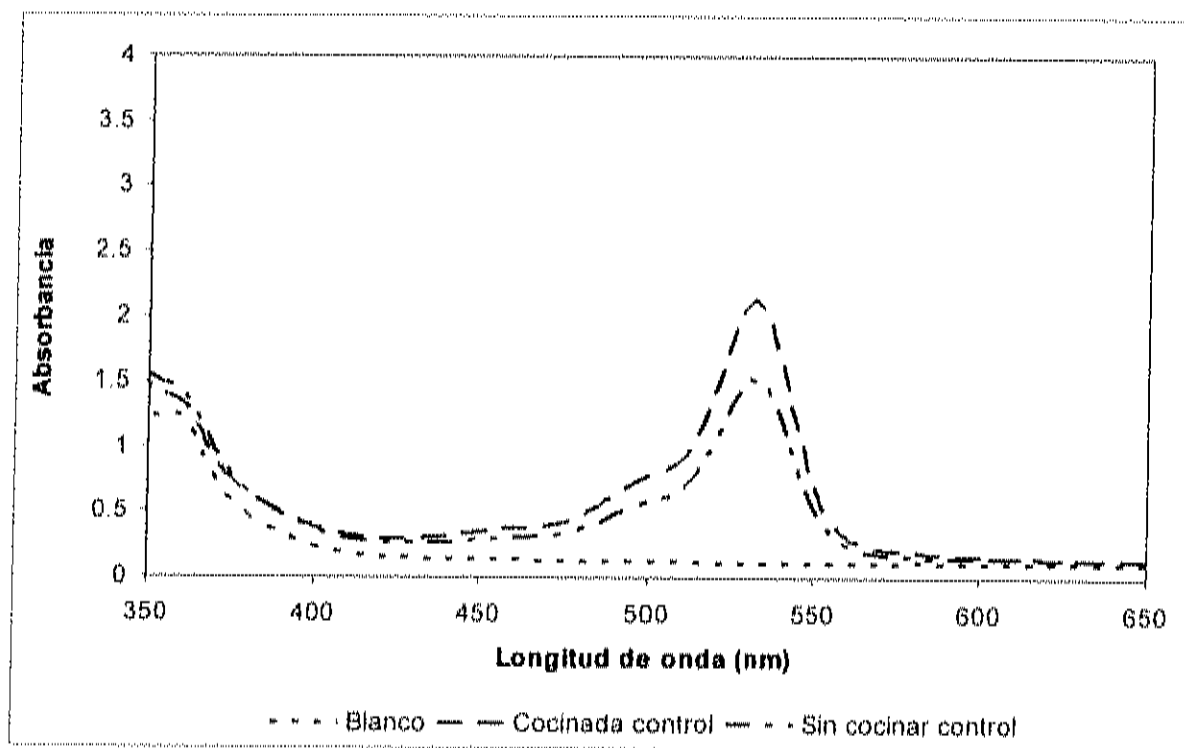


Figura 2. Absorbancia de extractos de hamburguesas sin miel para la cuantificación de TBARS.