



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION DE DIETAS CON
VITAMINA D₃ Y 25-HIDROXICOLECALCIFEROL EN LA
ESTABILIDAD OXIDANTE DE LA CARNE DE CERDO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

Q.A. Isabel Hernández Hernández

Directora de tesis: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesor: M. en Biot. Luis Humberto López Hernández

México D. F. Abril 2013

México D. F. Abril 2013

El lector designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la idónea comunicación de resultados:

**Efecto de la suplementación de dietas con vitamina D₃ y 25-
hidroxicolecalciferol en la estabilidad oxidante de la carne de cerdo.**

que presentó:

Isabel Hernández Hernández

Cómite Tutorial:

Directora:

Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesor:

M. en Biot. Luis Humberto López Hernández

Lectora:

Dra. Yenizey Merit Álvarez Cisneros

Esta tesis forma parte de las actividades del Convenio de Colaboración titulado "Evaluación de los indicadores de frescura de la carne de bovinos en México e indicadores de frescura y determinación de la vida de anaquel de carne de cerdo suplementada con antioxidantes naturales", celebrado entre la UAM y el INIFAP, con apoyo de SAGARPA dentro del marco del proyecto de investigación denominado "Indicadores de Calidad en la Cadena de Producción de Carne Fresca en México"

*RECONOCE Y VALORA A LOS QUE ESTAN ATU LADO ELLOS SON EN
GRAN MEDIDA LOS CAUSANTES DE TUS EXITOS....*

AGRADEZCO A:

Letí y Raúl, mis padres por soportar mi carácter y estar disponibles en todo momento ya que a pesar de que somos una familia no muy común aún cuento con su apoyo y su presencia...GRACIAS

Manue por enseñarme a agradecer y que los momentos mágicos en esta vida están en las cosas simples...inclusive en una mirada

Toño y Rosita por las bendiciones que siempre me envían

Celís, Nacho y Gordí, saben que son el complemento de mi familia y que no sería lo mismo sin ustedes, gracias por su presencia y apoyo durante todo este tiempo...

*Dra. Edith Ponce por que una vez más confió en mí para poder realizar este gran proyecto, por su disposición en todo momento, por sus consejos, su paciencia y por dejarme elegir y pensar con libertad en todo momento
MUCHAS GRACIAS.*

M. en B. Luis Humberto López, por tus consejos, tu tiempo invertido en las correcciones de este trabajo, de regaños, de los buenos momentos que hemos pasado y de tu disposición en todo momento...GRACIAS POR TODA TU AYUDA.

Eva Marina Briz, Erika Sánchez, Luis Suriano, Mauricio Zuzunaga y Oscar Medina porque a pesar de la distancia y del tiempo que ha pasado siempre están al pendiente de mí, muchas GRACIAS POR SU PRESENCIA Y SU APOYO...no se que haría sin ustedes.

Al maravilloso equipo de trabajo del laboratorio S-132 de la UAM-I: *Yeny, Isa, Mariel, Edson, Ruth, Arturo, Giovanni (Galán), Saúl, Brenda Flores y Carmen* ustedes le dan vida a ese laboratorio sin ustedes las tardes interminables de trabajo no serían gratas...GRACIAS por las millones de risas que hemos tenido, los ratos de mal viajes mentales, las salidas de recreación, congresos y los buenos momentos que he pasado a su lado...gracias por enseñarme que una mala noticia o un experimento fallido puede ser más llevadero con sus consejos y su ayuda.

Maria Elena, por enseñarme muchas enseñanzas de la vida que normalmente no se aprende en el laboratorio, gracias por compartir tu experiencia y por hacer el trabajo más ameno.

Un agradecimiento especial a la *Dra. Yenezey Merit* porque le robe un fin de semana con la lectura de mi tesis, GRACIAS por tus valiosos comentarios.

Gracias al proyecto titulado: "*Exploración de Tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas para aumenta la Vida de Anaquel de productos cárnicos con bajo contenido de nítritos. Primera fase*", de empacadora Murgti, por la beca otorgada para continuar con mis estudios.

RESUMEN

La oxidación lipídica y proteica es un factor de deterioro en la calidad de la carne, al provocar cambios en color, aroma, sabor, textura y valor nutritivo. La presencia de antioxidantes puede retardar la oxidación y conservar sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales. El objetivo de este trabajo fue determinar la estabilidad oxidante y fisicoquímica en carne proveniente de cerdos suplementados con vitamina D₃ y 25-OH colecalciferol. Se empleó el *M. Longissimus dorsi* de 80 cerdos, los animales se asignaron a uno de los 10 tratamientos planteados, se sacrificaron y despiezaron. Cada músculo se identificó y se cortó en 9 chuletas, los cortes se empacaron con: película permeable al oxígeno y al vacío. Posteriormente, se almacenaron a 4 °C en una cámara de refrigeración durante un periodo de 28 días. El análisis se realizó los días 1, 7, 14, 21 y 28 para las muestras al vacío y al 1, 7, 14 y 21 para las muestras con película permeable al oxígeno. Se evaluó la capacidad antioxidante endógena por métodos químicos como: FRAP (Capacidad de Reducción Férrica del Plasma) y DPPH• (2,2-difenil-1 picrilhidrazil); y mediante métodos enzimáticos como la actividad de catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD). Además, se evaluó la estabilidad lipídica mediante la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la oxidación de proteínas (fluorescencia y la aparición de grupos carbonilo). Las modificaciones del color, así como la determinación de aminas biogénicas (putrescina y cadaverina), también se llevó a cabo.

El análisis discriminante para las muestras empacadas con película permeable al oxígeno indicó que las variables significativas fueron: FRAP, DPPH•, CAT y GPX, diferencia de color y TBARS. Para las muestras con empaque al vacío se encontró que las determinaciones fueron significativas para: DPPH•, CAT y GPX, diferencia de color, TBARS y oxidación proteica (determinación de grupos carbonilo).

La actividad antioxidante en la carne se modificó por efecto del tiempo y del tipo de empaque ya que en las muestras con empaque al vacío y al día 7 de almacenamiento mostraron actividad antioxidante mayor. La actividad reductora sobre el hierro (FRAP) se modificó por el efecto del tiempo, fuente de vitamina D y tipo de envase, ya que las muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol y empacadas al vacío mostraron una mayor actividad reductora durante el tiempo de almacenamiento.

La actividad enzimática de la catalasa y de la glutatión peroxidasa, cambio por efecto del tiempo de almacenamiento y la fuente de vitamina D. Mientras que la actividad de la SOD únicamente se modificó por efecto del tiempo de almacenamiento.

La concentración de TBARS cambio por efecto del tiempo de almacenamiento y por efecto del tipo de envase, la mayor concentración de TBARS fue al día 7 en las muestras con empaque permeable al oxígeno. La diferencia en el color se modificó por efecto del tiempo de almacenamiento y por el tipo de empaque, siendo las muestras con empaque al vacío las que mostraron menor diferencia en el color. La oxidación proteica mediante la determinación de grupos carbonilo se modificó por el tiempo de almacenamiento y por la fuente de vitamina D, siendo los tratamientos con 25-OH colecalciferol los que generaron menores concentraciones de carbonilos. La mayor concentración de grupos carbonilo fue al día 28.

Los tratamientos que presentaron mejores resultados para las pruebas enzimáticas, pruebas antioxidantes químicas y estabilidad del color en carne de cerdo fueron en su gran mayoría los tratamientos con 25-OH colecalciferol o los tratamientos con altas concentraciones de vitamina D₃.

ABSTRACT

Lipid and protein oxidation is a factor of deterioration in the quality of the meat, to cause changes in color, aroma, taste, texture and nutritional value. The presence of antioxidants can slow oxidation and preserve their physicochemical properties and sensory. The aim of this study was to determine the physicochemical and oxidative stability in meat from pigs supplemented with vitamin D3 and 25-OH cholecalciferol. We employed M. Longissimus dorsi of 80 pigs, the animals were assigned to one of 10 treatments raised, sacrificed and butchering. Each muscle was identified and cut into 9 chops cuts were packed with: oxygen permeable film and vacuum. Subsequently stored at 4 ° C in a cooling chamber for a period of 28 days. The analysis was performed on days 1, 7, 14, 21 and 28 for vacuum and samples at 1, 7, 14 and 21 for the samples with oxygen permeable film. We evaluated the endogenous antioxidant capacity by chemical methods such as FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) and DPPH • (2,2-diphenyl-1 picrylhydrazyl) and by enzymatic methods as the activity of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD). Furthermore, lipid stability was evaluated by determining thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein oxidation (fluorescence and appearance of carbonyl groups). The changes of color as well as the determination of biogenic amines (putrescine and cadaverine) is also conducted.

The discriminant analysis for the samples packaged with oxygen permeable film indicated that significant variables were: FRAP, DPPH•, CAT and GPX, color difference and TBARS. For samples with vacuum packaging was found that the determinations were significant: DPPH•, CAT and GPX, color difference, TBARS and protein oxidation (determination of carbonyl groups).

The antioxidant activity in the pork was modified by the effect of time and the type of packaging as in samples with vacuum packaging and storage day 7 showed higher antioxidant activity. The reducing activity of iron (FRAP) was modified by the effect of time of vitamin D source and type of packaging, since the samples from pigs supplemented with 25-OH cholecalciferol vacuum packed and showed greater activity during the reductive storage time.

The enzymatic activity of catalase and glutathione peroxidase, change the effect of storage time and source of vitamin D. While the activity of SOD was modified by the effect of storage time.

The concentration of TBARS change the effect of storage time and the effect of the type of packaging, the highest concentration of TBARS was day 7 in the samples with oxygen permeable packaging. The difference in color is modified by the effect of storage time and the packaging type, where the vacuum packaging samples that showed the smallest difference in color. Oxidation by determining protein carbonyl groups was modified by the storage time and the source of vitamin D, treatment with 25-OH cholecalciferol that generated the lower concentrations of carbonyls. The highest concentration of carbonyls was at day 28.

Treatments that showed better results for tests enzymatic antioxidant chemical tests and color stability in pork were mostly treatment with 25-OH cholecalciferol or treatments with high concentrations of vitamin D₃.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS	3
2.1.1 pH	3
2.1.2 Color	4
2.2 ESTABILIDAD OXIDANTE	6
2.2.1 Formación de especies reactivas al oxígeno	7
2.2.2 ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS	8
2.2.2.1 Catalasa (CAT)	8
2.2.2.2 Glutación Peroxidasa (GPX)	9
2.2.2.3 Superóxido dismutasa (SOD)	9
2.3 OXIDACIÓN PROTEÍCA	10
2.4 ANTIOXIDANTES, VITAMINAS Y MINERALES	12
2.4.1 Vitamina D	12
2.4.2 Selenio (Se)	15
2.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	16
2.6 MEDICIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA	17
2.7 PRODUCCIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS	18
2.8 USO DE ANTIOXIDANTES PARA EL CONTROL DE LA ESTABILIDAD OXIDANTE DE LA CARNE	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos particulares	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Dietas y tratamientos	24
6.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante métodos químicos	24
6.2.1 Obtención del extracto para determinar la actividad antioxidante y enzimática	24
6.2.2 Determinación de la capacidad atioxidate mediante métodos químicos	24
6.2.2.1 Ensayo de DPPH•	24
6.2.2.2 Ensayo del poder de reducción de hierro (FRAP)	25
6.3 Determinación de la capacidad antioxidante por técnicas enzimáticas	25
6.3.1 Determinación de la actividad de la catalasa (CAT)	25
6.3.2 Determinación de la actividad de la Glutación Peroxidasa (GPX)	26
6.3.3 Determinación de la actividad de la Superóxido dismutasa (SOD)	26
6.4 Medición de la oxidación lipídica mediante la determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)	27

6.4.1 Obtención del extracto para determinar la oxidación lipídica.....	27
6.4.2 Determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico	27
6.5 Medición del color	28
6.6 Medición de la oxidación proteica	28
6.6.1 Espectroscopia de fluorescencia.....	28
6.6.2 Método del DNPH.....	28
6.7 Determinación de aminas biogénicas	29
6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
7. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	31
7.1 Análisis discriminante	31
7.2 VARIABLES QUE FUERON SIGNIFICATIVAS EN EL ANALISIS DISCRIMINATE	31
7.2.1 Determinación de la actividad antioxidante mediante métodos químicos	34
7.2.1.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método del radical DPPH•	34
7.2.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante la capacidad reductora del hierro	40
7.2.2 Determinación de la actividad de enzimas con capacidad antioxidante.....	43
7.2.2.1 Determinación de la actividad enzimática de la catalasa	43
7.2.2.2 Determinación de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa.....	50
7.2.3 Oxidación lipídica mediante la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	56
7.2.4 Determinación de la diferencia del color (ΔE).....	61
7.2.5 Determinación de indicadores de oxidación proteica.....	66
7.3 VARIABLES QUE NO FUERON SIGNIFICATIVAS EN EL ANALISIS DISCRIMINANTE. .	69
7.3.1 Determinación de la actividad antioxidante mediante métodos químicos	69
7.3.1.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante la capacidad reductora del hierro	69
7.3.2 Determinación de la actividad de enzimas con capacidad antioxidante.....	72
7.3.2.1 Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa	72
7.3.3 Determinación de indicadores de oxidación proteica.....	76
7.3.3.1 Determinación de grupos carbonilos como indicadores de oxidación proteica	76
7.3.3.2 Determinación de productos de oxidación proteica mediante fluorescencia	77
7.3.4 Determinación de pH	83
7.3.5 Determinación de Aminas biogénicas.....	87
7.3.5.1 Determinación de putrescina	88
7.3.5.2 Determinación de cadaverina	92
8. CONCLUSIONES	97
9. SUGERENCIAS	99
10. PRODUCCIÓN.....	99
11. BIBLIOGRAFÍA.....	100
12. ANEXOS.....	108
12.1 Análisis estadístico.....	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema Hunter Lab	5
Figura 2.- Estructura de la oximioglobina	6
Figura 3. Síntesis de la vitamina D	14
Figura 4. Gráficas de centroides correspondientes a las muestras empacadas con película permeable al oxígeno.	32
Figura 5. Gráficas de centroides correspondientes a las muestras empacadas al vacío.	33
Figura 6. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante 34 método de DPPH● en cortes de cerdos suplementados con vitamina D3 y empacados con película permeable al oxígeno.	35
Figura 7. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de DPPH● en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol y empacados con película permeable al oxígeno	35
Figura 8. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de DPPH● en cortes de cerdos suplementados con vitamina D3 y empacados al vacío.	37
Figura 9. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de DPPH● en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol y empacados al vacío.	37
Figura 10. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de FRAP en cortes de cerdos suplementados con vitamina D3 y empacados con película permeable al oxígeno.	41
Figura 11. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de FRAP en cortes de cerdos alimentados con 25-OH colecalciferol y empacados con película permeable al oxígeno	42
Figura 12. Variación en la actividad enzimática de la catalasa con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D3 empacados con película permeable al oxígeno.	44
Figura 13. Variación en la actividad enzimática de la catalasa con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados con película permeable al oxígeno.	44
Figura 14. Variación en la actividad enzimática de la catalasa con respecto al tiempo de almacenamiento en cortes de cerdos suplementados con vitamina D3, empacadas al vacío.	47
Figura 15. Variación en la actividad enzimática de la catalasa con respecto al tiempo de almacenamiento en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacadas al vacío.	48
Figura 16. Variación en la actividad enzimática de la GPX con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D3, empacados con película permeable al oxígeno .	51
Figura 17. Variación en la actividad enzimática de la GPX con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados con película permeable al oxígeno.	52
Figura 18. Variación en la actividad enzimática de la GPX con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D3, empacados al vacío.	53
Figura 19. Variación en la actividad enzimática de la GPX con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío.	54
Figura 20. Variación en TBARS con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdo suplementados con vitamina D3, empacadas con película permeable al oxígeno.	57
Figura 21. Variación en TBARS con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdo suplementados con 25-OH colecalciferol, empacadas con película permeable al oxígeno.	57
Figura 22. Variación en TBARS con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdo suplementados con vitamina D3, empacadas al vacío.	58
Figura 23. Variación en TBARS con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdo suplementados con 25-OH colecalciferol, empacadas al vacío.	58
Figura 24. ΔE con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D3, empacados con película permeable al oxígeno.	62

Figura 25. ΔE con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol,, empacados con película permeable al oxígeno.	62
Figura 26. ΔE con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D3, empacados al vacío.	64
Figura 27. ΔE con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío.	64
Figura 28. Variabilidad en los grupos carbonilo con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D3 , empacados al vacío	67
Figura 29. Variabilidad en los grupos carbonilo con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío	67
Figura 30. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de FRAP en cortes de cerdos alimentados con vitamina D3, empacados al vacío.	70
Figura 31. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de FRAP en cortes de cerdos alimentados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío.	71
Figura 32. Variación en la actividad enzimática de la SOD con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D3, empacados con película permeable al oxígeno.	72
Figura 33. Variación en la actividad enzimática de la SOD con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-hidroxicolecalciferol, empacados con película permeable al oxígeno.	73
Figura 34. Variación en la actividad enzimática de la SOD con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D3, empacados al vacío.	73
Figura 35. Variación en la actividad enzimática de la SOD con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-hidroxicolecalciferol, empacados al vacío	74
Figura 36. Variabilidad en los grupos carbonilo con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D3, empacados con película permeable al oxígeno.	77
Figura 37. Variabilidad en los grupos carbonilo con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados con película permeable al oxígeno	77
Figura 38. Variabilidad de la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D3,empacados con película permeable al oxígeno	79
Figura 39. Variabilidad en la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados con película permeable al oxígeno	79
Figura 40. Variabilidad en la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D3, empacados al vacío.	80
Figura 41. Variabilidad en la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío	80
Figura 42. Variabilidad del pH en muestras provenientes de cerdos suplementados con vitamina D3 durante el tiempo de almacén y empacados con película permeable al oxígeno.	83
Figura 43. Variabilidad del pH en muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol durante el tiempo de almacén y empacados con película permeable al oxígeno.	84
Figura 44. Variabilidad del pH en muestras provenientes de cerdos suplementados con vitamina D3 durante el tiempo de almacén, empacados al vacío.	85
Figura 45. Variabilidad del pH en muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol durante el tiempo de almacén, empacados al vacío	85
Figura 46. Variabilidad en la concentración de putrescina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D3, empacados con película permeable al oxígeno	89

Figura 47. Variabilidad en la concentración de putrescina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol empacados con película permeable al oxígeno	89
Figura 48. Variabilidad en la concentración de putrescina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D3, empacados al vacío.	90
Figura 49. Variabilidad en la concentración de putrescina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío.	91
Figura 50. Variabilidad en la concentración de cadaverina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D3, empacados con película permeable al oxígeno.	93
Figura 51. Variabilidad en la concentración de cadaverina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados con película permeable al oxígeno	93
Figura 52. Variabilidad en la concentración de cadaverina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D3, empacados al vacío.	94
Figura 53. Variabilidad en la concentración de cadaverina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío.	94
Figura 54. Curva de calibración a partir de Trolox para determinar la actividad reductora mediante el método de FRAP	109
Figura 55. Curva de calibración a partir de Trolox para determinar la actividad antioxidante mediante la inhibición del radical DPPH•.	108
Figura 56. Curva de Inhibición de SOD	109
Figura 57. Curva de calibración para putrescina.	109
Figura 58. Curva de calibración para cadaverina.	110
Figura 59. Cromatograma a 254 nm de la separación de aminas biogénicas mediante el uso de una columna de fase reversa poroshell 120 EC-C18 con una longitud de 4.6x50 mm	¡Error! Marcador no definido..... 111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición general de la carne de diferentes especies.	1
Tabla 2. Dosis suministradas a los dietas de Vitamina D ₃ y 25-OHD ₃	23
Tabla 3. Preparación de las muestras utilizadas en la determinación de SOD.....	27
Tabla 4. Gradiente de elución para aminas biogénicas	30
Tabla 5. Procedimiento de análisis de varianza para las fuentes de variación en muestras empacadas con película permeable al oxígeno y que fueron significativas en el análisis discriminante	112
Tabla 6. Procedimiento de análisis de varianza para las fuentes de variación en muestras empacadas con película permeable al oxígeno y que no fueron significativas en el análisis discriminante	112
Tabla 7. Comparación de medias de los tratamientos obtenidos por la prueba de Duncan (P<0.05) en muestras empacadas con película permeable al oxígeno y que fueron significativas en el análisis discriminante ...	113
Tabla 8. Comparación de medias de los tratamientos obtenidos por la prueba de Duncan (P<0.05) en muestras empacadas con película permeable al oxígeno y que no fueron significativas en el análisis discriminante.	113
Tabla 9. Procedimiento de análisis de varianza para las fuentes de variación en muestras empacadas al vacío y que fueron significativas en el discriminante	114
Tabla 10. Procedimiento de análisis de varianza para las fuentes de variación en muestras empacadas al vacío y que no fueron significativas en el análisis discriminante.	114
Tabla 11. Comparación de medias de los tratamientos obtenidos por la prueba de Duncan (P<0.05) en muestras empacadas al vacío y que fueron significativas en el análisis discriminante.....	115
Tabla 12. Comparación de medias de los tratamientos obtenidos por la prueba de Duncan (P<0.05) en muestras empacadas al vacío y que no fueron significativas en el análisis discriminante	115
Tabla 13. Prueba de Lambda de Wilks en muestras empacadas con película permeable	116
Tabla 14. Matriz de confusión para los resultados de validación cruzada para muestras empacadas con película permeable	116
Tabla 15. Prueba de Lambda de Wilks en muestras empacadas al vacío.....	116
Tabla 16. Matriz de confusión para los resultados de validación cruzada para muestras empacadas al vacío.....	117

1. INTRODUCCIÓN

La carne es uno de los alimentos más nutritivos debido a su aporte de proteínas de alto valor biológico, además es una fuente de vitaminas del complejo B, minerales (hierro, zinc, fósforo) y ácidos grasos esenciales. La composición de la carne es relativamente similar entre las especies de abasto (Tabla 1), con excepción del contenido de lípidos ya que existen diferencias de acuerdo con el corte o porción anatómica estudiada, así como la especie, la raza, la edad y el género. La carne suele tener un contenido graso que varía desde un 1% hasta un 15%, generalmente depositada en el tejido adiposo y en la grasa intramuscular (Lawrie, 1998).

Tabla 1. Composición general de la carne de diferentes especies.

Tipo de carne	Agua (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Kcal
Vacuno	67.3-70.6	21.8-22.8	6.2-10.6	153-188
Cerdo				
Lomo	69.2-71.3	18.7-19.0	7.2-9.6	145-167
Costillas	63.5-71.8	17.0-19.3	8.28-18.7	157-241
Cordero				
Pierna	60.3-74.4	16.9-20.8	3.8-22.1	123-272
Pollo				
Pechuga	69.5-74.8	20.8-23.1	1.2-9.3	110-172

(USDA, 2004)

Las cadenas de ácidos grasos presentes en el tejido muscular van de 12 a 20 carbonos y pueden ser totalmente saturadas, mono-insaturadas o poli-insaturadas. Mientras más insaturado sea un ácido graso, menor será su punto de fusión y más susceptible será a la oxidación, al desarrollo de sabores rancios y alteraciones en el color (Lawrie, 1998). Por ello el tejido muscular dispone de sistemas endógenos capaces de controlar los procesos oxidantes derivados del metabolismo celular. Dentro de ellos se encuentran varios sistemas enzimáticos, dipéptidos y vitaminas. Entre las enzimas con actividad antioxidante se encuentran la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, que constituyen el principal mecanismo de defensa intracelular contra el daño causado por radicales libres derivados de las reacciones de autoxidación. Entre las vitaminas se encuentra la vitamina E, la cual se localiza principalmente

en las membranas celulares y subcelulares, lugar donde inician las reacciones de oxidación. Mientras que los dipéptidos presentes son: carnosina y anserina que actúan como antioxidantes naturales debido a su capacidad de secuestrar iones metálicos como el Fe^{2+} y el Cu^{2+} (Descalzo *et al.*, 2008a). Asimismo, el glutatión constituye el principal sistema redox de la carne, la proporción de las formas reducida/oxidada (GSH/GSSG) es un indicativo del ambiente reductor en la carne y por lo tanto de su estabilidad a la oxidación. Sin embargo, factores como la línea genética, el programa de alimentación, el estado de nutrición, las condiciones de sacrificio y el manejo post-mortem pueden modificar la estabilidad oxidativa del tejido muscular y en consecuencia la calidad de la carne (Descalzo *et al.*, 2008b).

El tiempo de vida de anaquel es uno de los problemas de la carne empacada, debido a que está condicionada por exposición al oxígeno y a la luz, además del desarrollo microbiano. El principal objetivo de la industria de la carne es prolongar la vida de anaquel mediante el control de desarrollo microbiano y las reacciones de oxidación. Una forma de incrementar la estabilidad del color, de las grasas y de la calidad general de la carne es introduciendo en la dieta del ganado concentraciones considerables de antioxidantes (Ripoll *et al.*, 2011).

Asimismo, el color es una cualidad sensorial de los alimentos que se aprecia por medio del sentido de la vista. Suele ser considerado como un factor psicológico de aceptación y un criterio para elegir un alimento (Hui *et al.*, 2006). El color de la carne en gran parte depende de la concentración de mioglobina y el estado en general de la carne. La oxidación lipídica y la alteración microbiológica son las principales causas del deterioro de la carne. La oxidación de los lípidos modifican las características sensoriales y nutricionales de la carne, causando una coloración amarillenta, pérdida de agua, alteración de la textura y generación de olores extraños (Estévez *et al.*, 2008).

Por lo anterior resulta atractivo el uso de dietas suplementadas con vitaminas (D, C y E) o extractos vegetales (romero, salvia, tomillo, orégano, etcétera), además de algunos minerales como el selenio, ya que todos ellos pueden prevenir o retrasar las reacciones de oxidación

manteniendo las propiedades nutricionales de la carne sin afectar la salud de los consumidores (Descalzo *et al.*, 2008b).

1. ANTECEDENTES

La importancia de la carne como fuente de alimento para el ser humano data de tiempos muy primitivos, con el desarrollo de la ganadería la carne toma un papel primordial en la dieta humana, no estando exenta de problemas en su calidad lo que constituye un reto importante para el productor. El estudio de la carne y su calidad constituye una de las principales áreas que integran la investigación en ganadería y tecnología de los alimentos. Por lo tanto, es importante cuidar el manejo, sacrificio, conservación y preparación de la carne, ya que estos factores definen la calidad de la misma.

2.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

2.1.1 pH

El pH de la carne está determinado por la cantidad de ácido láctico producido a partir del glucógeno durante la glucólisis anaerobia *postmortem*. La caída de este parámetro en el músculo se da en forma gradual desde valores aproximados a 7, que corresponde al pH que presenta el tejido muscular *in vivo*, hasta 5.6-5.7 después de que han transcurrido de 6-8 h del sacrificio para alcanzar a las 24 h un pH final de 5.3-5.7 (Lawrie, 1998). Este pH coincide con el punto isoeléctrico de muchas proteínas, incluyendo las miofibrilares, lo que trae como consecuencia la pérdida de solubilidad y por lo tanto una disminución en la capacidad de retención de agua y la intensidad del color (Price *et al.*, 1994).

Por otro lado, el pH final de la carne también es determinante en el crecimiento microbiano, ya que la mayoría de las bacterias crecen óptimamente a un pH aproximado de 7, mientras que a valores inferiores a 4 y superiores a 9 cesa el crecimiento de la mayoría de los microorganismos (Lawrie, 1998).

Respecto a los lípidos, la oxidación se incrementa conforme el pH disminuye a menos de 7.0. Esto se relaciona con los grupos imidazol de la histidina o amino de las proteínas, los cuales

juegan un papel importante en la quelación de iones metálicos. A pH menor a 6 los residuos de histidina se pueden ionizar alterando la carga neta y la estructura terciaria de las proteínas, lo que redundaría en su capacidad para secuestrar iones que catalizan la oxidación como son: hierro, manganeso, cobalto y cobre (Yasosky *et al.*, 1984).

2.1.2 Color

La determinación objetiva del color se puede llevar a cabo mediante métodos instrumentales. Un colorímetro es un instrumento que reproduce óptica y electrónicamente la sensación percibida por el ojo humano. A fin de tener una reproducción de esta percepción del color se definen varios sistemas, entre los más importantes está el sistema CIE (Comisión Internacional de la Iluminación) por sus siglas en inglés descrito por Munsell y Hunter (Hiu, Y., Guerrero, I. 2006).

Al medir el color se deben describir tres propiedades: matiz, que es el tono o clase de color (rojo, azul, etc.); saturación, intensidad del color o grado de dilución del matiz con el blanco indica la profundidad del color (cuanto más saturado este un color, más intenso y vivo aparece; cuando pierde saturación se va aproximando al gris); y el brillo o grado de dilución del matiz con el negro que indica la luminosidad del color. La luminosidad y la tonalidad son los mejores descriptivos del color; siendo la tonalidad una relación entre los colores rojo, amarillo, azul y verde (Matte, 2007).

En el sistema Hunter Lab (Figura1) se utilizan escalas opuestas del color, que se basan en la teoría de Hering acerca de la visión en color. Dicha teoría propone que el ojo se comparan los colores: rojo con verde y amarillo con azul, para definir la tonalidad percibida. Esta teoría se transforma a dos dimensiones del color: “a” que va de rojo (si es positiva) a verde (si es negativa) y “b” de amarillo (si es positiva) a azul (si es negativa). También se define una tercera coordenada: L (luminosidad), que es perpendicular a estas dos, donde 0 equivale al negro y 100 al blanco (Hiu, Y., Guerrero, I. 2006).

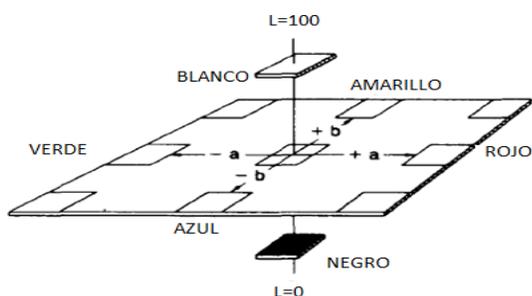


Figura 1. Sistema Hunter Lab

En el tejido vivo, los únicos factores que gobiernan la funcionalidad del grupo *hemo* son el estado oxidado del hierro, la presión parcial del oxígeno y las ligeras modificaciones del pH; mientras que en la carne actúan otros factores (condiciones de almacenamiento y composición de la carne), introduciendo grandes cambios estructurales que afectan el color. Los pigmentos en carne fresca están en un estado de equilibrio dinámico constante, formando parte de un ciclo: por un lado la oxigenación llevada a cabo por el oxígeno presente en la sangre y la desoxigenación conforme el oxígeno es utilizado en las oxidaciones musculares y por otra parte la oxidación y reducción del hierro del grupo *hemo*. Este equilibrio se rompe o se detiene por cambios en el estado metabólico del tejido, la integridad de los pigmentos y el medio ambiente (Price *et al.*, 1994).

La oximioglobina (mioglobina oxigenada) es el pigmento rojo brillante característico de la carne fresca. En la Figura 2, se puede apreciar un anillo pirrólico unido a un Fe (grupo *hemo*), en estado de oxidación (II), la globina unida también al Fe mediante el enlace con la histidina y asimismo una molécula de oxígeno (Mateo, 2007).

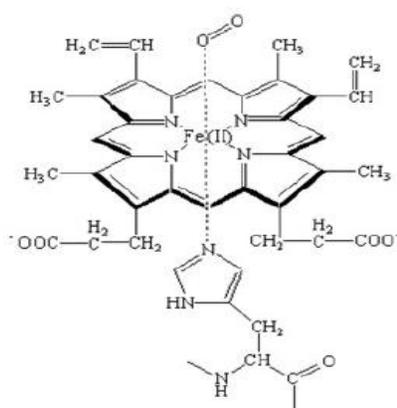


Figura 2.- Estructura de la oximioglobina

Conforme el oxígeno penetra en el tejido oxida varias sustancias, principalmente coenzimas. El gradiente de oxígeno va desde la saturación en la superficie hasta cero a unos pocos centímetros debajo, el espesor de esta capa varia con la actividad enzimática, con la concentración de sustancias reducidas residuales, pH y temperatura. El interior de la carne permanece con el color rojo púrpura del pigmento no oxigenado, la mioglobina. Entre la capa exterior roja y la interna púrpura existe generalmente una fina película parda del pigmento con el hierro en estado oxidado, la metamioglobina, esto ocurre debido a que la oxidación de la mioglobina se ve favorecida sobre la oxigenación a presiones parciales bajas de oxígeno (Price *et al.*, 1994).

2.2 ESTABILIDAD OXIDANTE

La oxidación se aborda generalmente como la forma más frecuente de deterioro de los lípidos y de las proteínas pero principalmente de los ácidos grasos poli-insaturados que conduce al desarrollo de enranciamiento, la formación de compuestos que provocan sabores indeseables, polimerización y otro tipo de reacciones que provocan la reducción de la vida útil y el valor nutritivo del alimento. Los dos principales compuestos implicados en la oxidación lipídica son los ácidos grasos insaturados y el oxígeno. La degradación oxidativa de los lípidos puede iniciarse a partir del oxígeno activo de algunas especies relacionadas más activas que las

moléculas de oxígeno triplete presentes en el aire y de agentes exógenos como: radiación UV, radiación ionizante y calor (Jan *et al.*, 1995).

2.2.1 Formación de especies reactivas al oxígeno

Uno de los procesos que afectan la calidad de la carne es la oxidación lipídica causada por diversas sustancias reactivas al oxígeno (SRO), también conocidas como radicales libre. Los radicales libres suelen ser muy inestables, pues los orbitales que poseen electrones desapareados buscarán completar el par electrónico que anule su campo magnético, favoreciendo la colisión entre moléculas, razón por la cual las reacciones en las que intervienen suelen ser muy rápidas (Gil, 2010).

Un radical libre que merece especial atención es el llamado anión superóxido [$O_2^{\cdot-}$] por su alta reactividad y su capacidad para generar nuevas SRO. El anión superóxido es producido por la reducción monovalente del oxígeno molecular [O_2]. Otro radical de gran importancia por su alta reactividad es el ión hidroxilo generado tras la captación de un electrón y un protón por parte del peróxido de hidrógeno. Por su parte, el peróxido de hidrógeno al no ser propiamente un radical libre, es considerado también como una SRO, pues se produce por la oxidación y reducción al mismo tiempo del anión superóxido; proceso mejor conocido como dismutación. Estas tres especies formadas a partir de la reducción del oxígeno son algunas de las llamadas SRO, mismas que tienen su origen en fuentes fisiológicas, entre las que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, donde entre el 1 y 2% de la reducción del oxígeno a agua en la cadena respiratoria se libera como [$O_2^{\cdot-}$] (Gil, 2010).

Cuando la interacción de las SRO con moléculas susceptibles a oxidación, excede a los sistemas de defensa, provoca un estado que se denomina estrés oxidante. Este estado de estrés se produce al generarse una cascada de eventos intracelulares que pueden convertirse en un daño oxidante grave como fragmentación del ADN, inactivación de enzimas e interacción con otras estructuras proteicas u oxidación de lípidos (Gil, 2010).

Para retardar estos procesos se encuentran los sistemas antioxidantes endógenos, la primera línea de defensa de antioxidantes consiste en la inhibición de la formación de especies

reactivas de oxígeno y de radicales libres a través del secuestro de iones metálicos, por reducción de hidroperóxidos y peróxidos de hidrógeno, por captación del superóxido y del oxígeno singulete. Mientras que los antioxidantes que actúan como segunda línea de defensa son aquellos que absorben radicales libres, los principales de este grupo son: la vitamina C y E, ambas captan radicales e inhiben la reacción en cadena o rompen la reacción de propagación. Los compuestos polifenólicos también pueden actuar como potentes antioxidantes que atrapan radicales, estos pueden ser endógenos o bien exógenos, es decir, que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes. La tercera línea de defensa son los mecanismos de reparación *de Novo* de los lípidos, proteínas y DNA alterados por la oxidación. Varias enzimas como las lipasas, proteasas, enzimas reparadoras de DNA, son responsables de llevar a cabo estos procesos (Jan *et al.*, 1995).

2.2.2 ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS

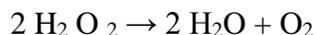
2.2.2.1 Catalasa (CAT)

El grupo de las enzimas catalasa es uno de los más abundantes ya que están presentes en todas las células eucariotas. La actividad de dicha enzima varía en función del tejido; por ejemplo, en hígado y riñones su actividad es más elevada, en tejido conectivo y epitelios más baja y prácticamente nula en tejido nervioso. A nivel celular, la catalasa se encuentra en las mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplasmático (Gil, 2010).

La catalasa es una metaloproteína homotetramérica constituida por cuatro subunidades, cada una tiene un grupo prostético de porfirina IX, unido por interacciones no covalentes; el peso molecular oscila entre los 210 y 350 kDa, de los cuales el contenido de hierro representa el 0.09% (Gil 2010).

Una de las características de la catalasa es su gran capacidad para descomponer aproximadamente 6×10^6 moléculas de H_2O_2 por minuto, además de que posee una alta afinidad por el sustrato. La función de la catalasa como parte del sistema de defensa antioxidante consiste en catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno que se genera

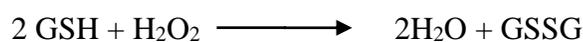
durante el metabolismo celular en oxígeno molecular y agua y es descrito por la siguiente reacción:



La actividad de CAT puede ser inhibida por el cianuro, la azida, el sulfuro, la hidroxilamina, el paracetamol, la bleomicina, la adriamicina, la benzidina y el paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo).

2.2.2.2 Glutación Peroxidasa (GPX)

La glutación peroxidasa es una metaloenzima, con cofactores como el hierro, selenio, cobre, zinc, manganeso o níquel, que actúa durante la etapa de propagación del mecanismo de oxidación. Está localizada en la mitocondria y en el citosol de las células del músculo. La glutación peroxidasa cataliza la oxidación de la glutación peroxidasa reducida (GSH) a su forma oxidada (GSSG) a expensas del peróxido de hidrógeno, mediante la siguiente reacción:



Es una proteína tetramérica de peso molecular de 85 kDa que contiene cuatro átomos de selenio unidos a cisteína formando una selenocisteína, los cuales le confieren actividad catalítica. A diferencia de la catalasa, la glutación peroxidasa tienen una elevada afinidad por su sustrato pero baja actividad catalítica (Gil, 2010).

La GPX necesita selenio en su centro activo, por lo tanto algunos estudios en animales han demostrado que la actividad de la GPX dependiente de selenio está muy relacionada con la ingesta dietética de selenio. En algunas especies se ha observado una correlación lineal positiva entre la actividad de esta enzima dependiente de selenio y el nivel de selenio en la sangre, además se ha propuesto que la actividad de esta enzima en sangre podría servir como índice del nivel de selenio del animal (DeVore *et al.*, 1982).

2.2.2.3 Superóxido dismutasa (SOD)

La familia de las enzimas superóxido dismutasas son un grupo de metaloenzimas que con frecuencia se presentan en organismos aerobios, aerotolerantes, así como en algunos

anaerobios obligados. Estas metaloenzimas han sido clasificadas en cuatro grupos con base al metal que actúa como cofactor: Mn-SOD, Fe-SOD, Cu-Zn-SOD y Ni-SOD (Gil, 2010).

En organismos eucariontes existen tres tipos de SOD localizados en diferentes regiones celulares que trabajan conjuntamente para controlar los niveles de concentración del radical peróxido [$O_2^{\bullet-}$], estos tres tipos de SOD son: mitocondria (Mn-SOD); citosólica y zona extracelular (CuZn-SOD); se encargan de catalizar la conversión del radical anión superóxido [$O_2^{\bullet-}$] en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2), siendo esta la reacción catalizada por enzimas más rápida que se conocen. Cabe mencionar que el peróxido de hidrógeno producido por la SOD es eliminado por la catalasa y glutatión peroxidasa. La función fundamental de la SOD consiste en eliminar el radical superóxido antes de que éste pueda reaccionar con moléculas biológicas susceptibles o produzca otros agentes tóxicos, de acuerdo a la siguiente reacción:



La forma nativa de la SOD citosólica está constituida por dos subunidades idénticas unidas por puentes disulfuro, cada subunidad cuenta con un peso aproximado de 16 Da y 152 aminoácidos. El peso molecular que se reporta de la unidad dimérica es de 31.2 Da. En la estructura de cada subunidad se encuentra un átomo de cobre (Cu^{2+}) y uno de zinc (Zn^{2+}), el primero es vital para la acción catalítica y el segundo desempeña un papel estructural, en el sitio activo se localizan cuatro residuos de histidina, los cuales con los nitrógenos imidazólicos se coordinan con el ion cúprico y una molécula de agua. La pérdida de todos o algunos de estos metales, trae como consecuencia la disminución o ausencia de la actividad enzimática (García Onel., 1995).

2.3 OXIDACIÓN PROTEÍCA

Cualquier factor que ocasione estrés oxidante puede causar oxidación proteica por ejemplo, la disminución de los sistemas antioxidantes de defensa, el aumento en la producción de

sustancias reactivas al oxígeno (SRO), una disminución en la capacidad de reciclar las proteínas oxidadas o un aumento de la susceptibilidad de las proteínas para ser oxidadas. La concentración intracelular de hierro también determina la carbonilación de las proteínas (Díaz-Acosta, Membrillo., 2006). Los productos secundarios provenientes de la oxidación de lípidos pueden reaccionar con las proteínas, siendo los residuos de lisina, cisteína, metionina, triptófano, tirosina e histidina los más afectados por estas reacciones en las proteínas. Las reacciones de interacción proteína-lípido oxidados producen modificaciones de las proteínas y en consecuencia la pérdida de valor nutricional y la formación de compuestos que pueden ser tóxicos (Estévez, 2011).

La carbonilación ocurre principalmente en los residuos de prolina, arginina y lisina, los productos de la carbonilación de estos residuos son el semialdehído glutámico (producto de la oxidación de arginina y prolina) y semialdehído aminoalifático (producto de la oxidación de lisina). La generación de grupos carbonilos se lleva a cabo principalmente por 4 rutas. La primera es la oxidación directa de prolina, lisina, arginina y treonina por reacción con SRO, los productos de oxidación de dichos aminoácidos son: 2-pirrolidona a partir de prolina, semialdehído α -aminoalifático a partir de lisina, semialdehído glutámico a partir de arginina y prolina y ácido 2-amino-3-cetobutírico a partir de treonina. Recientemente demostraron que los productos carbonilados, que representan cuantitativamente la mayor parte de una medición de carbonilación, son el semialdehído glutámico y el semialdehído aminoalifático en menor grado (Díaz-Acosta, Onel., 2006).

La segunda ruta de formación de grupos carbonilo involucra la ruptura de la cadena polipeptídica por medio de una ruta de α -amidación o por la oxidación de residuos de ácido glutámico lo que conlleva a la formación de péptidos en los cuales el aminoácido N-terminal está bloqueado por un derivado de α -cetoácido (Estévez, 2011).

Las dos rutas de oxidación restantes implican reacciones secundarias con moléculas que presentan grupos carbonilos reactivos formados previamente por reacción directa de biomoléculas con SRO. Por ejemplo, la reacción de Michael del grupo amino de lisina, la entidad imidazol de histidina o el grupo sulfidril de cisteína con malonaldehído 4-hidroxi-2-nonenal y 2-propanal (ambos productos de la oxidación lipídica) y por reacción de cetoaminas,

cetoaldehídos y deoxiosonas, que son productos de la reacción de azúcares reductores o sus productos de oxidación, con el grupo amino de residuos de lisina. Los grupos carbonilo han sido detectados por derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina y determinados espectrofotométricamente (Díaz-Acosta, Onel., 2006).

2.4 ANTIOXIDANTES, VITAMINAS Y MINERALES

La inclusión de antioxidantes en la dieta animal es un método efectivo para incrementar la estabilidad oxidante del músculo, el efecto de la dieta administrada sobre el nivel antioxidante depende de distintos factores: de los nutrientes antioxidantes y pro-oxidantes, de los aditivos, suplementos no nutricionales, de la absorción, biodisponibilidad de todos ellos, del procesamiento y almacenamiento. Algunos compuestos administrados no son propiamente antioxidantes; sin embargo, son nutrientes esenciales para el funcionamiento de sistemas antioxidantes endógenos, por ejemplo el Cu, Mn, Zn y Se son cofactores de sistemas enzimáticos antioxidantes. La suplementación de antioxidantes en la dieta de los animales destinados a la producción cárnica tiene como finalidad garantizar la suficiente cantidad de antioxidante en los músculos necesaria para generar una correcta protección frente a la degradación oxidante (Papas, 1999).

2.4.1 Vitamina D

La vitamina D es una familia de compuestos esteroides, insolubles en agua pero solubles en alcohol y se encuentra en dos formas principales: D₂ o ergocalciferol (producida principalmente en plantas) y D₃ o colecalciferol (producida en tejidos animales). Ambas vitaminas son biológicamente inactivas, que deben hidroxilarse en los carbonos 25 y 1 antes de unirse al aceptor de la vitamina D. La luz solar se requiere para transformar la vitamina D₂ en D₃ pero dado que los animales muchas veces no reciben la cantidad de luz solar necesaria para llevar a cabo este proceso entonces se utiliza la forma D₃ como suplemento. Desafortunadamente en esta forma tiende a acumularse en los tejidos y en dosis elevadas con el tiempo puede producir reducciones en el consumo del alimento, lo que reduce la productividad de los animales y por lo tanto su uso se ha limitado (Muller *et al.*, 1991).

Actualmente existe a nivel comercial, una nueva forma de vitamina D₃, la cual es equivalente pero con un grupo hidroxilado en la posición 25, por lo que se denomina 25 hidroxicoalciferol [25(OH) D₃], que al ser hidrosoluble en los animales la toleran mejor que la forma sin hidroxilar (Muller *et al.*, 1991).

El 80% de la vitamina D₃ exógena se absorbe en el intestino delgado independientemente de la cantidad administrada, después de la solubilización de la vitamina D₃ por sales biliares y su incorporación a los quilomicrones, la vitamina D₃ es transportada hacia el hígado a través del sistema linfático. La excreción de la vitamina D₃ y sus metabolitos ocurre esencialmente a través de la vía fecal, ya que por la vía urinaria se excreta alrededor del 1% y de 10 a 15% de la vitamina D y 1,25-hidroxicoalciferol, respectivamente (Bourges *et al.*, 2005).

La vitamina D se sintetiza de manera endógena a partir de su precursor el 7-dehidrocolesterol, esta síntesis (Figura 3) ocurre en la piel de la mayoría de los animales, por lo que la vitamina D₃ se considera como una prohormona que da lugar a varios metabolitos, el cual se biotransforma en coalciferol bajo la acción de la luz UV. Las dos formas circulantes de la vitamina D, D₂ y D₃ se unen a la alfa-globulina transportadora y tienen como destino el hígado. En los microsomas del hepatocito, la vitamina D se transforma en 25-hidroxicoalciferol mediante la acción de la vitamina D-25 hidroxilasa, la cual incorpora un grupo OH al carbono 25. Además del hígado, el intestino y el riñón también tienen la capacidad de sintetizar este metabolito, la 25-OH coalciferol es la principal forma circulante de la vitamina D. Su vida media es de 19 a 24 días y es más corta que la de su precursor. La 25-hidroxicoalciferol unida a la globulina transportadora es transportada hacia los riñones y en este sitio se transforma en 24,25-dihidroxitamina D y en 1,25-dihidroxitamina D. Este último metabolito posee mayor actividad biológica, al interactuar con sus receptores intracelulares y de membrana la 1,25-dihidroxitamina D regula la homeostasis de calcio, la diferenciación y la proliferación celular, así como la función de la glándula paratiroides (Bourges *et al.*, 2005).

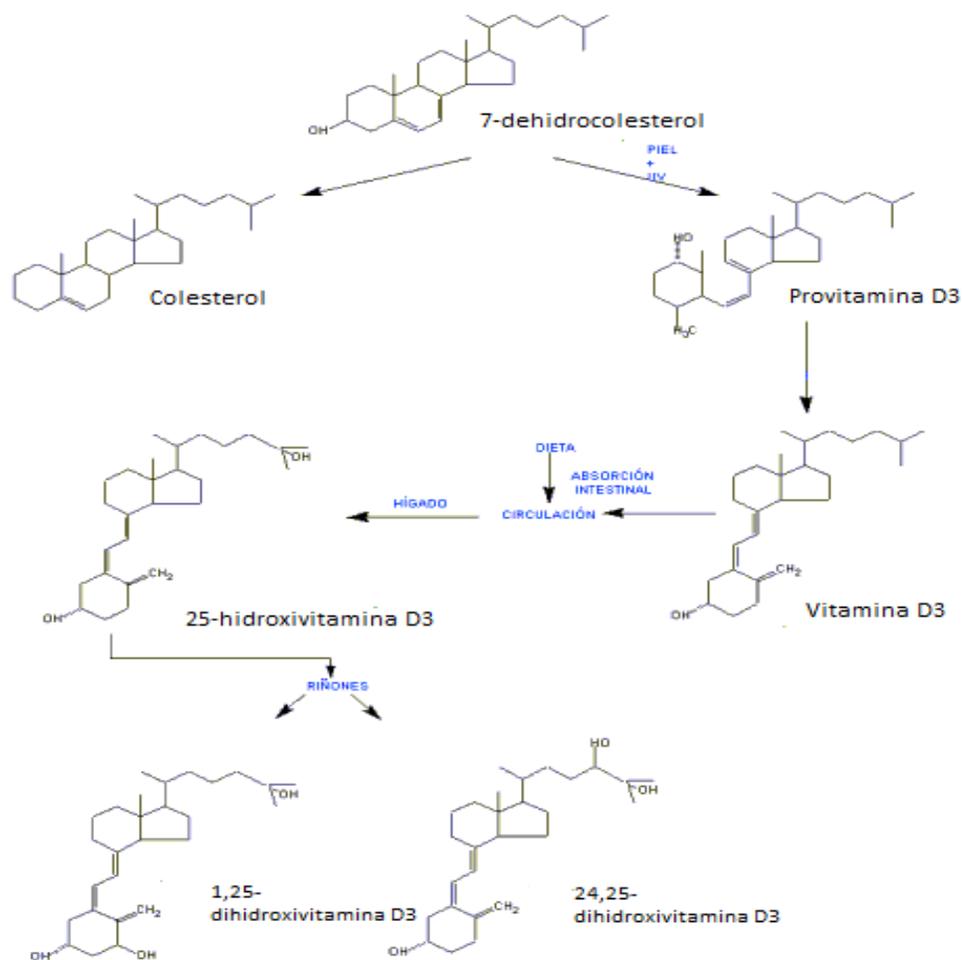


Figura 3. Síntesis de la vitamina D

La vitamina D en colaboración con la calcitonina participa en la homeostasis de minerales entre ellos el calcio y el fósforo, también regula la formación del hueso por una parte mejora la absorción de minerales a nivel intestinal y por otra aumenta la masa ósea; además regula la diferenciación celular (Machlin, 1999). Esta vitamina podría considerarse como un antioxidante de membrana, la vitamina D₃ (colecalfiferol) y su metabolito activo 1,25-dihidroxicolecalciferol pueden llegar a inhibir la oxidación lipídica catalizada por hierro. El

1,25-dihidroxicolecalciferol y el ergocalciferol presentan una similar eficacia para inhibir la oxidación mientras que el 7-dehidrocolesterol presenta una baja efectividad (Machlin, 1999).

El 1,25-dihidroxicolecalciferol es reconocido como una forma activa de la vitamina D activado por calcio y fósforo es un importante protector de la membrana de las células ya que puede captar los radicales libres que inducen la oxidación, es un compuesto altamente lipofílico que se puede acumular en las membranas. Actúa mediante la interacción de sus anillos hidrofóbicos y los ácidos grasos saturados o los fosfolípidos lo que disminuye la fluidez de la membrana (Bender, 1997)

Otro factor que se atribuye a la vitamina D₃ es el de mejorar algunas de las características de la carne, particularmente la ternura, debido a que la μ -calpaína, la m-calpaína y la calpastatina son controladas por la concentración de calcio en el músculo. Cuando la calpastatina es inhibida en presencia de calcio ocurre la proteólisis de las fibras musculares trayendo como consecuencia una mayor suavidad en la carne (Enright *et al.*, 1998).

2.4.2 Selenio (Se)

El selenio es un oligoelemento esencial para el consumo humano y la sanidad animal. Los primeros estudios sobre selenio hablaban de su toxicidad hasta que se descubrió que impedía la degeneración del hígado de ratas alimentadas con una deficiencia de vitamina E, desde entonces se ha reconocido que este elemento en la forma de selenocisteína es el componente estructural central de varias enzimas específicas. Entre las cuales se encuentran la glutatión peroxidasa, varias tioredoxina reductasa y selenofosfato sintetasa (Skrivanová *et al.*, 2007).

El selenio entra en la cadena alimentaria a través de las plantas, el aumento en consumo de carne enriquecida con este mineral puede constituir un medio para mejorar la condición de selenio en los seres humanos. Los tejidos animales fácilmente incorporan seleniometionina, ya que es la forma predominante del selenio. Los suplementos de selenio se encuentran en dos formas: las sales minerales inorgánicas como: el selenito de sodio o selenato o en formas orgánicas como: la levadura de selenio enriquecida en seleniometionina (Juniper *et al.*, 2009).

La absorción del selenio se produce en el intestino delgado, mientras que la selenometionina se absorbe en el sistema transportador de la metionina, el selenito de sodio se absorbe por difusión pasiva y es menos eficaz, independientemente de la fuente el selenio debe someterse a una transformación metabólica a seleniuro antes de su asimilación para que posteriormente se incorpore a las selenoproteínas por medio del codón UGA. Debido a esto, las acciones biológicas del selenio dependerán de la cantidad y de la forma química en que se consume (Juniper *et al.*, 2009).

Varios autores han reportado una correlación entre la actividad de la enzima glutatión peroxidasa y el contenido de selenio en los tejidos de cerdos y bovinos. Por lo tanto, los suplementos de selenio podrían aumentar la estabilidad de la oxidación de la carne, lo cual es importante en los animales alimentados con dietas complementadas con lípidos insaturados (Skrivanová *et al.*, 2007).

2.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La captación de radicales es el principal mecanismo de acción de los antioxidantes en los alimentos. Se han desarrollado muchos métodos en los que se mide la capacidad antioxidante a través de la captación de radicales libres sintéticos en solventes orgánicos polares (metanol o etanol). Los radicales libres usados son del tipo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) y 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-acido sulfónico) conocido como ABTS[•] (Criado *et al.*, 2009).

En el método del DDPH[•] se mide la captación de este radical a través de la disminución de la absorbencia medida a 515nm, que se produce por reducción de un antioxidante o por reacción con especies radicales. Algunos fenoles por ejemplo el α -tocoferol, reacciona rápidamente con los radicales DPPH[•], en la mayor parte de los casos el método del DPPH[•] se ha usado para medir la captación de radicales después de 15 o 30 minutos de iniciada la reacción (Jan *et al.*, 1995).

La mayoría de las actividades antioxidantes de carácter no enzimático involucran procesos redox. El ensayo de FRAP (ferric reducing antioxidant power) por sus siglas e inglés se basa principalmente en la actividad reductora de los compuestos presentes en la muestra mediante

la transferencia de electrones (Iris *et al.*, 1999) y es una técnica sensible que se emplea habitualmente para medir la capacidad antioxidante de diferentes fluidos del organismo y complementos de la dieta. Consiste en la reducción del complejo $[\text{Fe (III) (TPTZ)}_2]^{3+}$ a $[\text{Fe (II) (TPTZ)}_2]^{2+}$ por efecto de los compuestos reductores donde se forma un complejo azul con tripiridil triazina (TPTZ) que puede ser cuantificado a 593nm. De este modo el poder antioxidante total puede ser expresado en equivalentes de antioxidantes conocidos en diferentes concentraciones del mismo ensayo. Los más utilizados son Trolox y ácido gálico (Iris *et al.*, 1999).

2.6 MEDICIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA.

Puesto que la descomposición por oxidación tiene gran importancia desde el punto de vista de la aceptabilidad como de la calidad nutritiva de los productos alimentarios, se han ideado muchos métodos para valorar la extensión de la oxidación. Uno de los análisis más utilizados para evaluar la extensión de la oxidación de los lípidos es el análisis con ácido tiobarbitúrico (TBA). Los productos de oxidación de los sistemas insaturados dan productos de reacción coloreados debido a la condensación de dos moléculas de TBA con una molécula de malonaldehído; sin embargo el malonaldehído no siempre se encuentra en los sistemas oxidados. Muchos alcanales, alquenes y los 2-4 dienales dan un color amarillo con el TBA, pero solo los dienales dan un color rojo (Fennema *et al.*, 1998).

Las sustancias capaces de reaccionar con el TBA aparecen solo en cantidades sustanciales a partir de la oxidación de los ácidos grasos que contienen tres o más dobles enlaces, por otra parte el malonaldehído también procede de la descomposición de los endoperóxidos relacionados con las prostaglandinas producidas durante la autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Fennema *at al.*, 1998).

Diversos compuestos que aparecen en los sistemas oxidados pueden interferir con el análisis característico de TBA, dando lugar al característico pigmento rojo al reaccionar con el reactivo. La sacarosa y algunos componentes del humo de leña dan color rojo al reaccionar con el TBA, por otra parte, pueden obtenerse valores anormalmente bajos debido a que el malonaldehído reacciona con las proteínas en los sistemas oxidados. Sin embargo, en muchos

casos, el método de análisis del TBA es aplicable para comparar muestras de un mismo material en diferentes estados de oxidación (Fennema *et al.*, 1998).

2.7 PRODUCCIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS

El músculo *post-mortem* ofrece un ambiente altamente nutritivo para la microflora contaminante que satisface las necesidades básicas para su crecimiento. Este proceso se acelera como resultado de abusos térmicos a lo largo de la cadena de comercialización del producto. La descarboxilación de aminoácidos o la aminación de aldehídos y cetonas por parte de ciertos géneros de bacterias deteriorantes presentes en la carne, genera compuestos básicos nitrogenados conocidos como aminas biogénicas, los cuales presentan un bajo peso molecular. Los factores para su formación incluyen la disponibilidad de aminoácidos libres, la presencia de microorganismos descarboxilasa positivos y de condiciones necesarias para el crecimiento microbiano. La producción de aminas biogénicas en alimentos puede verse afectada por condiciones de temperatura, sales, presencia de carbohidratos fermentables, presencia de oxígeno, potencial redox y pH (Signorini, M., Guerrero, I., 2009).

El consumo de aminas biogénicas por parte de individuos sanos no representa ningún riesgo, sin embargo, los individuos con problemas coronarios o respiratorios, o aquellos que presentan enfermedades que debilitan el sistema antioxidasas (alcoholismo, deficiencia de vitamina B, problemas gastrointestinales, entre otras) son de riesgo ante estas sustancias. La determinación de aminas biogénicas es importante, no solo desde el punto de vista toxicológico, sino también porque estos compuestos pueden utilizarse como indicadores del grado de alteración de los alimentos. En carne fresca, los recuentos elevados de putrescina, cadaverina y tiramina han sido relacionados con concentraciones elevadas de *Pseudomonas spp.*, *Enterobacterias* y bacterias lácticas, respectivamente (De Mey *et al.*, 2012).

2.8 USO DE ANTIOXIDANTES PARA EL CONTROL DE LA ESTABILIDAD OXIDANTE DE LA CARNE

Lahucky *et al.* (2007) determinaron los efectos de la adición de vitamina D₃ y vitamina E en la calidad de la carne utilizando el músculo *Longissimus dorsi* de cerdos, se determinó la concentración de calcio en plasma y la oxidación lipídica (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico). El estudio consistió en probar dos dietas fueron suplementadas con vitamina D₃ (500,000 IU/d), una de ellas únicamente fue vitamina D₃ que se suministró durante 5 días y la otra D₃ + E (500 mg de acetato de tocoferol/Kg de dieta) la cual se administró durante los 30 días antes del sacrificio. Los cerdos alimentados con vitamina D₃ presentaron una mayor concentración plasmática de calcio (P <0.01) en comparación con los animales del grupo control. Los que fueron alimentados con la mezcla (D+E), presentaron mayor concentración de alfa-tocoferol en la carne (P <0.05). La suplementación con vitamina D₃ mantuvo el índice de rojo (a*) en las chuletas durante 5 días de almacenamiento. La vitamina D₃ y la vitamina E no afectaron la suavidad de la carne (fuerza al corte con la navaja de Warner-Bratzler). La oxidación lipídica disminuyó en el tratamiento que contenía vitamina E.

Swigert *et al.* (2009), estudiaron 240 cerdos la calidad de la carne y las características de palatabilidad. Los cerdos fueron sometidos a una dieta de ocho posibles: Control (sin suplemento), vitamina D₃, vitamina E, magnesio, vitamina D₃ + E, vitamina D₃ + magnesio, vitamina E + magnesio y vitamina D₃ + E + magnesio. A las 48 h *postmortem* no se encontraron diferencias debidas al tratamiento en las variables L, a*, b* y pérdida por goteo. A los 14 días de almacenamiento tampoco se encontraron diferencias en las características sensoriales debidas a la dieta. Los resultados sugirieron que la suplementación con magnesio en las dietas de cerdos pueden tener algún beneficio potencial para el aumento del pH final.

Wilborn *et al.* (2004) utilizaron 25 cerdos raza Duroc los cuales fueron asignados a una de las 3 dietas experimentales: control, 40 000 (40) y 80 000 (80) IU D₃/Kg de alimento, teniendo como objetivo probar los efectos de la vitamina D₃ en la calidad de la carne. Los cerdos se alimentaron con dichas dietas durante 44 o 51 días antes del sacrificio y se usaron el M. *Longissimus dorsi* para llevar a cabo las determinaciones. El pH fue mayor (P <0.05) para la

carne de los cerdos que fueron alimentados con la dieta de 80 que los alimentados con la dieta control. El color del músculo a las 24 h *postmortem* presentó valores de L más bajos que los de la dieta control. La dieta no tuvo efecto sobre la fuerza de corte, porcentaje de pérdida de agua por cocción, suavidad, jugosidad y sabor. La dieta de 80 aumentó la concentración en plasma de vitamina D₃ y de calcio en comparación con la dieta control. Sin embargo, las concentraciones de calcio en el músculo no fueron afectadas por el tipo de dieta. Estos resultados indicaron que la alimentación con niveles bajos de vitamina D₃ por lo menos durante 44 días mejoran el color.

De acuerdo a Descalzo *et al.* (2008a) se determinó si existen diferencias en la dieta y suplementos antioxidantes usados. Para ello se utilizaron 4 grupos experimentales (pasto, pasto + vitamina E: 500 U/animal/día y grano + vitamina E: 500 U/animal/día) con 10 animales cada uno. Muestras del músculo *Psoas major* fueron conservadas a -70 °C hasta el momento del análisis. Se determinó la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX). La actividad de SOD fue más elevada en carne fresca de animales alimentados a pasto respecto de los de grano ($p=0,0076$). Sin embargo, la actividad de CAT y GPX no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos estudiados. Con respecto a la suplementación de las dietas con vitamina E, ésta no tuvo efecto sobre la actividad de las enzimas antioxidantes.

En un estudio realizado por Hernández *et al.* (2004), encontraron en cortes de 40 músculos envasados al vacío y provenientes de cerdos de diferentes razas (Pietrain, Landrace, Large-White, Ibérica, e Ibérica Duroc) que la actividad de CAT y SOD presentaron diferencias entre la raza de los cerdos, mientras que GPX no mostró diferencias. Las mayores diferencias entre razas se encontraron en la raza ibérica, donde la catalasa tuvo la mayor actividad.

2. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas de la industria cárnica son las elevadas pérdidas a causa de la descomposición de la carne fresca, principalmente por la acción de los microorganismos. Sin embargo, las reacciones de oxidación que involucran tanto a los lípidos como a las proteínas merecen atención ya que generan cambios en el color y disminución de la vida de anaquel en la carne, además de la aparición de compuestos tóxicos para la salud humana. Debido a que estas modificaciones en la carne se generan durante el almacenamiento se han implementado algunos métodos de prevención para poder prolongar la vida de anaquel; uno de estos métodos es proporcionar una dieta enriquecida con antioxidantes a los animales en el periodo de finalización de la crianza; generando así un aumento en las defensas antioxidantes y retardando la oxidación. Otra opción es utilizar un empaque adecuado, por ejemplo un empaque al vacío debido a que mejora notablemente la apariencia al consumidor y al mismo tiempo aumenta la vida de anaquel. A la fecha existen muy pocos estudios sobre los cambios que presenta la carne respecto al color, la oxidación de las proteínas, la variación de la presencia de antioxidantes endógenos durante el almacenamiento y el empaque. Dado que, los sistemas antioxidantes presentes en la carne son muy complejos y participan varios componentes se propuso monitorear la actividad de las principales enzimas antioxidantes (CAT, SOD y GPX) en conjunto con métodos químicos (DPPH• y FRAP) para evaluar la capacidad antioxidante, la oxidación lipídica así como la estabilidad del color, la oxidación de las proteínas y la producción de aminos biogénicas.

3. HIPÓTESIS

La suplementación de diferentes concentraciones de vitamina D₃ y 25-OH colecalciferol podría mejorar la capacidad antioxidante de la carne, por lo que se esperaría que al menos una de las dietas con vitaminas mejore la estabilidad oxidante en la carne durante el

almacenamiento tanto en un sistema de empaque al vacío como en un sistema de empaque permeable al oxígeno.

4. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto sobre la estabilidad oxidante y fisicoquímica en carne proveniente de cerdos suplementados con vitamina D₃ y 25-OH colecalciferol bajo dos sistemas de empaque (película permeable al oxígeno y empaque al vacío).

5.2 Objetivos particulares

- Monitorear la capacidad antioxidante en carne proveniente de cerdos alimentados con suplementos de vitamina D, mediante técnicas químicas como DDPH[•] y FRAP.
- Evaluar la variación de la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) en carne proveniente de cerdos alimentados con suplementos de vitamina D.
- Determinar la oxidación lipídica mediante la técnica de TBARS en carne de cerdo.
- Determinar la estabilidad del color mediante el índice de rojo (a^{*}) y el porcentaje de oximioglobina (omb) durante el almacenamiento de la carne de cerdo.
- Determinar la presencia de grupos carbonilo como indicadores de oxidación proteica utilizando la técnica de espectroscopia de fluorescencia y usando la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH).
- Determinar la presencia de aminas biogénicas como indicadores de frescura en carne

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó con el M. *Longissimus dorsi* obtenido de 80 cerdos progenie fertilis x G-Performer con un peso inicial de 85 kg. Se formaron dos bloques de 40 cerdos cada uno, los animales se aleatorizaron con base en peso y género para ser asignados a uno de los 10 tratamientos planteados (Tabla 2). Los cerdos se alimentaron a saciedad durante 35 días en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria Fisiología Ajuchitlan, Querétaro. Al día 36 se sacrificaron en el rastro Municipal de Querétaro (TIF No. 412, Carretera Chichimequillas Km 8.5 San José el Alto, Querétaro). A las 24 horas *postmortem* se realizó el despiece en el obrador TIF Apaseo S.A. de C. V. (TIF No. 202, Narciso Mendoza No. 408 Colonia Centro, Apaseo el Grande, Guanajuato). El músculo *Longissimus dorsi* izquierdo de cada animal se identificó y se cortó en 9 chuletas (partiendo del centro del lomo hacia los extremos) de 2 cm de grosor, los cortes se empacaron con película permeable al oxígeno (Marca CMar, Monterrey N. L. México, con espesor de 10 micrones y con permeabilidad al oxígeno de 500-30 000 cm³/m²•atm) y con bolsa de polietileno (Marca CMar, Monterrey N. L. México, con espesor de 65 micrones y con permeabilidad al oxígeno de ≤60 cm³/m²•dbar) cerrada al vacío (Empacadora al vacío Torrey® modelo EVD-2C76). Posteriormente, se almacenaron a 4 °C en una cámara de refrigeración durante un periodo de 28 días. El análisis se realizó los días 1, 7, 14, 21 y 28 para las muestras almacenadas al vacío y los días 1, 7, 14 y 21 para las muestras empacadas en película permeable al oxígeno.

Tabla 2. Dosis suministradas a los dietas de Vitamina D₃ y 25-OHD₃

Tratamiento	Vitamina D ₃ (IU/kg)	25-OHD ₃ (µg/kg)
1	----	----
2	500	----
3	2 000	----
4	20 000	----
5	40 000	----
6	----	12.5
7	----	50
8	----	500
9	----	1 000
10	Vitamina E, selenio y astaxantina	

6.1 Dietas y tratamientos

La Tabla 2 muestra los suplementos administrados en las dietas de los animales de estudio. El tratamiento 1, es un control negativo sin vitamina D adicionada. Los tratamientos 2 al 5 corresponden a dosis crecientes de Vitamina D₃ a partir de la fuente colecalciferol, mientras que los tratamientos 6 a 9 corresponden a la fuente 25-hidroxicolecalciferol. El tratamiento 10 es un control positivo con un suplemento que contiene diferentes compuestos conocidos por su acción antioxidante como son la Vitamina E, selenio orgánico y astaxantina.

6.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante métodos químicos

6.2.1 Obtención del extracto para determinar la actividad antioxidante y enzimática

Se homogenizaron 5 g de carne con 25 mL de buffer de fosfatos (50 mM, pH7) empleando un homogenizador IKA T18 Ultra Turrax (Staufen, Alemania). El homogenizado se centrifugó durante 30 minutos a 10,000 rpm y 4 °C (centrifuga 5810R Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y posteriormente se filtró a través de papel Wathman No. 4, el filtrado se colectó y almacenó en baño de hielo. Los ensayos se realizaron por triplicado

6.2.2 Determinación de la capacidad atioxidate mediante métodos químicos

6.2.2.1 Ensayo de DPPH

El método de basa en la reducción del radical DPPH[•] por los antioxidantes presentes en la muestra. La reacción se realizó conforme a lo reportado por Padilla *et al.* (2008), para lo cual se tomó una alícuota de 975 µL de la disolución del radical DPPH[•] (0.025 g/L en solución metanólica) y 25 µL del extracto de la muestra. Posteriormente, se leyó la absorbencia a 515nm inicial ($A_{t=0}$) y después de 30 min ($A_{t=30}$), usando un lector de placas Biotek Synergy HT (Vermont, USA). Se efectuó la curva de calibración con Trolox en concentraciones de 300 a 1600 µM, el resultado se expresó como equivalentes de mg de Trolox/100g de carne. El porcentaje de inhibición del radical DPPH[•] se calculo aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición del radical DPPH}^{\bullet} = (A_{t=0} - A_{t=30}) / (A_{t=0} * 10)$$

6.2.2.2 Ensayo del poder de reducción de hierro (FRAP)

Este método determina la capacidad de la muestra para reducir al hierro de la forma férrica a la ferrosa con 2-4-6 tripiridil-s-triazina (TPTZ); esta capacidad sobre el hierro se considera como un índice del poder antioxidante de la muestra. La determinación se realizó acorde a Descalzo *et al.* (2007) la técnica consistió en tomar una alícuota de 7 μL del extracto a la cual se le adicionó 273 μL de una disolución de FRAP 2.5 mL de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM, 2.5 mL de FeCl_3 20 mM y 25 ml de buffer de acetatos 0.3 mM, pH 3.6. Se utilizó un blanco espectro con TPTZ y un blanco reacción compuesto por la disolución de FRAP y el buffer con el que se homogenizó la muestra. Las absorbencias se determinaron a 593 nm y las lecturas se tomaron a los 6 min de iniciada la reacción. La curva estándar se realizó con Trolox de 20 a 150 μM , los resultados se expresaron como equivalentes μM de Trolox/100g de carne. Se calculó el porcentaje de reducción de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{[(\text{absorbencia de la reacción}_{t=6}) - (\text{absorbencia del blanco reacción})]}{[(\text{absorbencia de la reacción}_{t=6})]} * 100$$

6.3 Determinación de la capacidad antioxidante por técnicas enzimáticas

6.3.1 Determinación de la actividad de la catalasa (CAT)

El peróxido de hidrógeno puede absorber en el intervalo UV por lo tanto se puede monitorear su desaparición. La actividad de la catalasa se midió de acuerdo al método propuesto por Hernández *et al.* (2004). Se tomó un volumen de 0.1 mL del extracto obtenido en el apartado 6.3.1, el cual se hizo reaccionar con 2.9 mL de H_2O_2 11 mM, la absorbencia se leyó al inicio y durante los 30 segundos siguientes hasta completar 2 minutos, utilizando un espectrofotómetro Varian 50 Bio (Nueva Jersey, USA). Como blanco se empleó buffer de fosfatos 50 mM, pH=7. Se observó una disminución de la absorbencia respecto a la absorbencia inicial. Los resultados se expresaron como U/g de carne. La unidad de catalasa es definida por Aebi (1984) como la cantidad necesaria para descomponer 1 μmol de H_2O_2 por min, para determinar dicha actividad se utilizó el coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno que es de $0.0436 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Sigma Aldrich).

6.3.2 Determinación de la actividad de la Glutación Peroxidasa (GPX)

La actividad de la enzima glutación peroxidasa (GPX) se determinó de acuerdo al método propuesto por Hernández *et al.* (2004) con algunas modificaciones. El método se basa en la disminución de la absorbencia del NADPH por acción de dicha enzima en presencia del peróxido de hidrógeno. La mezcla de reacción se preparó con 880 μL de buffer de fosfato de potasio 40 mM, pH= 7, EDTA 0.5 Mm y Azida de sodio 1 mM, posteriormente se añadieron 16.6 μL de GSH (glutación reducido), 1 mM, 16.6 μL de glutación reductasa 1.5 U/mL y 50 μL de extracto crudo. Los tubos se incubaron durante 5 min a 35 °C, pasado este tiempo se adicionaron 16.6 μL de NADPH 0.15 mM y se inició la reacción adicionando peróxido de hidrógeno (0.15 mM) a las muestras. Se leyó la absorbencia después de 15 segundos de iniciada la reacción y se vigiló cada 10 segundos hasta completar un minuto. Se usó el coeficiente de extinción molar ($6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para calcular la concentración de NADPH. Los resultados se expresaron como U/100g de carne, una unidad de GPX es definida como la cantidad de extracto requerido para oxidar 1 μmol de NADPH por minuto.

6.3.3 Determinación de la actividad de la Superóxido dismutasa (SOD)

Se determinó mediante un kit para SOD (Sigma-Aldrich Co Alemania). El cual se fundamenta en que los aniones superóxido generados por la conversión de la xantina a ácido úrico y a peróxido de hidrógeno reducen la solución de trabajo (WST) a cristales de formazan que pueden medirse a 480 nm. Se diluyó 1 mL de la solución de trabajo (WST) en 19 mL de la solución de dilución de buffer (ambas soluciones se proporcionaron en el kit), la enzima de trabajo se activo centrifugando el tubo durante 5 segundos y diluyendo 15 μL en 25 mL de la solución buffer. Posteriormente se prepararon las diferentes muestras de acuerdo a la Tabla 3 para ser depositadas en la microplaca.

Tabla 3. Preparación de las muestras utilizadas en la determinación de SOD

	MUESTRA	BLANCO 1	BLANCO 2	BLANCO 3
Muestra	20 µL		20 µL	
Agua destilada		20 µL		20 µL
Solución de trabajo (WST)	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Enzima de trabajo	20 µL	20 µL		
Buffer de dilución			20 µL	20 µL

Una vez lista la microplaca se incubo a 37 °C durante 20 min transcurrido este tiempo se leyó la absorbencia a 450 nm utilizando un lector de placas. Se realizo una curva patrón utilizando como estándar SOD de eritrocitos de bovino para expresar los resultados en U/ g de carne.

6.4 Medición de la oxidación lipídica mediante la determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS).

6.4.1 Obtención del extracto para determinar la oxidación lipídica

Se pesaron 5 g de carne, los cuales se homogenizaron mediante un homogenizador IKA T 18 Ultra Turrax (Staufen, Alemania) con 20 mL de una solución de ácido tricloroacético (TCA), al 5% p/v durante 1 min. El homogenizado se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 20 min a 4 °C. Posteriormente, el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman del número cuatro, el filtrado se colectó almacenando a temperatura de 4±1 °C; los ensayos se realizaron por triplicado.

6.4.2 Determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico

Se tomó 1 mL del extracto obtenido como se describe en el apartado 6.4.1 y se le adicionaron 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 80mM, aplicando un tratamiento térmico a 94°C durante 30 min, se dejó enfriar y posteriormente se leyó su absorbencia a 530nm (Raharjo Sri *et al.*,

1992). Los resultados se reportaran en mg de malonaldehído (MDA)/kg de carne, utilizando el coeficiente de extinción molar de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.5 Medición del color

La evaluación de color se realizó con un colorímetro Hunter Lab Color Flex EZ (Hunter Lab, Reston Virginia, EUA) con iluminante D65, 10° y apertura 1.25". Se calibró el equipo acorde al fabricante y se tomó la lectura de la muestra por triplicado, rotándola 90° entre cada lectura. Se determinó una diferencia del color (ΔE) de las muestras durante el tiempo de almacenamiento. Utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

6.6 Medición de la oxidación proteica

6.6.1 Espectroscopia de fluorescencia

Los carbonilos totales se determinaron de acuerdo a Armenteros *et al.* (2009). Se pesaron 2 g de carne y se homogenizaron durante 1 min con 10 mL de buffer de fosfatos con 0.6N NaCl y pH 6, este extracto se colocó en una microplaca y utilizando un lector de placas se obtuvieron las unidades de fluorescencia, a una intensidad de 450 nm de emisión y 350 nm de excitación. Se reportó la intensidad de fluorescencia (AU).

6.6.2 Método del DNPH

Este método se realizó de acuerdo a Armenteros *et al.* (2009). Se pesaron 3 g de carne y se homogenizaron con 30 mL de buffer de pirofosfato compuesto por: 2 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 10 mM tris-maleato, 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 y 2 mM EGTA a pH 7.4 durante 30 s. De este homogenizado se tomaron dos alícuotas de 0.1 mL, posteriormente se les adicionó 1 mL de TCA al 10% p/v, se centrifugaron durante 5 min a 5000 rpm, se eliminó el sobrenadante, se tomaron 2 pellets del precipitado al primero de le adiciono 1 mL de HCl 2 N y fue etiquetado como muestra A, al segundo se le adiciono 1 mL de DNPH al 2% p/V en HCl 2 N y fue etiquetado como muestra B. Los tubos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente agitando cada 15 min, una vez transcurrido este tiempo se adicionó a cada tubo 1 mL de TCA

al 10%, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol/acetato de etilo (1:1), se agitó y se resuspendió el precipitado en 1.5 mL de buffer de fosfatos 20 mM a pH 6.5, con hidrocloreuro de guanidina 6 M. Se calculó la concentración de proteína a 280 nm de la muestra A usando como estándar albúmina de huevo y se calculo el contenido de carbonilos en la muestra B a 370 nm utilizado el coeficiente de extinción molar para las hidrazonas ($21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron en nmol de carbonilos por mg de proteína.

6.7 Determinación de aminas biogénicas

Este método se realizó de acuerdo a Quintero-Salazar (2001), se tomo una alícuota de 2 mL del extracto obtenido en el apartado 6.5.1 y se le adiciono 1 mL de NaOH 2N y 10 μL de cloruro de benzoilo, se agitó y se dejó reposar durante 20 min. Una vez transcurrido el tiempo se adicionó 2 mL de NaCl (5M) y se realizo una extracción con 3 mL de éter etílico, la fase orgánica se evaporó en un rotavapor IKA-Heizbath-250 (Staufen, Alemania) y posteriormente se disolvió con 500 μL de una mezcla metanol-agua (50:50). Finalmente se llevó a cabo un procedimiento cromatográfico utilizando un HPLC Agilent 1260 Infinity (California, USA) equipado con un detector UV y utilizando una columna Poroshell 120 C-18, con un tamaño de 4.6 mm X 50 mm y de tamaño de poro 2.7 μm ; la cual será equilibrada con 100% de la fase móvil A (metanol 55%). Alícuotas de 10 μL del extracto derivatizado se inyectaron al equipo utilizando un flujo de 0.5 mL/min y utilizado el gradiente de la Tabla 4.

Tabla 4. Gradiente de elución para aminas biogénicas

Tiempo (minutos)	Flujo (mL/min)	Fase A (Metanol 55%)	Fase B (Metanol 100%)
0	0.5	100	0
8	0.5	100	0
10	0.5	50	50
20	0.5	44	56
21	0.5	0	100
25	0.5	0	100
27	0.5	100	0
28	0.5	100	0

La detección se realizó a una longitud de onda de 256 nm y los resultados se expresaron en ppm, utilizando curvas estándar de cadaverina y putrescina.

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De los resultados obtenidos se realizó un análisis discriminante para cada tipo de empaque; utilizando el programa estadístico xLSTAT 2012 v.4.02 (Addinsoft SARL, New York, USA) empleando como criterio de clasificación el tratamiento aplicado (concentración de vitamina D). Una vez identificadas las variables con mayor correlación respecto a las funciones discriminantes se llevó a cabo una comparación múltiple de medias mediante la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) y se realizó una prueba de correlación entre las variables. Se informaron los promedios globales por tratamiento y los promedios por día de almacenamiento así como también la desviación estándar de las replicas por determinación.

7. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

7.1 Análisis discriminante

Una vez recibidas las chuletas de los 80 cerdos alimentados con diferentes dosis y fuentes de vitamina D, se realizaron las pruebas de capacidad antioxidante mediante la prueba de DPPH[•] y FRAP, actividad de las enzimas: catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD), diferencia en el color (ΔE), determinación de carbonilos totales como indicadores de oxidación proteica y determinación de fluorescencia emitida por los productos de oxidación de proteínas, oxidación lipídica y contenido de aminos biogénicas (putrescina y cadaverina) en las muestras con ambos tipos de empaque.

De los resultados obtenidos se realizó un análisis discriminante para cada tipo de empaque; utilizando el programa estadístico xLSTAT 2012 v.4.02 (Addinsoft SARL, New York, USA) empleando como criterio de clasificación el tratamiento aplicado (concentración de vitamina D). Al realizar dicho análisis se encontró que la prueba fue significativa ($p < 0.0001$) para ambos tipos de empaque, esto indica que existe diferencia entre los vectores medios de los tratamientos, por lo tanto, hubo una separación en grupos.

Para la construcción de las graficas de los centroides (Figura 4) de las muestras empacadas con película permeable al oxígeno se utilizaron la función 1 (F1) y 2 (F2), ambas funciones explican conjuntamente el 64.84% del comportamiento de los tratamientos. La F1 explica un 45.81% en donde se observa que el tratamiento 1 fue el que presentó correlación positiva con las variables FRAP (0.312) y DPPH[•] (0.301), el tratamiento 9 también presentó correlación positiva pero con las variables actividad enzimática de la catalasa (0.409) y actividad enzimática de la GPX (0.436), mientras que los tratamientos 5 y 6 presentaron correlaciones negativas con la variable oxidación lipídica (-0.306). La F2 explica el 19.03% del comportamiento de las variables en donde se observa que el tratamiento 4 presentó correlación negativa (-0.248) con la variable diferencia de color.

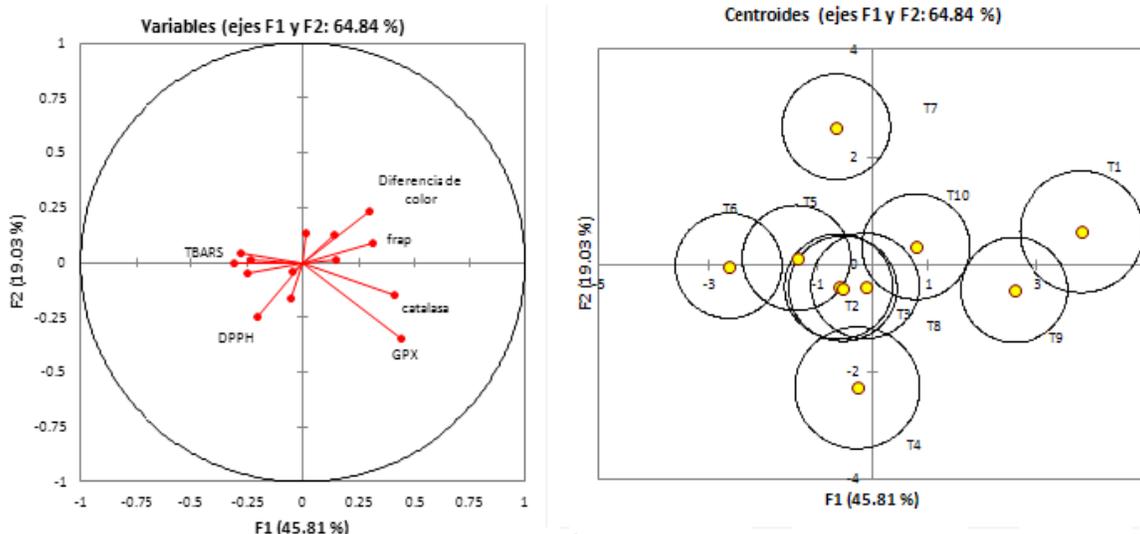


Figura 4. Gráficas de centroides correspondientes a las muestras empacadas con película permeable al oxígeno

Para la construcción de las graficas de los centroides (Figura 5) de las muestras empacadas al vacío se utilizaron la función 1 (F1) y 2 (F2) ambas funciones explican el 77.76% del comportamiento de los tratamientos. La F1 explica un 64.06% en donde se observa que el tratamiento 4 presenta una correlación positiva (5.034) con la variable diferencia de color. El tratamiento 5 y 6 mostraron correlación positiva en la F2 con las variables de capacidad antioxidante DPPH[•] y actividad enzimática de la GPX (0.244 y 0.262, respectivamente). El tratamiento 1 y 2 mostraron una correlación negativa en la F1 con la variable catalasa (-0.591), mientras que el tratamiento 7 y 8 mostraron una correlación positiva en la F1 con las variable oxidación proteica determinada mediante la producción de grupos carbonilo (0.463).

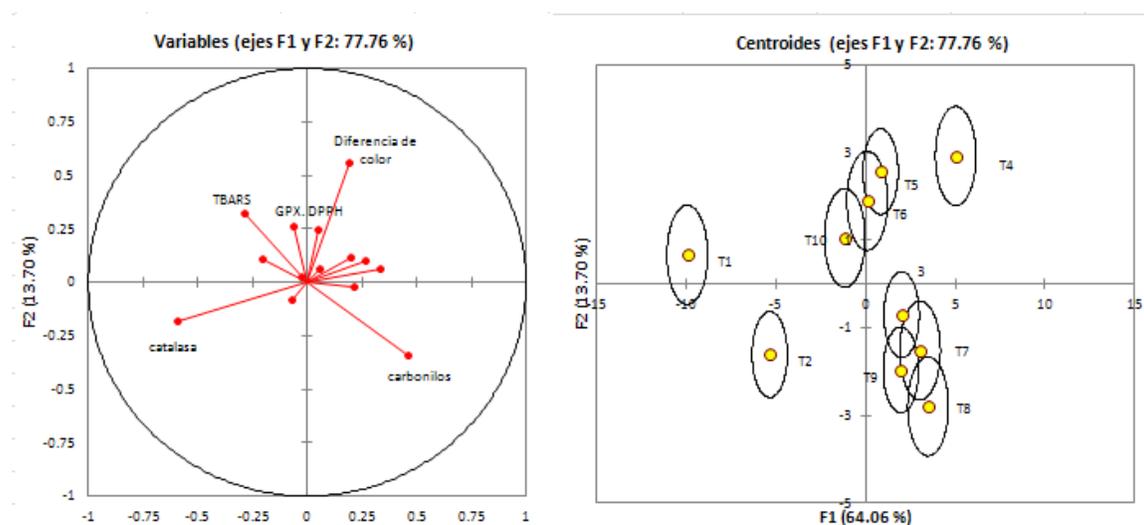


Figura 5. Gráficas de centroides correspondientes a las muestras empacadas al vacío.

Una vez identificadas las variables con mayor respuesta de correlación respecto a las funciones discriminantes se realizó un análisis de varianza (Tablas 5 y 9) para cada una de ellas y una prueba de diferencias de medias por Duncan, estas pruebas se muestran en la Tablas 7 y 11 (Anexo) en donde se encuentra un resumen de las medias por tratamientos para las variables analizadas en ambos tipos de empaque y sin tomar en cuenta el efecto del tiempo de almacén.

7.2 VARIABLES QUE FUERON SIGNIFICATIVAS EN EL ANALISIS DISCRIMINATE

7.2.1 Determinación de la actividad antioxidante mediante métodos químicos

7.2.1.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método del radical DPPH•

El análisis de varianza demostró que existe diferencia significativa para todos los factores del modelo (tratamiento, día e interacción tratamiento-día), en muestras con ambos tipos de empaque (Anexo, Tabla 5 y 9). Lo anterior indica que las dosis y fuente de vitamina D tuvieron efecto significativo ($P \leq 0.05$) sobre la actividad antioxidante determinada mediante el uso del radical DPPH•. En lo que respecta a la carne empacada con película permeable al oxígeno, las muestras de T1 mostraron la media global mayor ($21.104 \pm 2.69 \mu\text{M Trolox}/100\text{g}$ de carne) siendo igual a las muestras de T2 y T6 (19.61 ± 2.25 y $19.50 \pm 1.76 \mu\text{M Trolox}/100\text{g}$ de carne, respectivamente), mientras que las muestras de T9 mostraron la media global menor ($18.411 \pm 2.32 \mu\text{M Trolox}/100\text{g}$ de carne) siendo este tratamiento igual al resto de los tratamientos (Anexo, Tabla 7).

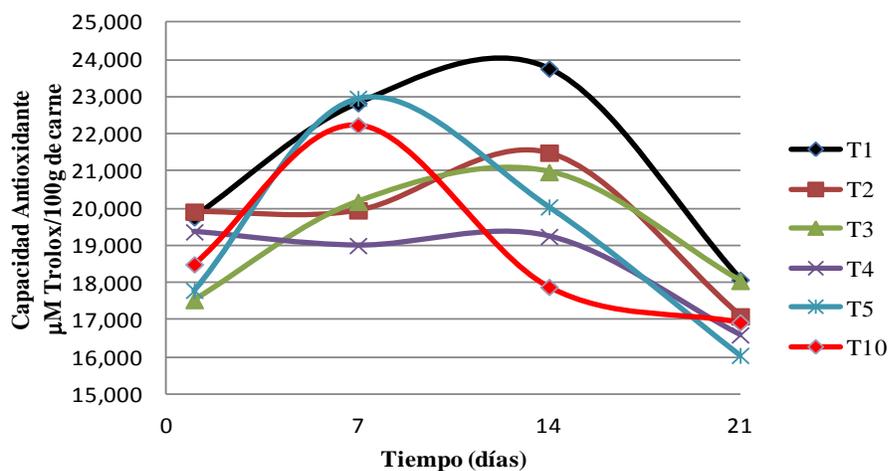


Figura 6. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de DPPH• en cortes de cerdos suplementados con vitamina D₃ y empacados con película permeable al oxígeno.

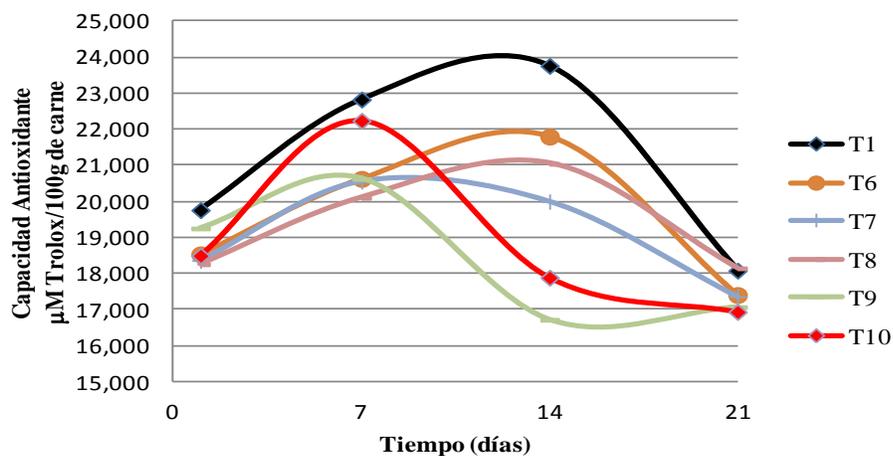


Figura 7. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de DPPH• en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol y empacados con película permeable al oxígeno

En las Figuras 6 y 7 se observa la variación de la actividad antioxidante de las muestras suplementadas con vitamina D. Las muestras de T1, T5, y T10 mostraron la mayor actividad antioxidante al día 7 (22.825 ± 1.78 , 22.960 ± 2.34 y 22.253 ± 2.55 μM Trolox/100g de carne, respectivamente), mientras que las muestras de T2, T3, T6 y T8 mostraron la mayor actividad (21.49 ± 2.56 , 20.97 ± 1.23 , 21.79 ± 2.76 y 21.041 ± 2.23 μM Trolox/100g de carne) al día 14. La menor actividad la presentaron las muestras de T5 al día 21 (16.04 ± 2.34 μM Trolox/100g de carne) y T9 al día 14 (16.88 ± 2.67 μM Trolox/100g de carne). Los tratamientos que mostraron mayor actividad indican que la defensa antioxidante se encuentra más activa. Algunos autores como Descalzo *et al.* (2007) y Jan *et al.* (1995) han sugerido que la defensa antioxidante se encuentra presente en la muestra durante los primeros 14 días de almacenamiento, posteriormente dicha actividad comienza a disminuir.

En la Figura 6 se observa que en las muestras de T4 la actividad antioxidante fue constante durante el tiempo de almacenamiento hasta el día 14, ya que en los demás tratamientos la actividad antioxidante aumentó con respecto al día 1, posiblemente debido a que algunos antioxidantes se encuentran más activos para poder atrapar los radicales libres presentes en la muestra.

En la Figura 7 se pueden observar las muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-hidroxicolecalciferol T6 y T7 fueron las que mostraron una actividad antioxidante mayor al día 14, es decir, estos tratamientos tuvieron la defensa antioxidante más activa.

La actividad de las muestras para T6 y T7 podrían considerarse como equivalentes a la actividad determinada en las muestras T2 y T3, ya que en estas muestras la respuesta de capacidad antioxidante fue parecida y la mayor actividad fue al día 14.

La prueba de correlación para las muestras con empaque permeable al oxígeno, fue positiva con la actividad enzimática de la catalasa (0.265), mientras que para la prueba de FRAP mostró una correlación negativa (-0.199) debido a que la actividad reductora disminuyó durante el tiempo de almacenamiento, finalmente con la concentración de TBARS la correlación fue negativa (-0.146) ya que la concentración de TBARS disminuyó después del día 7 y la actividad antioxidante de algunos tratamientos mostraron la mayor actividad al día 14, esta última correlación con la oxidación lipídica puede sugerir que los antioxidantes presentes en las muestras no fueron suficientes para disminuir la concentración de TBARS.

A continuación se muestran los resultados correspondientes a las muestras con empaque al vacío, en las cuales también la dosis y fuente de vitamina D presentaron efecto significativo sobre la actividad antioxidante.

En las gráficas 8 y 9 se observan las muestras de T10 que presentaron la media global mayor de actividad antioxidante ($26.27 \pm 0.74 \mu\text{M}$ Trolox/100g de carne) siendo igual a la actividad presentada por las muestras de T2, T3, T6, T7, T8 y T9 (23.22 ± 1.14 , 20.87 ± 0.47 , 23.82 ± 0.42 , $21.60 \pm$, 21.35 ± 0.97 y $21.73 \pm 0.91 \mu\text{M}$ Trolox/100g de carne, respectivamente), mientras que las muestras de T4 y T5 fueron diferentes a los demás tratamientos y presentaron la media global menor de actividad antioxidante (17.05 ± 1.37 , $19.85 \pm 0.34 \mu\text{M}$ Trolox/100g de carne, respectivamente, Anexo Tabla 11). Por lo tanto, se puede decir que las muestras correspondientes a los tratamientos con la mayor actividad antioxidante son las muestras en donde los antioxidantes se encuentran más activos, ya que corresponden a los mayores porcentajes de inhibición del radical y si se tiene mayor porcentaje de inhibición del radical quiere decir que los antioxidantes están inhibiendo en mayor cantidad la presencia de radicales

libres en la muestra. La mayor actividad antioxidante la presentaron todos los tratamientos al día 7, tanto en muestras provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃ como en muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, posteriormente la actividad disminuyó en todos los tratamientos a partir del día 14.

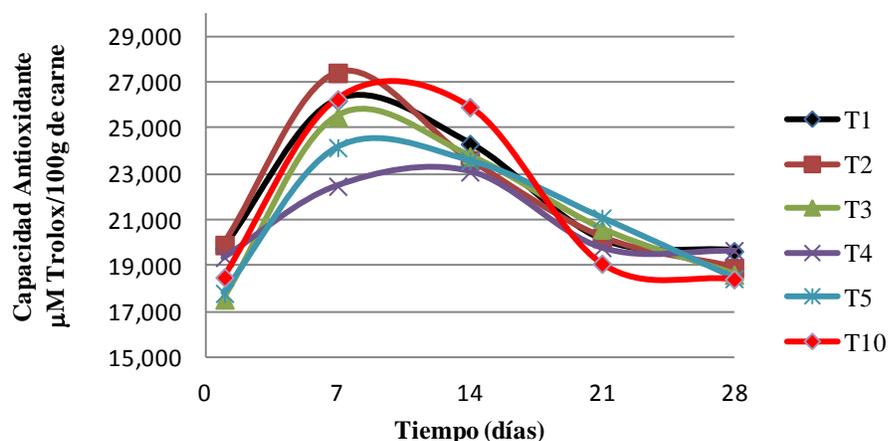


Figura 8. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de DPPH• en cortes de cerdos suplementados con vitamina D₃ y empacados al vacío.

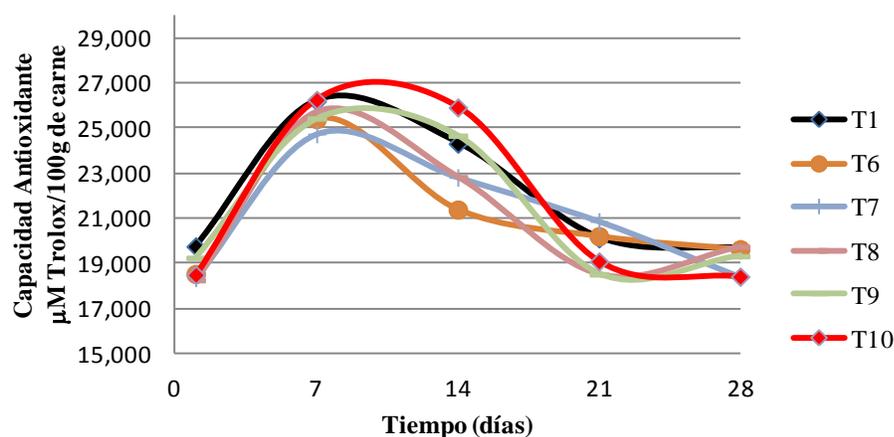


Figura 9. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de DPPH• en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol y empacados al vacío.

La prueba de correlación para las muestras con empaque al vacío mostró una correlación negativa (-0.086) con la concentración de TBARS, mientras que con la actividad reductora (FRAP), actividad de catalasa (CAT) y de glutatión peroxidasa (GPX) fueron correlaciones positivas (0.112, 0.081 y 0.136, respectivamente). La mayor concentración de TBARS fue al día 7 al igual que la mayor actividad antioxidante presentada en las muestras de los tratamientos, probablemente la cantidad de antioxidantes no fue suficiente para poder disminuir la producción de TBARS, ya que la oxidación lipídica no se puede detener solo retardar su velocidad de aparición en las muestras.

Las muestras de T10 (empacadas al vacío) mostraron la mayor actividad antioxidante, esto se podría deber a que la astaxantina presente en este tratamiento, pudo inhibir la aparición de radicales libres debido a que tiene una alta actividad antioxidante; dicha actividad se compara con la del β -caroteno. Sin embargo, es un compuesto altamente sensible que al encontrarse en presencia de la luz o de algún otro agente reductor puede disminuir su actividad antioxidante (Nalguib, 2000). Por otra parte, Palozza, P. y Krinsky, N.(1992) comentaron que al suplementar la dieta de ratas con astaxantina la producción de hidroperóxidos disminuyó debido a que es un potente antioxidante de membrana, aunque en dosis deficientes el efecto antioxidante no se observó.

Las muestras empacadas al vacío mostraron la media global mayor de actividad antioxidante ($21.315 \pm 5.67 \mu\text{M Trolox}/100\text{g}$ de carne) a pesar de que después del día 7 la actividad presentó una disminución hasta el día 28, por lo tanto este tipo de empaque podría estar manteniendo en mejores condiciones la defensa antioxidante.

Para retardar los procesos oxidantes se encuentran los sistemas antioxidantes endógenos, la primera línea de defensa antioxidante, tienen la función de inhibir la formación de especies reactivas de oxígeno y de radicales libres a través del secuestro de iones metálicos, por reducción de hidroperóxidos o peróxido de hidrógeno, captación del superóxido y del oxígeno singulete. Mientras que, los antioxidantes que actúan como segunda línea de defensa son aquellos que absorben radicales libres, los principales de este grupo son: la vitamina E, carotenoides y flavonoides, estos captan radicales e inhiben la reacción en cadena o reacción

de propagación. Sin embargo, al ser antioxidantes lipofílicos es muy común que conforme la membrana comienza a perder fluidez estos antioxidantes tienden a disminuir la capacidad de secuestrar radicales libres, lo cual se refleja en la disminución de la actividad antioxidante en la muestra, lo cual puede explicar la disminución de la actividad a partir del día 7 de almacenamiento en ambos sistemas de empaque.

Después del día 21 la actividad antioxidante ya no se puede atribuir únicamente a la presencia de antioxidantes, sino que también debe considerarse que la descomposición en la carne genera diversos compuestos, que probablemente podrían estar reaccionando con el DPPH• (Halliwell *et al.*, 1999).

Sardar *et al.* (1996) indicaron que la vitamina D₃ puede reducir la oxidación lipídica de la misma forma que la vitamina E; sin embargo, esto dependerá de las concentraciones que se administren y del modelo biológico a utilizar. Por otra parte, Wiseman (1993) propuso que la vitamina D₃ y su metabolito activo el 25-OH colecalciferol son antioxidantes de membrana ya que pueden inhibir la oxidación lipídica dependiente de hierro en los liposomas y proteger del daño oxidante a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), debido a que en su estructura poseen un grupo denominado ergosterol, el cual le confiere el poder antioxidante a la vitamina D₃ y a su metabolito activo. Además, tienen efectos en el metabolismo del calcio y del fósforo. Posiblemente debido a esto en los resultados obtenidos en este trabajo la actividad antioxidante disminuyó hasta el día 21. Hernández *et al.* (2011) observó en carne sin ningún tipo de suplementación que la actividad antioxidante disminuye durante el tiempo de almacenamiento observándose la menor actividad al día 8.

Por otra parte, Min *et al.* (2008) reportaron en lomo de cerdo al día 1 un porcentaje de inhibición de 69.24, al día 3 de 63.77% y día 7 de 60.11%, observándose que el porcentaje de reducción tendió a disminuir después del día 14, lo cual se observó también en este estudio probablemente el metabolito 25-OH colecalciferol y el empacado al vacío logren prolongar durante más tiempo el efecto antioxidante en la muestra, aunque debe tenerse cuidado con el exudado que pueda tener la muestra ya que en este exudado se podrían estar disolviendo algunos antioxidantes como las vitaminas; y con las condiciones de almacenamiento, ya que se

ha comprobado que el efecto de la temperatura elevada puede disminuir o desaparecer la defensa antioxidante (Jan *et al.*, 1995, Min *et al.*, 2008, Brand-Williams *et al.*, 1995).

Algunos autores han comentado que el 25-OH colecalciferol al ser el metabolito activo de la vitamina D₃, es mucho menos estable que la vitamina D₃ por lo tanto si su uso será en dietas, como fue el caso de este trabajo es importante almacenarlo en las condiciones adecuadas, probablemente debido a la falta de cuidado en la manipulación y almacenamiento no se observó una mejor actividad antioxidante en las muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol (Jan *et al.*, 1995, Min *et al.*, 2008, Brand-Williams *et al.*, 1995).

Finalmente, cabe mencionar que éste método es más adecuado para medir la actividad antioxidante en extractos vegetales y otros alimentos, ya que si se emplea para medir la actividad en plasma o suero las proteínas sarcoplásmicas precipitan con el metanol del medio de reacción. Por lo tanto, la bibliografía es escasa respecto al uso de este método, sin embargo, es altamente recomendable si se desea emplear en conjunto con otros métodos para determinar la capacidad antioxidante (Brand-Williams *et al.*, 1995).

7.2.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante la capacidad reductora del hierro

La técnica de FRAP (capacidad reductora del hierro en plasma, por sus siglas en inglés) determina la capacidad de la muestra para reducir el hierro de la forma férrica a la ferrosa por medio del trispiridil-s-triazina (TPTZ); esta capacidad reductora sobre el hierro se considera un indicador del poder antioxidante de la muestra (Descalzo *et al.*, 2007).

El análisis de varianza demostró que existen diferencias significativas para todos los factores (tratamiento, día e interacción tratamiento-día), en muestras empacadas con película permeable al oxígeno (Anexo, Tabla 5 y 9). La dosis y fuente de vitamina D tuvieron efecto significativo ($P \leq 0.05$) sobre la actividad reductora por la técnica de FRAP. En la Figura 11 se muestran los resultados correspondientes de las muestras empacadas con película permeable al oxígeno.

Las muestras de T1 que tuvieron la media global de $2.781 \pm 0.59 \mu\text{M}$ Trolox/100g de carne fueron las que presentaron la mayor actividad reductora (Anexo, Tabla 7) y no presentaron diferencia significativa con los demás tratamientos con excepción de las muestras de T4 que presentaron la menor actividad ($1.722 \pm 0.34 \mu\text{M}$ Trolox/100g de carne, Anexo Tabla 7). La capacidad reductora se modificó por efecto del tiempo de almacenamiento, observándose dicho efecto para ambas fuentes de suplementación de vitamina D (Figura 10 y 11).

Las muestras de todos los tratamientos mostraron su mayor actividad reductora al día 1, las muestras de T3, T1 y T2 mostraron la mayor actividad (4.959 ± 1.23 , 4.870 ± 1.56 y $4.327 \pm 1.45 \mu\text{M}$ Trolox/100g de carne) y las muestras que presentaron la menor actividad fueron de T6 y T4 (2.794 ± 1.34 y $2.321 \pm 1.45 \mu\text{M}$ Trolox/100g de carne). Sin embargo, a partir del día 7 y hasta el día 21 la actividad reductora comenzó a disminuir en las muestras de todos los tratamientos, siendo T3, T4, y T6 los que presentaron la menor actividad (1.369 ± 1.67 , 1.245 ± 1.32 y $1.496 \pm 1.26 \mu\text{M}$ Trolox/100g de carne) a ese día. Las muestras de T5 no presentaron variabilidad de la capacidad reductora a partir del día 7.

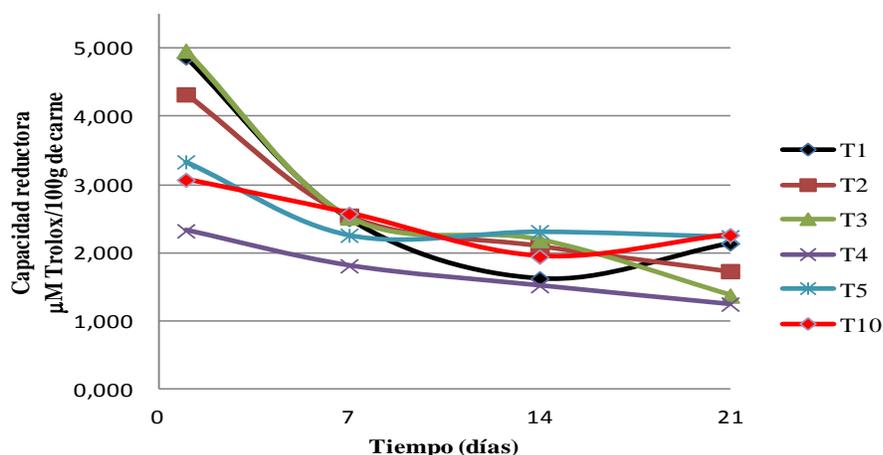


Figura 10. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de FRAP en cortes de cerdos suplementados con vitamina D_3 y empacados con película permeable al oxígeno.

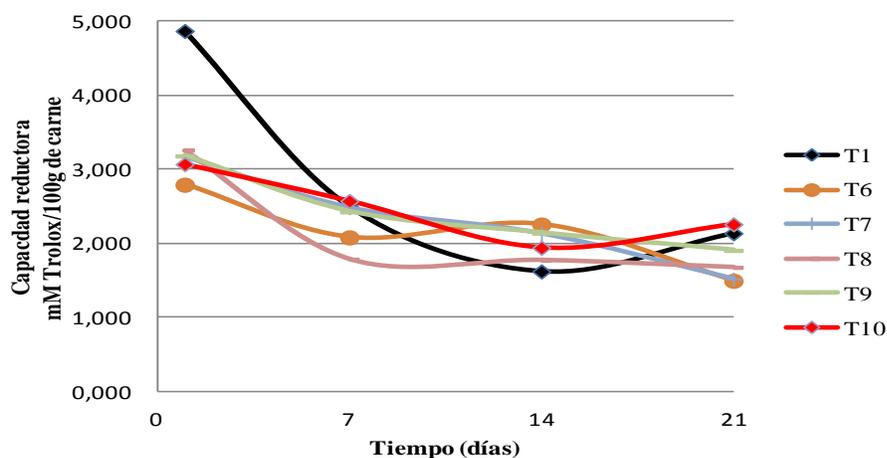


Figura 11. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de FRAP en cortes de cerdos alimentados con 25-OH colecalciferol y empacados con película permeable al oxígeno

En un trabajo previo realizado por Hernández *et al.* (2011) encontraron que en cortes de cerdo almacenados a 4 °C y empacados con película permeable al oxígeno, al día 5 comenzó a disminuir la actividad reductora y la menor actividad reductora se mostró al día 21, ambos estudios demostraron un comportamiento similar a lo encontrado en este estudio.

Por otra parte Min *et al.* (2008) encontraron disminución del poder reductor en carne de cerdo, ya que al inicio obtuvieron 6.75 μM de ácido ascórbico/g de carne y para el día 7 de almacenamiento disminuyó hasta 6.24 μM de ácido ascórbico/g de carne, lo cual coincide con lo encontrado en este trabajo.

En esta prueba participan varios compuestos reductores como el ácido ascórbico, NADPH y los compuestos tiol como el glutatión, los cuales están presentes en las células biológicas y son los principales responsables de la capacidad reductora del hierro, pero el más importante es el ácido ascórbico ya que dependiendo de la concentración en que se encuentre servirá como un antioxidante o un pro-oxidante, se ha sugerido que a bajas concentraciones es más probable que promueva la oxidación de los lípidos en tejidos musculares, mientras que a altas

concentraciones tiende a inhibir la oxidación de los lípidos por la regeneración de antioxidantes como el α -tocoferol en la membrana celular (Min *et al.*, 2008).

La disminución de la actividad reductora en las muestras de este trabajo, aparte de la oxidación del hierro, se pudo deber a que el ácido ascórbico es uno de los principales responsables de la reducción del hierro ya que puede servir como donador de electrones en procesos mediados por radicales libres. Sin embargo, al ser hidrosoluble probablemente su presencia se perdió en el exudado que presentaron algunas muestras y el remanente no fue suficiente para producir porcentajes de reducción mayores. Por otra parte, la disminución del porcentaje de reducción podría deberse a que cuando se emplea esta técnica en plasma o suero no es capaz de detectar la actividad antioxidante por los grupos sulfidrilo que se encuentran en el sistema glutatión, el cual constituye el mejor amortiguador redox en los tejidos animales por lo que dará valores ligeramente más bajos de los reales (Iris *et al.*, 1999).

Estos resultados demuestran que no todos los antioxidantes tienen la capacidad de reducir un compuesto en común y que una sola medición no debe utilizarse para indicar el estado oxidante en los músculos o en la carne, por ello, la capacidad reductora del hierro es un importante indicador del estado reductor de la muestra y se recomienda utilizar una técnica a la par para poder determinar la capacidad antioxidante total de la muestra (Descalzo *et al.*, 2007).

7.2.2 Determinación de la actividad de enzimas con capacidad antioxidante

7.2.2.1 Determinación de la actividad enzimática de la catalasa

Debido a que algunos estudios indican que los antioxidantes enzimáticos endógenos, especialmente la catalasa, al ser una enzima bastante estable puede minimizar la rancidez lipídica a lo largo del almacenamiento, únicamente en condiciones normales se podría desactivar por la temperatura (Pradhan *et al.*, 2000). En el análisis de varianza se observa que hay diferencia significativa para todas las variables de estudio (tratamiento, día e interacción tratamiento-día) en ambos tipos de empaque (Anexo, Tabla 5 y 9). Lo que indica que las dosis

y la fuente de vitamina D tuvieron efecto significativo ($P \leq 0.05$) sobre la actividad enzimática de la catalasa.

Las muestras de T1 presentaron la media global con mayor actividad enzimática (145.69 ± 6.81 U/g de carne) siendo igual a la actividad presentada por muestras de T2, T4, T8 y T10 (131.753 ± 3.43 , 127.17 ± 6.3 , 143.32 ± 4.97 y 136.28 ± 3.14 U/g de carne, respectivamente), mientras que la media global fue menor en las muestras de T3, T6 y T9 (118.360 ± 5.85 , 111.78 ± 14.66 y 117.93 ± 5.43 U/g de carne, respectivamente).

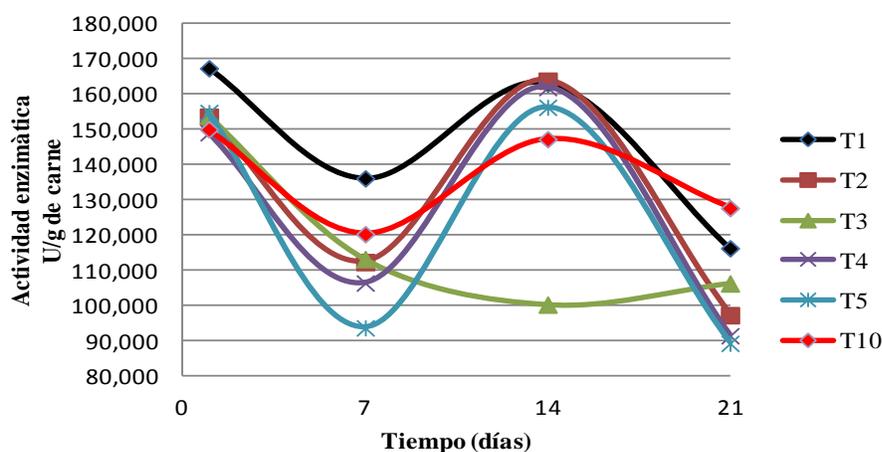


Figura 12. Variación en la actividad enzimática de la catalasa con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D_3 empacados con película permeable al oxígeno.

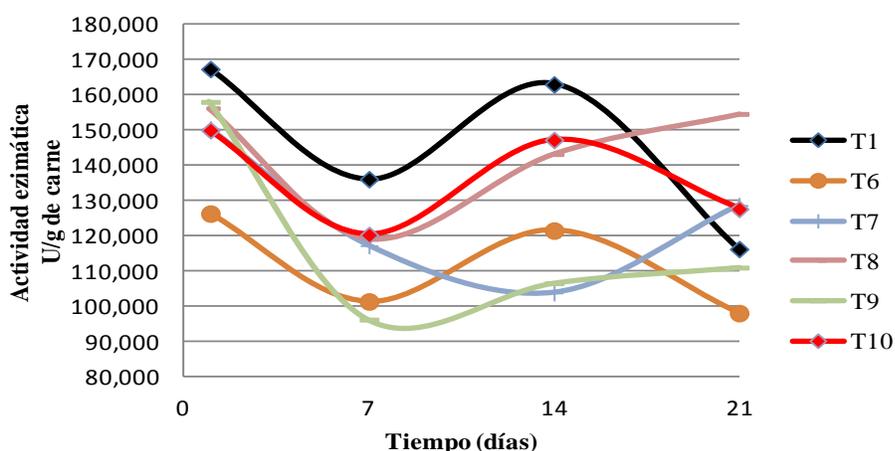


Figura 13. Variación en la actividad enzimática de la catalasa con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados con película permeable al oxígeno.

La interacción tratamiento-día para esta prueba fue significativa ($P \leq 0.05$), por lo tanto la actividad enzimática de la catalasa se modificó por efecto del tiempo de almacenamiento y la fuente de vitamina D (Figura 12 y 13).

Las muestras de T1 mostraron la mayor actividad enzimática al día 1 (167.405 ± 4.56 U/g de carne); por otro lado, las muestras de T2, T4, T5 y T8 presentaron su mayor actividad al día 14 (163.87 ± 4.23 , 161.93 ± 3.45 , 156.11 ± 3.45 y 143.25 ± 6.78 U/g de carne, respectivamente). Mientras que las muestras de T6 mostraron menor actividad enzimática al día 1 (126.31 ± 7.34 U/g de carne) al igual que las muestras de T2, T3, T4, T5, T7, T8 y T10 (153.62 ± 6.78 , 153.85 ± 7.56 , 140.07 ± 6.78 , 154.86 ± 6.98 , 150.44 ± 7.10 , 156.24 ± 7.45 y 150.02 ± 7.88 U/g de carne, respectivamente), la actividad enzimática se modificó durante el tiempo de almacenamiento en casi todos los tratamientos. Las muestras de T4 y T5 mostraron menor actividad enzimática al día 21 (91.35 ± 6.78 y 89.19 ± 7.14 U/g de carne).

En la Figura 12, se observa que las muestras de T3 presentaron poca variabilidad en la actividad enzimática en comparación con los demás tratamientos; además, de que en general las muestras presentaron la mayor actividad al día 1. Sin embargo, esta actividad se recuperó después del día 7, lo cual se contradice con lo reportado con la bibliografía ya que se ha encontrado que la actividad es mayor al día 7 que al día 1 (Hernández *et al.*, 2004), este comportamiento se pudo deber a que la enzima es muy estable por periodos largos de almacén bajo condiciones de pH y temperatura adecuadas.

Estos resultados sugieren que la actividad enzimática de la catalasa aumenta por presencia del sustrato, es decir, si hay mayor generación de peróxido de hidrógeno en la muestra, la enzima se encontrará más activa, por lo tanto al observar la Figura 12 se puede decir que en las muestras proveniente del T3 se encontró menor cantidad de peróxido de hidrógeno generado que en los demás tratamientos, posiblemente debido a que no existió una gran oxidación.

En la Figura 13 se observa una mayor diferencia de las muestras de T6 y T7, que mostraron la menor actividad enzimática, por lo tanto en estos tratamientos la generación de peróxido de hidrógeno fue menor que en los demás tratamientos. En ambas Figuras, se observa que las muestras de T1 (control negativo) mostraron la mayor actividad enzimática, lo cual fue una

respuesta esperada ya que al no tener ningún tipo de suplementación la producción de peróxido de hidrógeno en las muestras de este tratamiento fue mayor ya que no hubo un efecto protector a reacciones de oxidación.

La actividad enzimática de la catalasa en las muestras empacadas con película permeable al oxígeno tuvo una correlación negativa (-0.230) con la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPX), ya que esta enzima actúa durante los primeros días de almacenamiento y la catalasa presenta mayor actividad después del día 7 de almacenamiento, también presentó una correlación negativa (-0.308) con la concentración de TBARS debido a que la mayor concentración de TBARS se presentó al día 7 y la mayor actividad enzimática de la catalasa se observó hasta los últimos días de almacenamiento, en algunos tratamientos. Sin embargo, presentó una correlación positiva (0.366) con los valores de pH, lo cual corresponde a lo reportado por algunos autores que han observado que esta enzima posee una estabilidad en un intervalo de pH de 4 - 8 (García *et al.*, 1995; Gatellier *et al.*, 2005).

A continuación se muestran los resultados correspondientes a las muestras en empaque al vacío, en las cuales también la dosis y fuente de vitamina D tuvieron efecto significativo sobre la actividad enzimática de la catalasa.

Las muestras de T1 presentaron la media global mayor de actividad enzimática (149.56 ± 4.04 U/g de carne) siendo este tratamiento igual estadísticamente a los demás tratamientos con excepción de las muestras de T7, las cuales presentaron la menor actividad enzimática (111.90 ± 3.18 U/g de carne, Anexo Tabla 11).

En las Figuras 14 y 15 se observa el comportamiento de los tratamientos con respecto a la actividad enzimática de la catalasa, las muestras de T4 presentaron la mayor actividad enzimática al día 28 (193.055 ± 8.76 U/g de carne), al igual que las muestras de T2 y T3 (166.08 ± 9.23 y 189.68 ± 9.16 U/g de carne, respectivamente) que presentaron su máxima actividad al día 21; aunque las muestras de T3 tuvieron la misma actividad a los días 21 y 28. Las muestras de T1, T5, T7, T9 y T10 presentaron su mayor actividad al día 1 (167.40 ± 8.98 , 154.86 ± 9.23 , 150.44 ± 8.65 , 158.06 ± 8.54 y 150.02 ± 8.76 U/g de carne, respectivamente), todos los tratamientos presentaron una disminución en la actividad enzimática al día 7,

posteriormente dicha actividad comenzó a aumentar, aunque las muestras de T1, T2 y T5, presentaron la menor actividad enzimática al día 28 (78.06 ± 8.98 , 120.006 ± 9.23 y 109.96 ± 9.34 U/g de carne, respectivamente).

En la Figura 14 y 15 se observa que a partir del día 14 la actividad enzimática aumentó, siendo las muestras de T1 las que presentaron la mayor actividad enzimática. En las muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, se observa que la actividad enzimática fue menor que en las muestras provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃, por lo tanto la producción de peróxido de hidrógeno fue menor en las muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol.

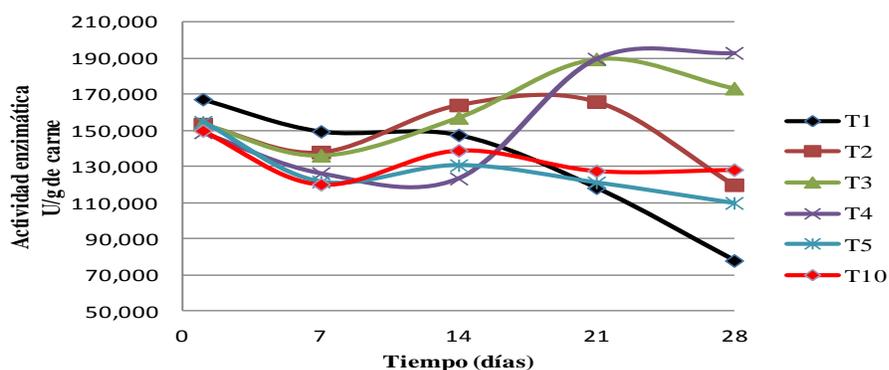


Figura 14. Variación en la actividad enzimática de la catalasa con respecto al tiempo de almacenamiento en cortes de cerdos suplementados con vitamina D₃, empacadas al vacío.

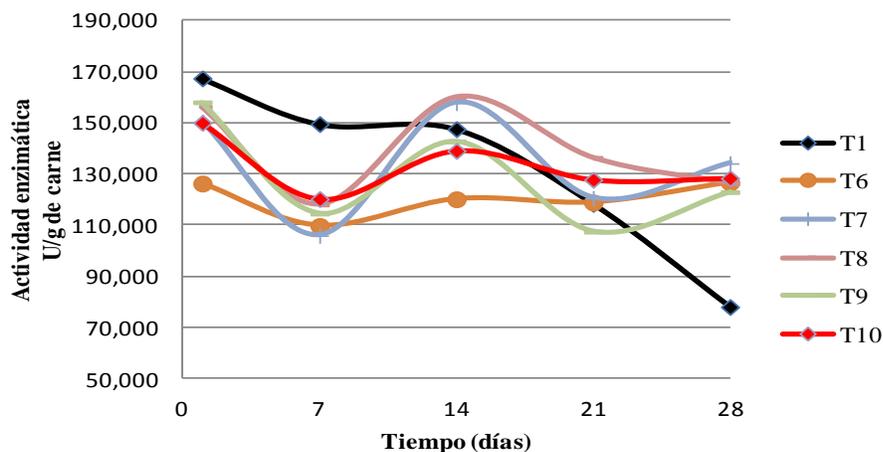


Figura 15. Variación en la actividad enzimática de la catalasa con respecto al tiempo de almacenamiento en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacadas al vacío.

La actividad enzimática de la catalasa en muestras con empaque al vacío obtuvo una correlación positiva (0.107) con los valores de pH; como se mencionó anteriormente esta enzima es muy estable entre valores de pH. Al igual que en las muestras con empaque permeable se obtuvo una correlación negativa (-0.136) con la actividad enzimática de la GPX debido a que esta enzima es más activa durante los primeros días de almacenamiento. La correlación con la concentración de TBARS fue negativa (-0.220) ya que cuando la actividad enzimática disminuye la concentración de TBARS aumenta observándose este efecto principalmente después del día 7, ya que las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico son estables hasta el día 7 de almacenamiento y posteriormente se transforman en algunos compuestos más estables como el hexanal.

Las muestras empacadas al vacío fueron las que presentaron la media global más alta (137.730 U/g de carne) en la actividad enzimática, lo cual no era lo esperado ya que se supone que el empaque al vacío le confiere mayor protección a las muestras contra la aparición de sustancias reactivas al oxígeno; sin embargo, en la carne empacada al vacío las bacterias lácticas son tolerantes y pueden proliferar; una característica de estas bacterias es que son catalasa negativa por lo tanto no tienen la capacidad de degradar peróxido de hidrógeno ocasionando que este se acumule en la carne y dado que la actividad enzimática está condicionada por la presencia de

sustrato probablemente la actividad enzimática de la catalasa en este tipo de empaque fuera mayor (Hiu, Guerreo, I., 2006, Konigsber., 2008).

Los reportes acerca de la actividad antioxidante de la catalasa son escasos a pesar de que se trata de una enzima crítica que se mantiene estable durante el almacenamiento de la carne fresca refrigerada (Pradhan *et al.*, 2000). En realidad la enzima glutatión peroxidasa (GPX) posee más afinidad por el peróxido de hidrógeno que la catalasa, sugiriendo que en condiciones normales la mayor parte del peróxido de hidrógeno es degradado por GPX. En general, se considera que bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimulan la actividad de GPX, mientras que altas concentraciones son preferentemente catalizadas por la catalasa (Avanzo *et al.*, 2001); esto se observa claramente al día 14 en algunas muestras que presentaron la mayor actividad enzimática a ese día, esto se debe a que el grupo *hemo* que posee la catalasa en su estructura se satura con el peróxido de hidrógeno y no sufre cambios conformacionales (Konigsberg *et al.*, 2008).

La actividad de la catalasa depende en gran medida de la especie animal que se esté considerando para el estudio. Renerre *et al.* (1996) observaron una actividad inferior en carne de pavo con respecto a otras carnes como cerdo o ternera; de acuerdo con Pradhan *et al.* (2000) la actividad de catalasa en el músculo de cerdo es el doble que en el de ternera.

Por otra parte, la actividad enzimática también se ve influida por el tipo de grasa en la dieta animal, de forma que al aumentar el grado de insaturación se observa un incremento de la actividad de la catalasa. Además, de que esta enzima es bastante estable aún después de 60 días en carne de cerdo, mientras que en carne de búfalo se ha observado su mayor actividad al día 15 de almacenamiento (Renerre *et al.*, 1996).

Según Rhee *et al.* (1996) la mayor actividad de catalasa en el músculo tiene que ver con el contenido de pigmentos, ya que la auto oxidación de la oximioglobina genera metamioglobina y el oxígeno producido por esta reacción podría formar peróxido de hidrógeno, esto podría explicar el hecho de que los músculos más pigmentados presenten un mecanismo de mayor protección, es decir una mayor actividad de la catalasa en comparación con los músculos con menor contenido de pigmentos. Hernández *et al.* (2001) determinaron una mayor actividad de

la enzima en pierna que en lomo de cerdo. Debido a que las especies reactivas al oxígeno (ERO) se generan principalmente en las mitocondrias, las cuales no poseen actividad catalasa e indica el importante papel de la enzima glutatión peroxidasa en la reducción de peróxido de hidrógeno (Pradhan *et al.*, 2000).

Sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo no fueron diferentes a lo reportado en la bibliografía; por lo tanto, a pesar de que si hubo separación de tratamientos se hubiera esperado que la actividad enzimática fuera mayor en los últimos días de almacenamiento y que no hubiera presentado variación durante el almacenamiento.

7.2.2.2 Determinación de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPX) se determinó con el objetivo de comprobar su presencia en la carne de cerdo y el efecto del tratamiento sobre su actividad. El análisis de varianza demostró que existe diferencia significativa para todos los factores del modelo (tratamiento, día e interacción tratamiento-día) en ambos tipos de empaque (Anexo, Tabla 5 y 9). Lo anterior indica que las dosis y fuente de vitamina D tuvieron efecto significativo ($P \leq 0.05$) sobre la actividad enzimática de GPX. A continuación, se muestran los resultados correspondientes a las muestras empacadas con película permeable al oxígeno.

Las muestras de T10 presentaron la media global mayor de actividad enzimática (5.737 ± 1.01 U/g de carne), siendo su comportamiento igual estadísticamente a las muestras de T1, T4, T6 y T9 (4.99 ± 0.78 , 5.40 ± 1.14 , 5.59 ± 1.68 y 5.44 ± 1.21 U/g de carne, respectivamente). Mientras que las muestras de T2 mostraron la media global menor de actividad enzimática (3.242 ± 0.83 U/g de carne) siendo la actividad igual estadísticamente a la de T3, T5 y T8 (4.20 ± 1.38 , 4.25 ± 0.69 y 3.76 ± 1.42 U/g de carne, respectivamente) pero diferente a los demás tratamientos.

La interacción tratamiento-día para esta prueba fue significativa ($P \leq 0.05$), por lo tanto, la actividad enzimática de la GPX se modificó por efecto del tiempo de almacenamiento y la fuente de vitamina D (Figura 16 y 17).

Las muestras de T10 mostraron la mayor actividad enzimática al día 7 (8.25 ± 1.23 U/g de carne) y no presento diferencia significativa con las muestras de T4, T5, T6 y T9 (7.64 ± 2.34 ,

6.46±2.22, 7.62±2.15 y 8.21±2.67 U/g de carne, respectivamente), mientras que T2 y T8 mostraron la menor actividad enzimática al mismo día (4.07±2.45 y 4.47±2.64 U/g de carne). Cabe señalar que la actividad enzimática para algunos tratamientos es menor al día 1, como sucedió en casi todos los tratamientos a excepción de T3 y T7 en donde la menor actividad se observó hasta el día 14 (2.91±0.97 y 2.65±0.67 U/g de carne, respectivamente), T2 y T5 presentaron su menor actividad al día 21 (2.99±0.56 y 2.54±0.88 U/g de carne, respectivamente).

Las muestras de T2 presentaron la menor actividad enzimática y se mantuvieron estables durante el tiempo de almacenamiento (Figura 16, T2 y Figura 17, T8) ya que después del día 1 no presentó cambios en la actividad enzimática, mientras que los demás tratamientos incluido T10 (control positivo) mostraron su mayor actividad al día 7 probablemente estos tratamientos podrían ser equivalentes en dosis y efecto.

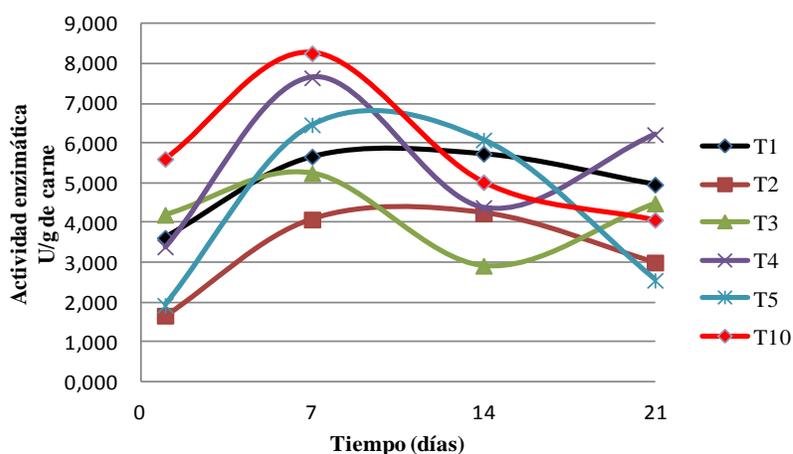


Figura 16. Variación en la actividad enzimática de la GPX con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D₃, empacados con película permeable al oxígeno

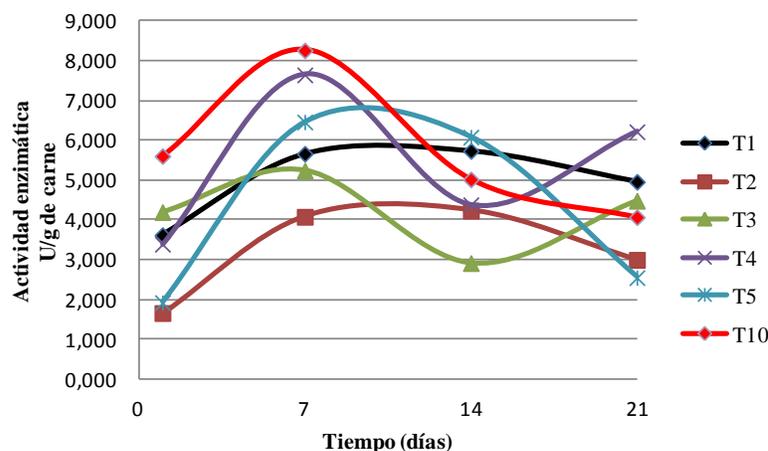


Figura 17. Variación en la actividad enzimática de la GPX con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados con película permeable al oxígeno.

La actividad enzimática en las muestras empacadas con película permeable al oxígeno presentó una correlación negativa (-0.402) con el pH, lo cual indica que mientras el pH aumentó ligeramente la actividad enzimática disminuyó lo cual coincide con lo reportado por algunos autores (De Vore *et al.*, 1982; Gatellier *et al.*, 2005). La correlación con la concentración de TBARS fue positiva (0.242) ya que ambas pruebas mostraron su mayor actividad y concentración, respectivamente al día 7.

A continuación se muestran los resultados correspondientes a las muestras en empaque al vacío, en las cuales también la dosis y fuente de vitamina D tuvieron efecto significativo sobre la actividad enzimática de GPX.

Las muestras de T1 mostraron la mayor actividad enzimática para GPX (10.61 ± 0.47 U/g de carne) siendo diferente a las muestras de los demás tratamientos, las muestras de T10 fueron diferentes y mostraron la misma actividad que las muestras de T5, T8 y T9 (6.15 ± 1.04 , 6.13 ± 1.29 y 6.50 , respectivamente U/g de carne), mientras que las muestras de T3 fueron las que mostraron la media global de menor actividad (2.34 ± 0.70 u/g de carne) e igual a T2, T4, T6 y T7 (4.26 ± 0.1 , 3.65 ± 1.39 , 4.14 ± 0.93 y 3.41 ± 0.82 U/g de carne, Anexo, Tabla 11). La

actividad enzimática de la GPX se modificó por efecto del tiempo de almacenamiento, observándose dicho efecto para ambas fuentes de vitamina D (Figura 20 y 21).

En la Figura 18 se observa que T1 (control negativo) mostró una mayor actividad enzimática, lo cual sería una respuesta esperada ya que si la actividad enzimática aumenta con la presencia de sustrato, en este caso peróxido de hidrógeno, entonces se reflejara en mayor actividad, esto se podría complementar que al día 1 se muestra la menor actividad enzimática y al transcurrir el tiempo de almacenamiento dicha actividad aumenta por la presencia de peróxido de hidrógeno en las muestras. Además se observa que T3 mostró la menor actividad enzimática, mientras que el T2, T4 y T5 presentaron una tendencia parecida entre ellos.

En la Figura 19, se observa que las muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol mostraron una mayor estabilidad durante el almacenamiento en comparación de las muestras provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃

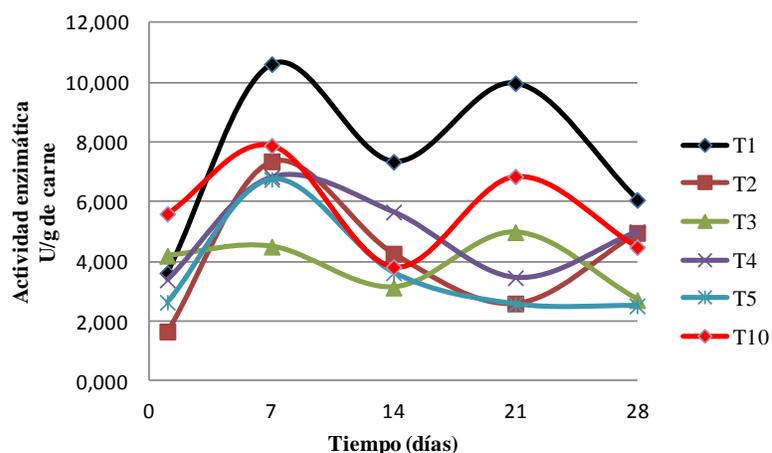


Figura 18 Variación en la actividad enzimática de la GPX con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D₃, empacados al vacío.

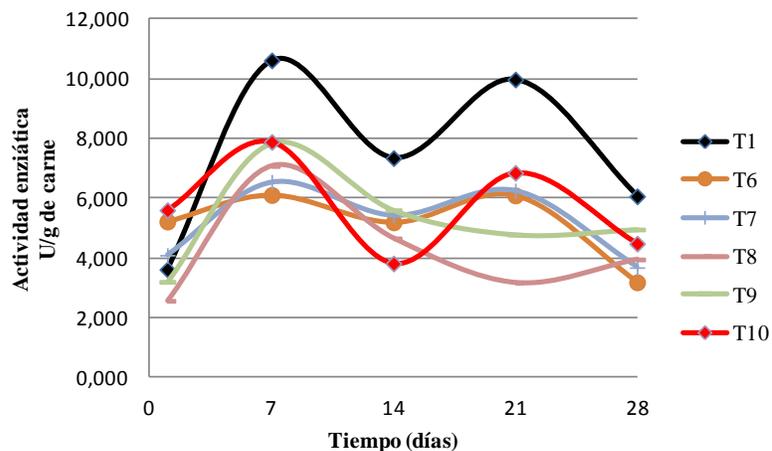


Figura 19. Variación en la actividad enzimática de la GPX con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío.

Las muestras de T1 presentaron la media global mayor de actividad al día 7 (7.524 ± 0.47 U/g de carne) siendo igual a la actividad presentada por las muestras de T10 y T9 (5.727 ± 0.80 y 5.279 ± 0.36 , respectivamente U/g de carne) al mismo día. Sin embargo, las muestras de T4, T5, T6, T7, (6.84 ± 1.23 , 6.75 ± 1.56 , 6.11 ± 1.76 y 6.54 ± 1.78 U/g de carne, respectivamente) presentaron su mayor actividad al día 7. La media global menor de actividad la presentaron las muestras de T2 (1.65 ± 0.65 U/g de carne) al día 1 siendo igual a la actividad de las muestras de T1, T5, T8 y T9 (3.61 ± 1.12 , 2.63 ± 0.98 , 2.56 ± 0.76 y 3.20 ± 1.12 U/g de carne, respectivamente) al mismo día. Las muestras de T3, T5 y T6 (2.71 ± 0.78 , 2.51 ± 1.01 y 3.18 ± 0.67 U/g de carne, respectivamente) mostraron su menor media global de actividad al día 28.

La prueba de correlación fue negativa (-0.046) con respecto a la concentración de TBARS y pH (-0.046), lo cual sugiere que mientras el pH aumenta la actividad enzimática disminuye, esto es una respuesta igual a la mostrada por las muestras empacadas con película permeable al oxígeno. La correlación con la actividad enzimática de la catalasa también fue negativa (-0.105) ya que catalasa mostró mayor actividad después del día 7 y la GPX mostró mayor

actividad al día 7. Las muestras no presentaron diferencia en la actividad enzimática por efecto del tipo de empaque utilizado.

La disminución de la actividad a partir del día 21, se podría deber a que el sistema glutatión GSH/GSSG, es uno de los mayores sistemas redox en los tejidos animales y se utiliza para manifestar la actividad de la GPX, por lo tanto, si no se encuentra en cantidades significativas, como en el caso de animales alimentados con pasto su presencia disminuye durante el almacenamiento a través del exudado en la carne (Descalzo *et al.*, 2007). En este trabajo se mantuvo la actividad enzimática hasta el día 28 en las muestras empacadas al vacío y con 25-OH colecalciferol, por ello, esta fuente se podría utilizar para mantener el sistema glutatión durante más tiempo.

Los resultados de las muestras de T10 empacadas al vacío, podría deberse a que la vitamina E y la suplementación con selenio pudieron disminuir la actividad, debido a que las concentraciones altas de vitamina E pueden actuar como pro-oxidante en vez de antioxidante y esto se refleja en que el músculo no tenga la capacidad para poder sintetizar glutatión peroxidasa, por lo tanto, no habría un aumento en la actividad enzimática (Skrivanova *et al.*, 2007).

La fuente de selenio también es importante para manifestar la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa, ya que las sales inorgánicas como el selenito de sodio pueden proporcionar menor cantidad de selenio y es absorbido por difusión pasiva, mientras que el selenio orgánico es absorbido en el intestino delgado y se puede transformar a selenocisteína, compuesto que puede incrementar la actividad de la glutatión peroxidasa (Juniper *et al.*, 2009). El efecto que tiene el selenio indudablemente se atribuye al efecto que tengan los diferentes pasos metabólicos para la incorporación del selenio a la glutatión peroxidasa (Matte, 2007).

Los valores de la actividad de la GPX obtenidos en este trabajo oscilaron entre 3.45 y 8.10 U/100g de carne, los cuales son inferiores a los obtenidos por Hernández *et al.* (2004); ellos reportaron entre 17.7-22.7 U/100g de carne, esta diferencia podría deberse a que no se utilizaron las mismas razas de cerdos ni el mismo tipo de alimentación y condiciones de empaque. Además de que la actividad de la GPX depende de distintos factores. Mei *et al.*

(1994) encontraron en músculo de pollo una actividad enzimática superior a la encontrada en el músculo de cerdo y estos datos son hasta seis veces mayores en ternera que en cerdo.

También se ha descrito la variación de la actividad de la enzima GPX dentro de una misma especie alimentada con una dieta en función del tejido estudiado, en la mayoría de los casos la actividad de la GPX en músculos rojos fue superior a la de los músculos blancos. Lauridsen *et al.* (1999) encontraron que en el músculo proveniente de la pierna del cerdo hay una mayor actividad en comparación de la determinada en lomo de cerdo, debido a que posiblemente se produce una inducción de la actividad de la enzima en los tejidos sensibles al estrés oxidante, estas evidencias conducen a señalar que la enzima GPX actúa como un mecanismo de protección celular frente al daño oxidante.

7.2.3 Oxidación lipídica mediante la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Existen sustancias capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA), las cuales aparecen en cantidades sustanciales a partir de la oxidación de los ácidos grasos que contienen tres o más dobles enlaces, una de esas sustancias es el malonaldehído (MDA), este procede en gran parte de la descomposición de los endoperóxidos, dando una coloración roja al reaccionar con el TBA.

El análisis de varianza mostró que existe diferencia significativa para los factores del modelo: día e interacción tratamiento-día, en ambos tipos de empaque. Lo anterior indica que la dosis y fuente de vitamina D no tuvieron un efecto significativo sobre la oxidación lipídica (Anexo, Tabla 5 y 9). A continuación, se muestran los resultados correspondientes a las muestras empacadas con película permeable al oxígeno. Todos los tratamientos no presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) al día 7 donde se determinó la mayor concentración de TBARS. Las muestras de T6 y T8 presentaron la menor media global en la concentración de TBARS (0.854 ± 0.35 y 0.916 ± 0.41 mg MDA/kg de carne, respectivamente), mientras que las muestras que presentaron la mayor media global en la concentración de TBARS fueron el T1, T2 y T5 (1.017 ± 0.44 , 1.077 ± 0.45 y 1.015 ± 0.19 mg MDA/kg de carne, respectivamente). Las

muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol presentaron la menor concentración de TBARS.

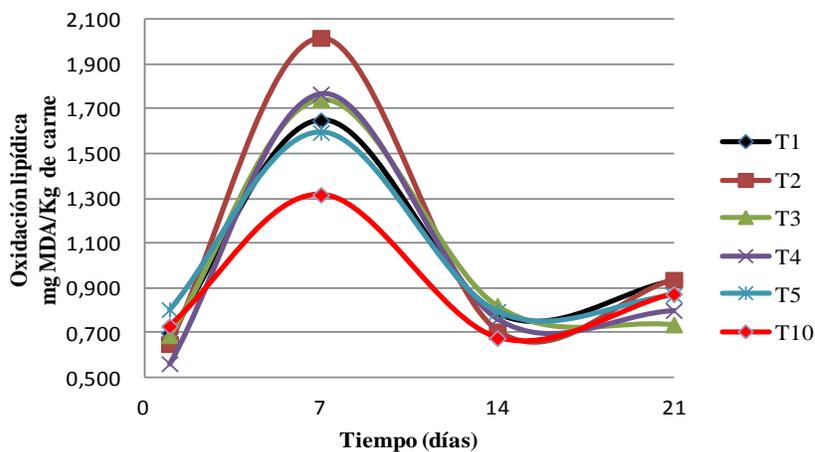


Figura 20. Variación en TBARS con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdo suplementados con vitamina D₃, empacadas con película permeable al oxígeno..

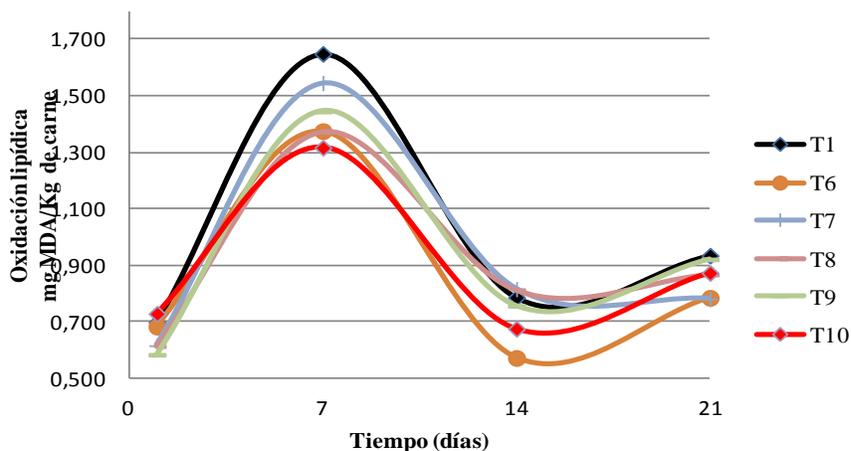


Figura 21. Variación en TBARS con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdo suplementados con 25-OH colecalciferol, empacadas con película permeable al oxígeno.

Las muestras empacadas con película permeable al oxígeno presentaron una correlación negativa (-0.230) con la actividad enzimática de la catalasa y con los valores de pH (-0.402), mientras que una correlación positiva (0.242) con la concentración de carbonilos totales.

A continuación, se muestran los resultados correspondientes a las muestras con empaque al vacío, en las cuales únicamente hubo efecto significativo en el tiempo de almacenamiento

sobre la concentración de TBARS (Anexo, Tabla 9). Las muestras con empaque al vacío no presentaron diferencias significativas por tratamiento (Anexo, Tabla 11) sino únicamente por efecto del tiempo de almacenamiento ($P \leq 0.05$), observándose la mayor concentración de TBARS al día 7 (Figura 22 y 23) y con la disminución en la concentración al transcurrir los días de almacenamiento. Las muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol que mostraron la menor media global de concentración de TBARS fueron de T5, T7 y T8 (0.831 ± 0.29 , 0.823 ± 0.22 y 0.764 ± 0.33 mg MDA/kg de carne) y los que presentaron la mayor media global en concentración de TBARS fueron las muestras de T1, T2, y T10 (0.881 ± 0.48 , 0.917 ± 0.49 y 0.926 ± 0.36 mg MDA/kg de carne).

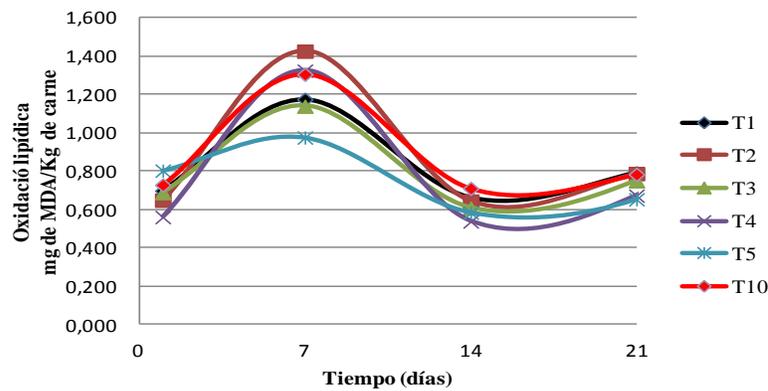


Figura 22. Variación en TBARS con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdo suplementados con vitamina D₃, empacadas al vacío.

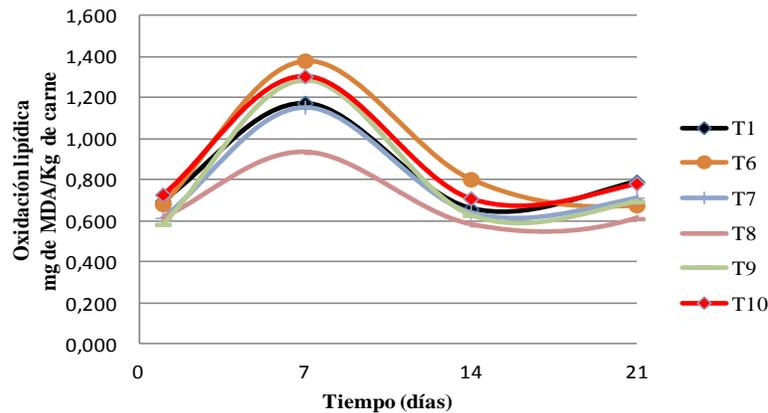


Figura 23. Variación en TBARS con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdo suplementados con 25-OH colecalciferol, empacadas al vacío.

Esta prueba mostró correlación negativa (-0.092) con los valores de pH, así como con la capacidad antioxidante mediante DPPH (-0.086) y con la actividad reductora FRAP (-0.211); mientras que con la concentración de carbonilos fue positiva (0.130) al igual que con la intensidad de fluorescencia (0.063).

La correlación positiva entre la concentración de TBARS y la concentración de carbonilos se puede deber a que el MDA puede tener interacciones entre los grupos amino libres de las proteínas y los productos secundarios de la oxidación lipídica (aldehídos) y conducir a la formación de productos de oxidación proteica que tienen capacidad de emitir fluorescencia (Kagan V., 1986). Durante el almacenamiento en refrigeración de carne de porcino se ha demostrado la interacción de los productos provenientes de la oxidación lipídica con las proteínas que pueden generar compuestos capaces de emitir fluorescencia con características similares a las presentadas por las lipofuscinas (Renner *et al.*, 1996).

El tipo de empaque para la concentración de TBARS arrojó diferencias significativa ($P \leq 0.05$), ya que las muestras que presentaron la media global mayor de TBARS fueron las almacenadas en película permeable al oxígeno (0.964 mg MDA/kg de carne), lo cual era lo esperado, ya que este tipo de empaque permite que la concentración de oxígeno sea elevada así como también, permite el paso de la luz que es un importante catalizador en la formación de radicales libres para que posteriormente estos radicales libres desencadenen las reacciones de oxidación lipídica.

Min *et al.* (2008) han reportado 0.12 mg de MDA/kg de carne fresca de cerdo y 0.25 mg de MDA/kg de carne al día 7 de almacenamiento; lo cual difiere con los resultados de este estudio que oscilan entre 0.773 y 1.221 mg de MDA/kg de carne. Esto se podría deber a la variación entre las especies como edad, género, raza y tipo de alimentación; así como al tipo de corte que se está utilizando, ya que al ser un corte completo no se rompe el tejido muscular y no se mezcla el contenido celular con el oxígeno, de esta forma los compuestos pro-oxidantes no acceden hasta los ácidos grasos quedando desprotegidos los fosfolípidos de la membrana, que es donde se cree que inician las reacciones de oxidación lipídica (Descalzo *et al.*, 2008a).

Por otra parte la estabilidad de la carne de los animales monogástricos puede afectarse más fácilmente a través de la dieta, Buckeley *et al.* (1996) investigaron que la suplementación de la dieta con 200 mg de acetato de tocoferilo durante 35 días aumentaba la estabilidad en las membranas y en la calidad de la carne, disminuyendo la oxidación lipídica en los tejidos. Esta suplementación aumenta la presencia de antioxidantes endógenos como la carnosina y enzimas antioxidantes, los cuales actúan retardando la oxidación lipídica (Gatellier *et al.*, 2005).

La mayor concentración de malonaldehído se presentó al día 7, posteriormente la concentración disminuyó; algunos autores (Badiu, 2009, Chelch *et al.*, 2007) han señalado que el contenido de MDA disminuye, debido a que la carne al ser una matriz muy compleja produce muchos tipos de compuestos durante el almacenamiento, entre los más importantes están los carbonilos provenientes de la oxidación de las proteínas, los cuales podrían obstruir la interacción con el TBA ocasionando una disminución en la concentración del MDA determinado (Badui, 2009). Además, se observa que los antioxidantes endógenos no mostraron actividad suficiente para retardar por más tiempo la oxidación lipídica. Chelch *et al.* (2007) encontraron una disminución en la concentración de TBARS en carne de cerdo similar en este estudio a pesar de que habían altas concentraciones de oxidantes este comportamiento se debió a la descomposición del MDA en compuestos volátiles o bien a que reaccionó con cadenas proteicas.

De acuerdo a Lahucky *et al.* (2007), la vitamina D₃ redujo la concentración de TBARS en el *M. Longissimus dorsi*, en comparación con su muestra control, por ello, sugieren su uso; sin embargo, proponen que el efecto que proporciona la vitamina D₃ en combinación con vitamina E podría disminuir la presencia de TBARS durante el tiempo de almacenamiento.

Por otra parte, Carnagey *et al.* (2008) a pesar de utilizar otra especie animal (bovinos) y diversas dosis de 25-OH colecalciferol como suplemento en dietas, la concentración de TBARS disminuyó en las muestras empacadas al vacío, lo cual es similar a lo obtenido en este trabajo, debido a la menor disponibilidad de oxígeno que retrasa la oxidación lipídica en comparación con muestras empacadas con película permeable al oxígeno

7.2.4 Determinación de la diferencia del color (ΔE)

El color ocupa un lugar preferente entre los indicadores que definen la calidad de la carne; esta puede ser rechazada por su color sin valorar otras propiedades como aroma, textura y sabor. El almacenamiento prolongado en empaque permeable al oxígeno induce la transformación de la oximioglobina (color rojo brillante) en metamioglobina (marrón), este cambio disminuye el enrojecimiento haciendo que la carne sea inaceptable para los consumidores (Filgueras *et al.*, 2010).

El análisis de varianza mostró que existe diferencia significativa para todos los factores en el modelo (tratamiento, día e interacción tratamiento-día), en muestras con ambos tipos de empaque. Lo anterior indica que las dosis y fuente de vitamina D tuvieron efecto significativo ($P \leq 0.05$) sobre la diferencia del color durante el tiempo de almacenamiento (Anexo, Tabla 5 y 9). A continuación se muestran los resultados correspondientes a las muestras empacadas con película permeable al oxígeno.

Las muestras de T7 fueron las que presentaron la media global más alta en color (6.287 ± 0.55), es decir, estas muestras fueron las que mostraron la mayor diferencia en el color durante el tiempo de almacenamiento, siendo únicamente diferente estadísticamente a las muestras de T6, T8 y T9, los cuales mostraron las medias más bajas (4.571 ± 0.52 , 4.594 ± 0.48 y 4.712 ± 0.45 , respectivamente).

Las muestras de T7 y el T2 mostraron la mayor diferencia en el color al día 14 (7.039 ± 2.67 y 6.928 ± 1.78 , respectivamente) pero presentaron el mismo comportamiento que el resto de los demás tratamientos, a excepción de T6 que mostró la menor diferencia (3.288) al día 7 de almacenamiento. Sin embargo, las muestras de este tratamiento fueron estadísticamente diferentes a las muestras de T8, T9 y T10 (3.38 ± 0.98 , 4.00 ± 1.23 , 3.81 ± 1.34 , respectivamente), que mostraron la menor diferencia de color al día 7 (Figura 24 y 25).

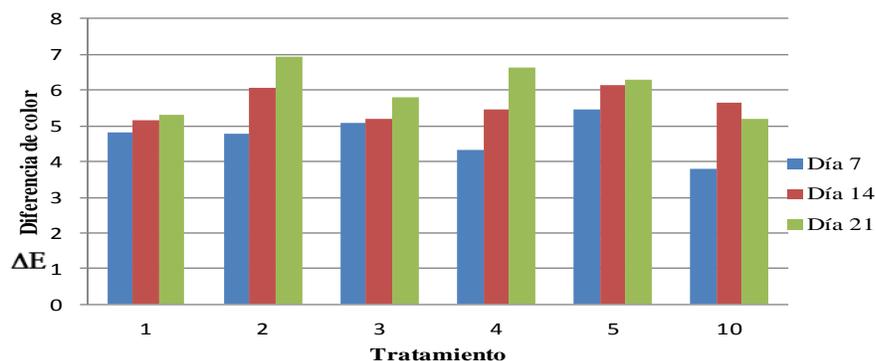


Figura 24. ΔE con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D_3 , empacados con película permeable al oxígeno.

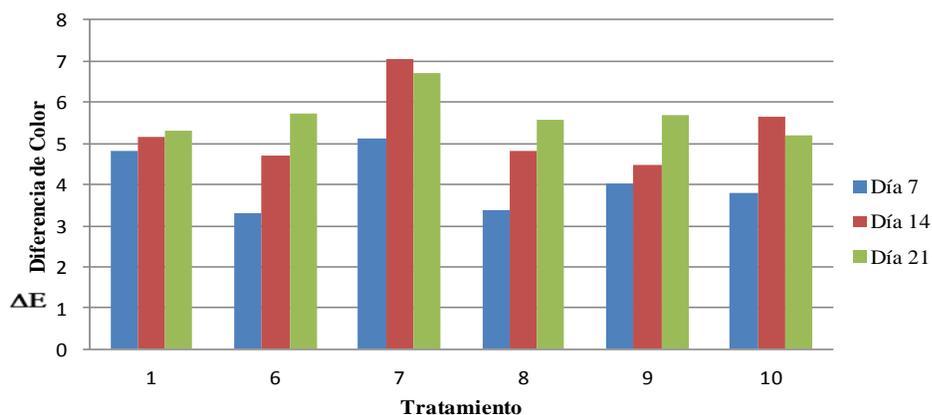


Figura 25. ΔE con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados con película permeable al oxígeno.

Tanto en las muestras provenientes de cerdos suplementados con vitamina D_3 (Figura 24) como en las muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol (Figura 25), se observa que al transcurrir el tiempo de almacenamiento la diferencia en el color aumenta principalmente al día 14 y al día 21 significativamente ($P \leq 0.05$). Lo cual fue una repuesta esperada ya que la diferencia en el color durante el tiempo de almacenamiento se realizó con respecto al día 1 y la diferencia fue mayor al día 21. Lo cual corresponde a lo encontrado en algunas otras investigaciones en donde el deterioro del color se observa a partir del día 14 de almacenamiento (Knox *et al.*, 2008, Holmer *et al.*, 2009).

En la prueba de correlación, la diferencia en el color mostró una correlación positiva (0.342) con la concentración de TBARS, lo cual sugiere que el efecto de la oxidación lipídica afecta la estabilidad en el color, debido a que la oximioglobina se transforma en metamioglobina en un cambio del color rojo a color marrón. La correlación con el pH fue negativa (-0.088); por lo tanto, la diferencia de color no se relacionó directamente con los valores de pH, lo cual coincide con lo encontrado por Zhu *et al.* (2001) en donde en muestras con pH entre 5.2 y 5.5 no mostraron diferencia en el color durante 21 días de almacenamiento.

A continuación se muestran los resultados correspondientes a las muestras con empaque al vacío, en las cuales también la dosis y fuente de vitamina D tuvieron efecto significativo sobre la diferencia en el color (Anexo, Tabla 9).

Las muestras de T1 y T2 tuvieron la media global mayor de diferencia en el color (5.388 ± 0.88 y 5.363 ± 1.35 , respectivamente); sin embargo, fueron iguales a las demás muestras de los tratamientos a excepción de las T4 que tuvieron la menor media global de diferencia en el color (3.477 ± 1.79), es decir en estas muestras el color se mantuvo sin mucha variación respecto a los demás tratamientos (Anexo, Tabla 11).

En la Figura 26 y 27 se observa que la diferencia en el color aumenta por efecto del tiempo de almacenamiento siendo la mayor diferencia significativa al día 21 y 28 ($P \leq 0.05$), para la gran mayoría de las muestras.

Las muestras del T5 fueron las que mostraron la mayor diferencia en el color (6.701 ± 2.34) al día 28, aunque, estas muestras fueron igual en comportamiento a las T1, T2, T7 y T10 en el mismo día (6.21 ± 2.78 , 5.91 ± 1.98 , 5.79 ± 1.56 y 5.82 ± 2.23 , respectivamente). T4 al día 7 demostraron la menor diferencia en el color (2.46 ± 0.89) siendo igual al comportamiento presentado por las muestras del T5, T8 y T9 (2.78 ± 0.87 , 3.39 ± 1.34 , 3.47 ± 0.87). El tipo de empaque con la menor diferencia en el color fue en el empaque al vacío (Figura 27).

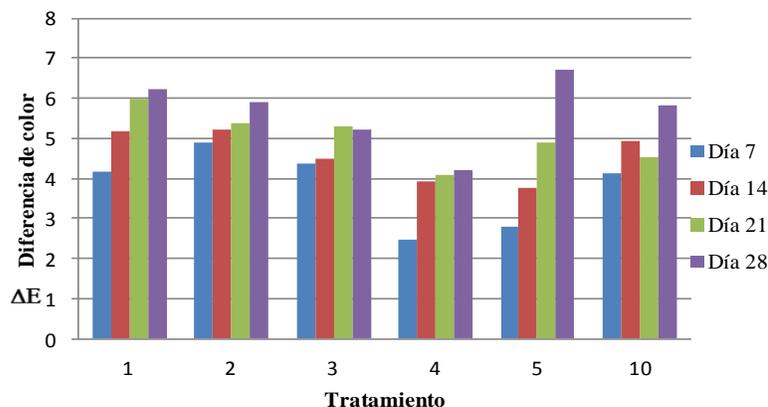


Figura 26. ΔE con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D₃, empacados al vacío.

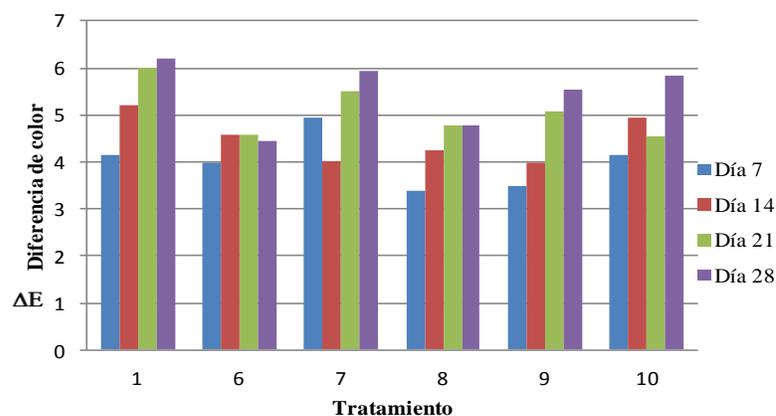


Figura 27. ΔE con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío.

La correlación fue positiva con la concentración de TBARS (0.130), lo cual sugiere que a pesar del tipo de empaque la oxidación lipídica afectó la estabilidad en el color de las muestras. La correlación con los valores de pH fue negativa (-0.032) lo cual indica un comportamiento parecido con las muestras con empaque permeable al oxígeno.

Las muestras empacadas al vacío fueron las que presentaron la menor diferencia en el color ($P \leq 0.05$), lo cual fue la respuesta esperada ya que se considera que este tipo de empaques mantiene las propiedades fisicoquímicas y sensoriales durante más tiempo. Además, de que

Renerre *et al.* (1996) mencionan que el M. *Longissimus dorsi* es un músculo que se caracteriza por ser muy estable en el color durante el tiempo de almacenamiento.

La mioglobina (Mb) es la molécula principal y responsable del color en la carne, ésta presenta un color rojo púrpura en el interior de la carne, cuando el metal hierro se oxigena fijando una molécula de oxígeno, forma la oximioglobina y adquiere un color rojo brillante; pero si el metal se oxida a Fe^{III} da lugar a la forma conocida como metamioglobina y la coloración que aparece es parda (Bello, 2000; O'Sullivan *et al.*, 2003), por lo tanto, esta es la principal causa de que la diferencia en el color aumente conforme transcurre el tiempo de almacenamiento.

De acuerdo con Zhu *et al.* (2001) la diferencia en el color también se debe a que la tasa de consumo de oxígeno en el M. *Longissimus dorsi* disminuye durante el almacenamiento a 4 °C durante 28 días en muestras con empaque permeable al oxígeno (lo cual se observó en este trabajo), por otra parte Holmer *et al.* (2009) encontraron que la diferencia en el color puede sufrir un leve incremento durante el tiempo de almacenamiento en muestras empacadas al vacío.

El color característico de una carne de cerdo es un rosa pálido o grisáceo; por lo que se esperaría que el índice de rojo fuera bajo y para este caso al ser un empaque al vacío hay menor concentración de oxígeno, el cual modifica el color de la carne. Sin embargo, una disminución en el enrojecimiento es debido a la oxidación de la mioglobina, especialmente cuando el pH está por encima de 6 (Filgueras *et al.*, 2010), efecto no observado en este trabajo ya que los valores de pH nunca fueron mayores a 6.

Por otra parte Lahucky *et al.* (2007) y Wilborn *et al.* (2004) encontraron que al administrar altas dosis de vitamina D₃ a las dietas de los cerdos se afectaba el índice de rojo durante el tiempo, traduciéndose esto en una estabilidad y aumento en el color durante el tiempo de almacenamiento, además de disminuir el índice de amarillo (b*) lo cual es deseable en el color de la carne, esto se observó durante el tiempo de almacenamiento hasta el día 21.

En un estudio realizado por Xia *et al.* (2009) lograron establecer una relación entre el incremento de la concentración de TBARS y la disminución en el índice de rojo (a*); sin embargo, en este trabajo se observó un incremento en la concentración de TBARS pero únicamente hasta el día 7 mientras que el índice de rojo presentó una disminución pero hasta

después del día 21; por lo tanto, se puede decir que la suplementación con vitamina D₃ y 25-OH colecalciferol mantuvieron el índice de rojo durante el tiempo de almacenamiento.

La suplementación con selenio y con vitamina E permite reducir la oxidación de la mioglobina y por lo tanto, preservar el color de la carne durante un tiempo de almacenamiento prolongado, lo cual no se observó en este trabajo ya que las muestras de T10 no mostraron una diferencia menor en el color, esto se pudo deber a que la dosis de vitamina E y de selenio no fueron suficientes para poder lograr un mayor efecto en la estabilidad del color.

7.2.5 Determinación de indicadores de oxidación proteica

El método del DNPH es un método comúnmente utilizado para determinar la oxidación de proteínas musculares en los alimentos, por lo tanto, se utilizó en este trabajo para evaluar la oxidación proteica en las muestras de carne.

El análisis de varianza de la carne empacada al vacío indicó diferencias significativas únicamente para el factor día y la interacción tratamiento-día en las muestras empacadas al vacío. Lo anterior indica que las dosis y fuente de vitamina D no tuvieron efecto significativo en la generación de carbonilos (Anexo, Tabla 9).

Las muestras de T7 y T9 presentaron la media global mayor en la concentración de carbonilos al día 28 (0.242 ± 0.03 y 0.223 ± 0.04 nM hidrazonas/mg proteína), las muestras de los demás tratamientos también presentaron la mayor concentración de carbonilos al día 28 pero fueron diferentes a T7 y T9. La media global menor en la concentración de carbonilos se presentó al día 1 siendo las muestras de T2 las que mostraron la menor concentración (0.006 ± 0.001 nM hidrazonas/mg proteína) y diferente de los demás tratamientos al día 1; T7 presentaron la menor concentración al día 7 (0.010 ± 0.004 nM hidrazonas/mg proteína).

En la Figura 28 se observa que T2 presentó la menor concentración de carbonilos mientras que T10 arrojó la mayor concentración de carbonilos, por lo tanto, se puede decir que todos los tratamientos presentaron menor oxidación proteica que el control positivo en muestras provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃, sin embargo, esto no fue la respuesta esperada ya que al ser el control positivo debió haber tenido la menor concentración de

carbonilos. Por otra parte, al observar la Figura 29 se observa que para T6 y T10 la producción de carbonilos no presentó variabilidad durante el tiempo de almacén.

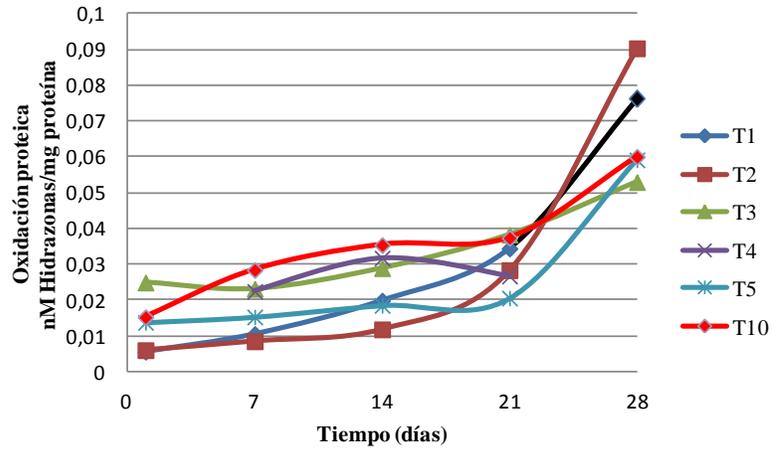


Figura 28. Variabilidad en los grupos carbonilo con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃, empacados al vacío

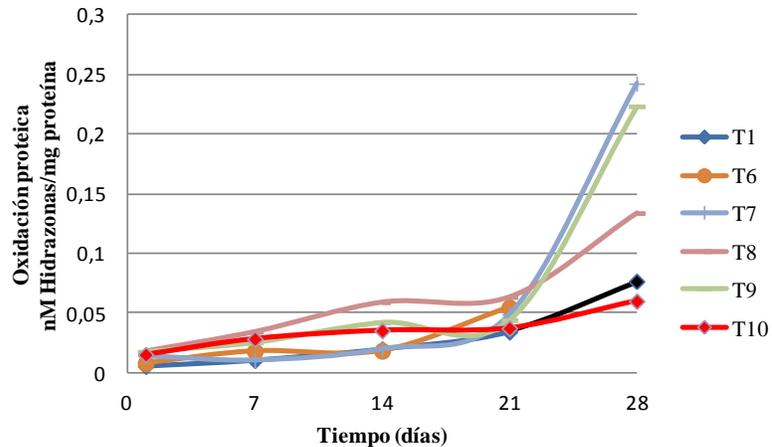


Figura 29. Variabilidad en los grupos carbonilo con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío

Además las muestras procedentes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol presentaron mayor concentración de carbonilos que las muestras provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃.

La correlación con la concentración de TBARS fue positiva (0.129) y con la capacidad reductora FRAP fue negativa (-0.074), por lo tanto, se puede decir que mientras la capacidad reductora disminuyó en la muestra, la concentración de TBARS aumentó lo cual se esperaba ya que si se pierde la capacidad reductora (que es un indicador de poder antioxidante en la muestra) la oxidación lipídica aumentará.

La aparente relación entre la concentración de TBARS y la concentración de carbonilos indican la probabilidad de que algunos compuestos dicarbonílicos derivados de la oxidación lipídica, probablemente malonaldehído forman compuestos con proteínas (Xiong, Y., 2000).

Aunque, el método del DNPH es comúnmente utilizado para evaluar la oxidación de proteínas musculares en los alimentos y en muestras biológicas, tiene varios inconvenientes ligados al método; por ejemplo, la presencia de las fracciones carbonílicas que pueden introducirse en las proteínas por mecanismos que no implican la oxidación de aminoácidos, además de que ciertos productos de la oxidación lipídica, como los alquenes pueden reaccionar con grupos sulfhidrilo para formar aductos que contienen grupos carbonilo (Armenteros *et al.*, 2009; Chelh *et al.*, 2007). El DNPH puede unirse también al MDA, por lo tanto, se ha sugerido que la concentración de carbonilos presentes en la muestra se encuentra sobreestimado (Armenteros *et al.*, 2009).

La concentración de carbonilos totales en este trabajo se encuentra entre 0.010 y 0.277 nM de hidrazonas/mg proteína, los valores obtenidos por Lund *et al.* (2007) oscilan entre 0.018 y 0.406 nM de hidrazonas/mg proteína en músculo *Longissimus dorsi* de cerdo; mientras que Armenteros *et al.* (2009) reportan valores de 0.2 a 0.35 nM de hidrazonas/mg proteína en carne cruda y Xia *et al.* (2007) encontraron valores de 1.09 a 1.16 nM de hidrazonas/mg proteína en músculo *Longissimus dorsi* de cerdo con 5 ciclos de congelamiento, los valores obtenidos en este trabajo aunque se parecen a los obtenidos en otros trabajos son cantidades menores, esta diferencia se podría deber a que las condiciones de tratamiento y manipulación de la muestra fue diferente a pesar de que se utilizó el mismo tipo de carne la diferencia en la composición del músculo y el manejo de la muestra pudo haber influido en la generación de carbonilos o bien a que los carbonilos proteicos formados hayan reaccionado entre sí y ya no

puedieron reaccionar con el DNPH. Además, de que algunos autores (Lund *et al.*, 2007; Xiong Y., 2000) han llegado a la conclusión de que las proteínas miofibrilares se oxidan en mayor grado que las sarcoplásmicas y por lo tanto es más fácil detectar la oxidación en estas fracciones proteicas, por lo tanto se podría implementar nuevamente esta técnica pero aislando la parte miofibrilar de las muestras.

El presente trabajo, el tipo de empaque no presentó diferencia significativa durante el tiempo de almacenamiento, es decir, el tipo de empaque no afectó la producción de carbonilos, aunque, en un estudio realizado por Lund *et al.* (2007) en muestras de *Longissimus dorsi* de cerdo empacadas con película permeable al oxígeno se incrementó la oxidación proteica durante el almacenamiento. Sin embargo, hay que tener presente que el efecto de la oxidación de proteínas depende de la naturaleza de los aminoácidos, los aminoácidos básicos pueden ser oxidados y formar grupos carbonilo, mientras que los que poseen grupos tiol libres pueden formar puentes disulfuro y los aminoácidos aromáticos ácidos pueden ser hidroxilados (Stadman, E., 1990 y 1993).

7.3 VARIABLES QUE NO FUERON SIGNIFICATIVAS EN EL ANALISIS DISCRIMINANTE.

7.3.1 Determinación de la actividad antioxidante mediante métodos químicos

7.3.1.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante la capacidad reductora del hierro

En el análisis discriminante esta prueba no fue significativa para las muestras con empaque al vacío, sin embargo, el análisis de varianza mostró que existe diferencia significativa para todos los factores del modelo (tratamiento, día e interacción tratamiento-día). Lo anterior indica que las dosis y fuente de vitamina D (Anexo, Tabla 6).

Las muestras de T2 fueron las que presentaron la media global mayor de actividad reductora ($2.918 \pm 0.50 \mu\text{M Trolox}/100\text{g}$ de carne), siendo esta actividad igual estadísticamente a la presentada por el resto de las muestras de los demás tratamientos a excepción de T1 y T4 que

fueron los que presentaron la menor media global de actividad reductora (1.712 ± 0.84 y 1.88 ± 0.45 μM Trolox/100g de carne).

Las muestras de T3 fueron las que presentaron la mayor actividad reductora (4.96 ± 1.23 μM Trolox/100g de carne) e igual a la actividad presentada en T1 y T2 (4.87 ± 1.45 y 4.32 ± 1.88 μM Trolox/100g de carne), pero diferente a todas las demás muestras de los tratamientos al día 1. Por otro lado, las muestras de T10 y T7 fueron las que mostraron la menor actividad reductora al día 1 (3.071 ± 1.67 y 3.17 ± 1.56 μM Trolox/100g de carne), posteriormente dicha actividad comenzó a disminuir durante el almacenamiento, siendo la menor al día 28 (Figura 30 y 31).

En la Figura 30, se observa que T1 y T3 presentaron un comportamiento similar, aunque, T4 mostró una actividad constante durante el tiempo de almacenamiento. En la figura 31 se observa que los tratamientos provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol mostraron una respuesta más uniforme y constante durante el tiempo de almacenamiento y que durante los días 7, 14 y 21 la actividad reductora no presentó cambio.

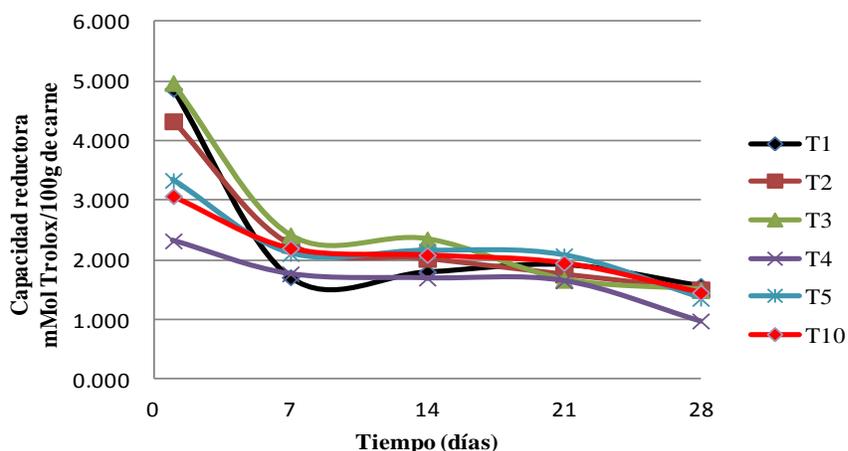


Figura 30. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de FRAP en cortes de cerdos alimentados con vitamina D_3 , empacados al vacío.

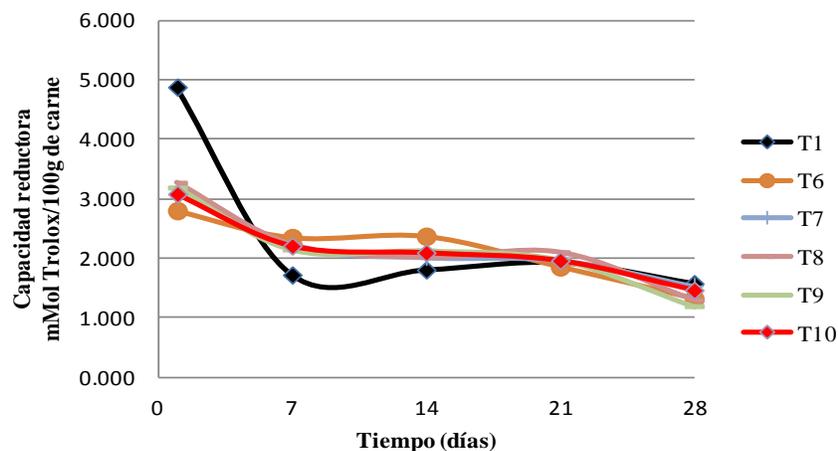


Figura 31. Variación de la actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacén mediante el método de FRAP en cortes de cerdos alimentados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío.

La respuesta que presentó T1 (control negativo) fue la que se esperaba ya que mostró la mayor actividad reductora al día 1 y posteriormente disminuyó, ya que al ser el control negativo que no tuvo antioxidante alguno en la dieta pudo haber propiciado una mayor oxidación. Sin embargo, T10 (control positivo) mantuvo a través del tiempo de almacenamiento la actividad reductora; aunque si se presentó una disminución no fue tan evidente como se presentó en el control negativo. Estos resultados comprueban que la actividad reductora disminuye a través del tiempo de almacenamiento, ya que la oxidación de la oximioglobina (Fe^{II}) a metamioglobina (Fe^{III}) está relacionada con la generación de aldehídos insaturados como 4-hidroxinonal y malonaldehído, provenientes de las reacciones secundarias de oxidación lipídica y que inducen a la oxidación de la mioglobina aumentando su actividad como agente pro-oxidante y la disminución del poder de reducción del hierro.

Las muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol mantuvieron la capacidad reductora durante el tiempo de almacenamiento. También se observó que los tratamientos correspondientes a las altas dosis de vitamina D_3 presentaron respuesta parecida a algunos tratamientos con 25-OH colecalciferol.

La correlación fue positiva (0.682) con los valores de pH y negativa (-0.199) con la concentración de TBARS, ya que mientras la actividad reductora disminuyó la concentración de TBARS se incrementó observándose únicamente este efecto hasta el día 7 de almacenamiento.

7.3.2 Determinación de la actividad de enzimas con capacidad antioxidante

7.3.2.1 Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa

El análisis de varianza mostró que existe efecto significativo únicamente por el tiempo de almacenamiento sobre la actividad de la superóxido dismutasa para ambos tipos de empaque (Anexo, Tabla 6 y 10). A continuación se muestran los resultados correspondientes a las muestras empacadas con película permeable al oxígeno.

En las Figuras 32 y 33 se observa que todos los tratamientos generaron la menor actividad enzimática al día 1, posteriormente la actividad presentó su punto máximo al día 7 siendo las muestras de T2 las que presentaron la mayor actividad (997.279 ± 20.780 U/g de carne) para posteriormente descender al final del muestreo siendo las muestras de T8 (945.334 ± 34.89 U/g de carne) las que presentaron la menor actividad enzimática.

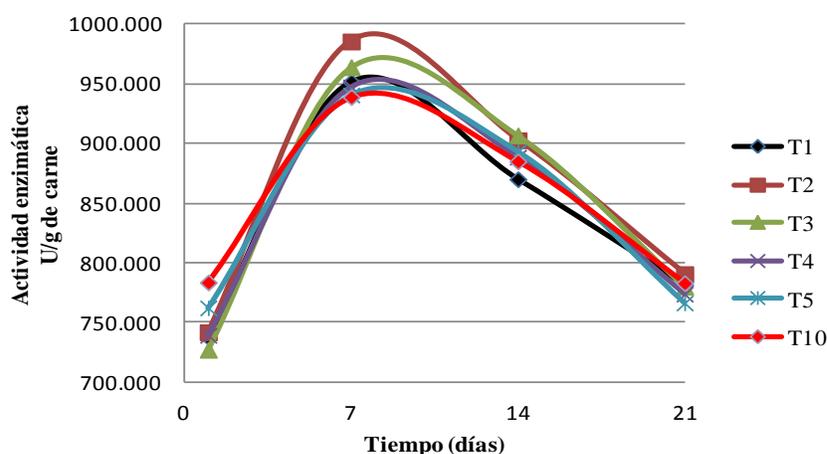


Figura 32. Variación en la actividad enzimática de la SOD con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D₃, empacados con película permeable al oxígeno.

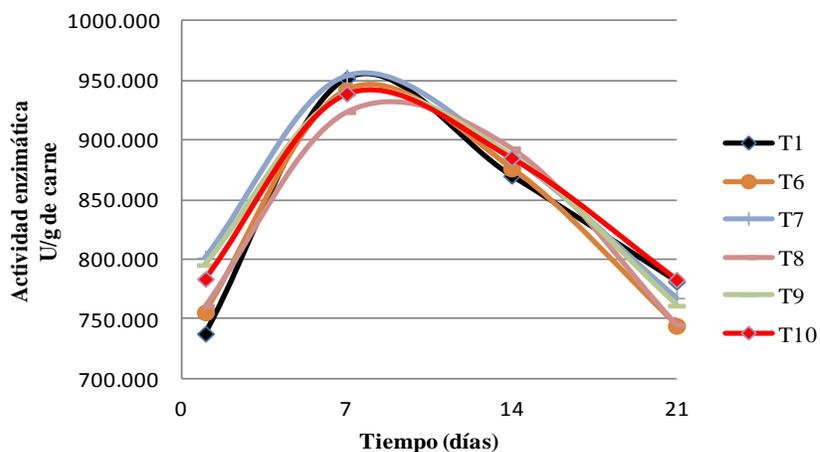


Figura 33. Variación en la actividad enzimática de la SOD con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-hidroxicolecalciferol, empacados con película permeable al oxígeno.

En las muestras con empaque al vacío, únicamente tuvo efecto significativo el tiempo de almacenamiento sobre la actividad enzimática de la SOD (Anexo, Tabla 8).

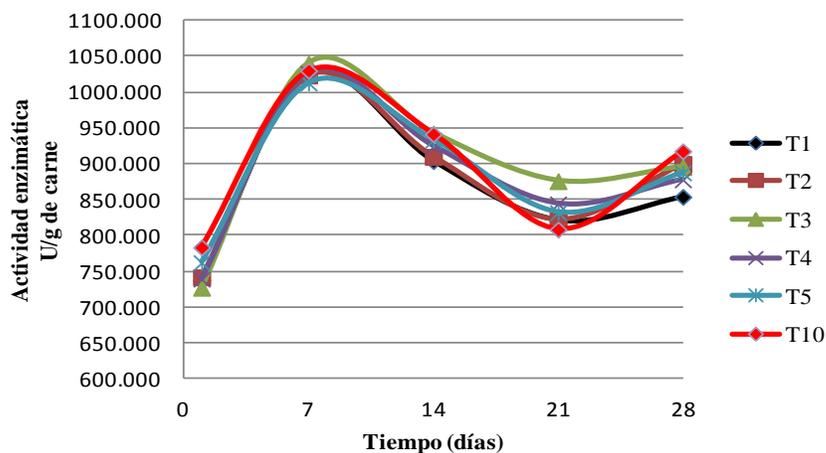


Figura 34. Variación en la actividad enzimática de la SOD con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con vitamina D₃, empacados al vacío.

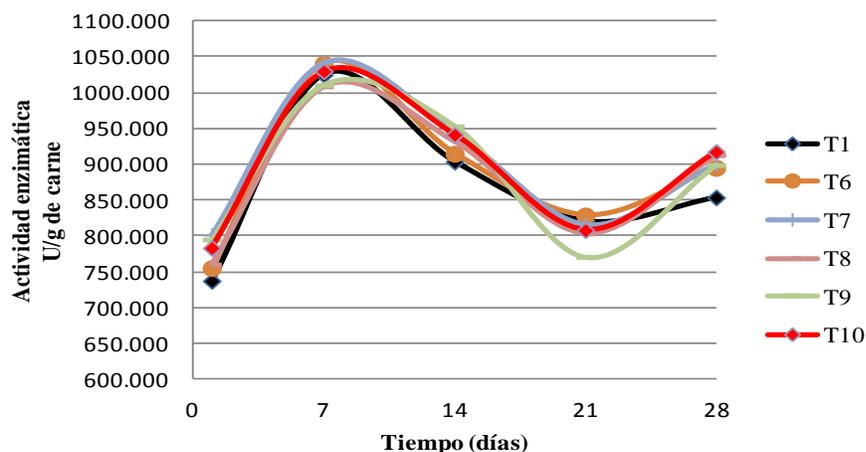


Figura 35. Variación en la actividad enzimática de la SOD con respecto al tiempo de almacén en cortes de cerdos suplementados con 25-hidroxicolecalciferol, empacados al vacío

Las muestras de los tratamientos mostraron la menor media global en la actividad enzimática al día 1, posteriormente la actividad aumentó al día 7 siendo las muestras de T10 las que presentaron la mayor actividad (1023.810 ± 35.897 U/g de carne, Anexo, Tabla 8) la menor actividad fue para las muestras de T8 (992.824 ± 37.98 U/g de carne). Al día 14 y 21 la actividad enzimática disminuyó significativamente en las muestras de todos los tratamientos (Figura 34 y 35).

Las muestras almacenadas tanto con película permeable al oxígeno como al vacío no presentaron diferencias por el tipo de empaque utilizado.

En el presente trabajo, los resultados obtenidos para actividad enzimática de la SOD se encuentran entre 845.136 y 888.690 U/g de carne, lo cual corresponde con lo descrito por Hernández *et al.* (2004), quienes encontraron una actividad entre 657-928, principalmente en cerdo ibérico, en este caso la concentración de ácidos grasos insaturados en la carne afectaron considerablemente la actividad de esta enzima, ya que el cerdo ibérico posee más ácidos grasos que los cerdos utilizados en este estudio.

Se ha descrito una variación de la actividad SOD entre especies animales (siendo dos veces superior en ternera que en cerdo), un aumento de actividad al aumentar el grado de insaturación de la grasa del animal y diferencias entre tipos musculares dentro de un mismo animal (Mei *et al.*, 1994); también parece haber un componente genético responsable de la

variabilidad de la enzima. Hernández *et al.* (2004) encontraron grandes diferencias en las actividades de la SOD y de la CAT en carne de cerdos de distintos genotipos, estas variaciones sugieren que la selección genética de animales con elevada actividad de esta enzima antioxidante podría utilizarse para mejorar la estabilidad oxidante del músculo esquelético. Además, la biosíntesis de la enzima parece encontrarse fuertemente regulada por la concentración del sustrato sobre el cual actúa, lo que es una ventaja frente a los compuestos antioxidantes añadidos en la dieta, ya que la actividad antioxidante endógena puede regularse con las necesidades celulares siendo inducido, inhibido o activado por factores endógenos (García B., Onel, G., 1995).

Renerre *et al.* (1996) y Pradhan *et al.* (2000) coinciden en que probando distintos tipos de dietas (basadas en maíz, sorgo y una mezcla de ambas) la actividad de la SOD no mostró diferencia alguna por efecto de la dieta debido a que esta enzima existe en tres formas: Cu-Zn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD y con lo que concluyen que probablemente ninguno de los compuestos presentes en las dietas puedan tener efecto sobre los metales que forman parte de dicha enzima, además depende del tipo de músculo a utilizar. Renerre *et al.* (1996) encontraron mayor actividad enzimática en músculos glucolíticos (que presentan mayores niveles de oxidación) en comparación de músculos que presentan baja actividad glucolítica como el *Longissimus dorsi*.

El radical superóxido es relativamente inestable por sí mismo y en solución acuosa sufre reacción de dismutación, formándose oxígeno y peróxido de hidrógeno, siendo la función de la dismutasa la de acelerar la reacción, debido a esto se hubiera esperado que la mayor actividad fuera al día 7 y no al 1. En un estudio realizado por Fleet *et al.* (2012) con dosis mayores de 800 U.I. de vitamina D₃ se puede inducir a la expresión de enzimas con capacidad antioxidante, siendo el encargado de esto el 1-25-OH-colecalciferol que es uno de los principales metabolitos activos de la vitamina D₃, induciendo a la expresión de las enzimas llamadas tioredoxinas reductasas, las cuales son estables durante el almacenamiento y facilitan la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-sulfato de la cisteína, por lo tanto, esto podría ser otra causa por la cual la enzima SOD en este estudio mostró su mayor actividad enzimática al día 7.

Además, se ha sugerido que cada isoenzima de la SOD está regulada independientemente de acuerdo con el grado de estrés oxidante del compartimiento subcelular en el que se encuentra. Aunque el mecanismo a escala molecular es aún desconocido, podría ser que algunos productos de oxidación lipídica actuaran sobre la transcripción de genes SOD específicos (Chihuailaf, R., Contreras, P., 1996).

7.3.3 Determinación de indicadores de oxidación proteica

7.3.3.1 Determinación de grupos carbonilos como indicadores de oxidación proteica

El método del DNPH es un método comúnmente utilizado para determinar la oxidación de proteínas musculares en los alimentos, por lo tanto, se utilizó en este trabajo para evaluar la oxidación proteica en las muestras de carne. Esta prueba no fue significativa en el análisis discriminante realizado para muestras con empaque permeable al oxígeno. El análisis de varianza mostró que existe diferencia significativa para los factores día e interacción tratamiento-día. Lo que indica que las dosis y fuente de vitamina D no tuvieron efecto significativo ($P \leq 0.05$) en la oxidación proteica determinada mediante carbonilos totales (Anexo, Tabla 6).

En la Figura 36 y 37 se puede observar la concentración de carbonilos. Las muestras de T1 presentaron la mayor concentración de carbonilos al día 21 (2.37 ± 0.76 nM hidrazonas/mg proteína) a diferencia de las muestras de los otros tratamientos. La menor concentración de carbonilos fue al día 1 para las muestras de todos los tratamientos, siendo las del T2 las que presentaron la media global menor en la concentración de carbonilos (0.0006 ± 0.0001 nM hidrazonas/mg proteína) al igual que las muestras de T7 y T10 (0.0014 ± 0.0003 y 0.015 ± 0.002 nM hidrazonas/mg proteína).

En la Figura 36 se observa que T1 presentó la mayor concentración de grupos carbonilo al día 21, este comportamiento era lo esperado ya que este tratamiento al ser el control negativo era de esperarse que la producción de carbonilos fuera mayor que en las muestras problema, sin embargo, no hubo diferencia en los días 7 y 14 sucesivos. En ambas Figuras se observa una tendencia parecida, es decir la generación de grupos carbonilo presentó un comportamiento parecido en muestras provenientes de ambas fuentes de vitamina D.

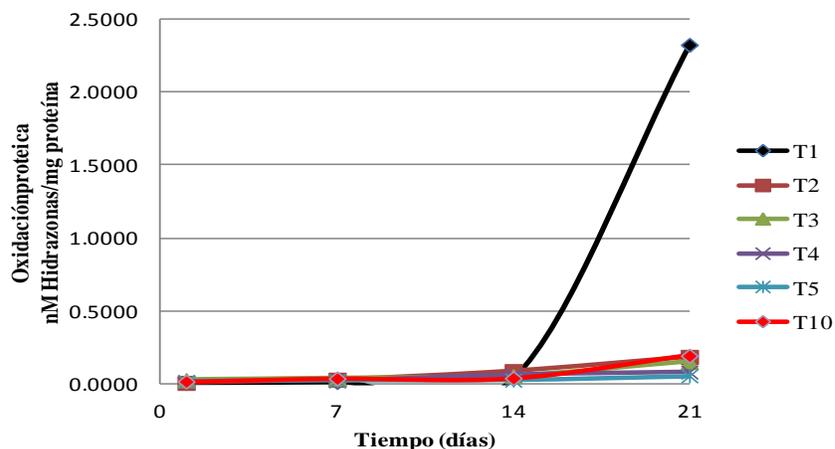


Figura 36. Variabilidad en los grupos carbonilo con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃, empacados con película permeable al oxígeno.

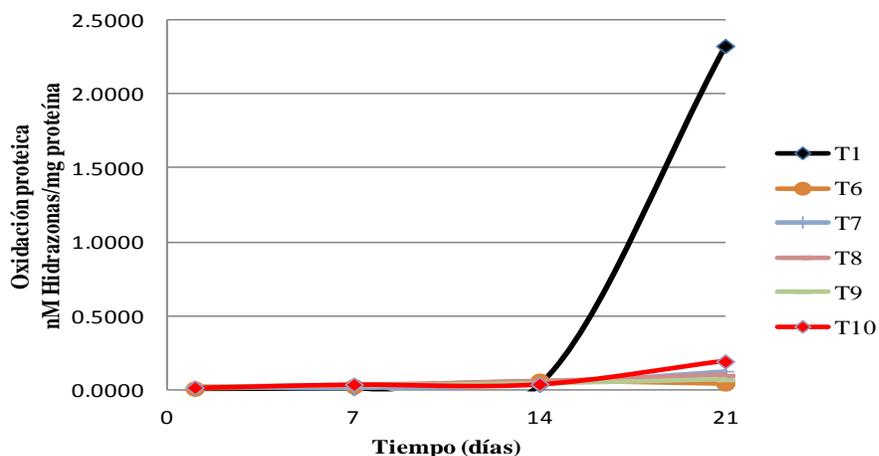


Figura 37. Variabilidad en los grupos carbonilo con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados con película permeable al oxígeno.

7.3.3.2 Determinación de productos de oxidación proteica mediante fluorescencia

Los compuestos formados como resultado de las interacciones entre los productos provenientes de la oxidación lipídica y algunos grupos amino libres pueden tener propiedades

espectrales, dicha característica puede ser detectada por métodos fluorométricos y usada como un índice de oxidación proteica (Armenteros *et al.*, 2009), para esperar una relación directa de fluorescencia con la oxidación de proteínas.

El análisis de varianza indicó diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para los factores día e interacción tratamiento-día, en muestras de ambos tipos de empaque. Lo anterior indica, que las dosis y fuente de vitamina D no tuvieron efecto significativo en la oxidación proteica determinada mediante fluorescencia (Anexo, Tabla 6 y 10). A continuación, se muestran los resultados correspondientes a las muestras empacadas con película permeable al oxígeno.

En las Figuras 38 y 39 se observan los resultados de intensidad de fluorescencia de muestras empacadas con película permeable al oxígeno, el T9 mostró la media global mayor de intensidad de fluorescencia (36296.25 ± 234.78 UA) al día 21, mostrando la misma intensidad que T1, T3 y T4 (19942.59 ± 278.98 , 26291.59 ± 345.76 y 18462.13 ± 3456.32 UA) mientras que T10 (12686.33 ± 349.89 UA) mostró la menor intensidad a ese día. La menor intensidad en el primer día la presentó T8 (2608.57 ± 467.21 UA), aunque T3 (4813.62 ± 321.98 UA) mostró la mayor intensidad al mismo día. En la Figura 38, se observa que a partir del día 14 de almacenamiento la intensidad aumentó, siendo la mayor intensidad al día 21. Sin embargo, T10 mostró un comportamiento favorable ya que fue el que presentó la menor intensidad, por lo tanto, se puede decir que al presentar menor intensidad la presencia de oxidación proteica fue menor en este tratamiento. Las muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol mostraron una tendencia parecida a las muestras de cerdos suplementados con vitamina D₃, aunque T6 y T9 mostraron una mayor intensidad como sucedió con T3 (Figura 39).

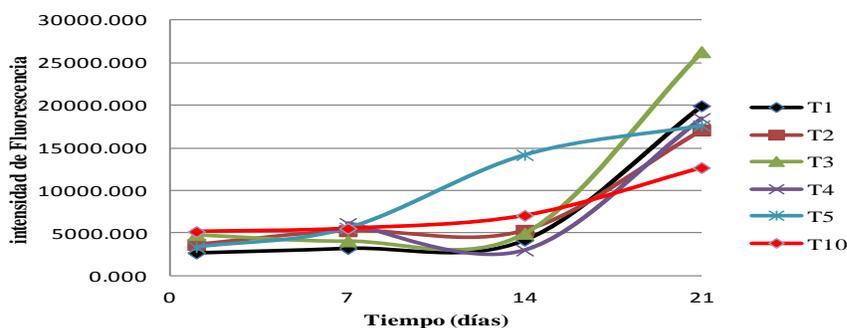


Figura 38. Variabilidad de la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃, empacados con película permeable al oxígeno

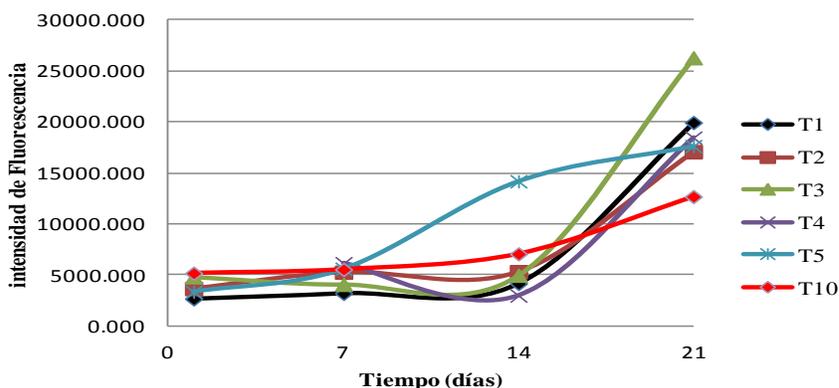


Figura 39. Variabilidad en la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados con película permeable al oxígeno

Los demás tratamientos muestran un comportamiento similar al que se observó en los tratamientos con vitamina D₃. Esta prueba mostró una correlación positiva con la concentración de TBARS (0.056) y con la concentración de carbonilos (0.270) esto indica que la prueba de fluorescencia se complementa con la de determinación de carbonilos, también corroboró que la oxidación proteica y lipídica están ligadas debido a que algunos compuestos provenientes de la oxidación lipídica pueden formar compuestos con los grupos amino libres de las proteínas y formar compuestos capaces de emitir fluorescencia.

A continuación, se muestran los resultados correspondientes a las muestras en empaque al vacío, en los cuales, la dosis y fuente de vitamina D no tuvieron efecto significativo, pero si el día de almacenamiento que fue significativo en cuanto a la intensidad de fluorescencia.

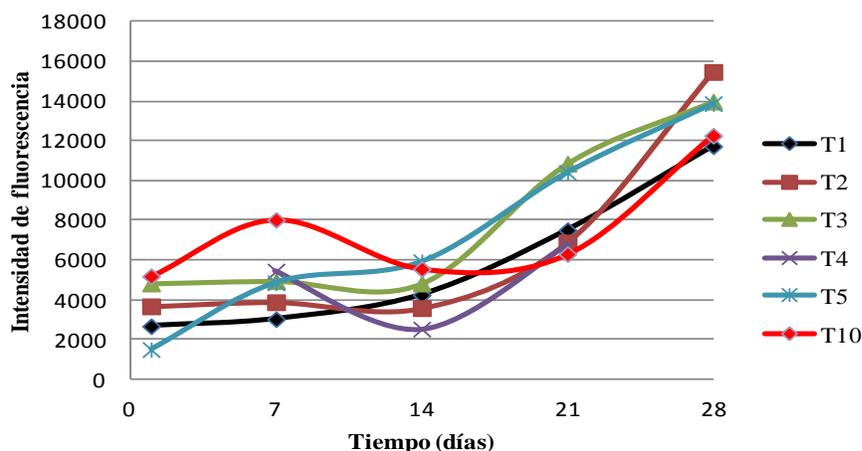


Figura 40. Variabilidad en la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D_3 , empacados al vacío.

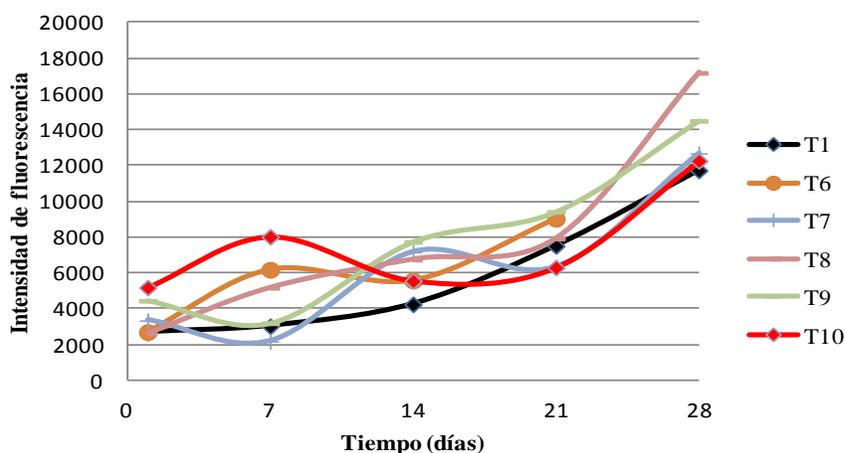


Figura 41. Variabilidad en la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío

En la Figura 40 y 41, se observa el aumento en la intensidad de fluorescencia a partir del día 14 de almacenamiento siendo la mayor actividad al día 28. Además, tanto los tratamientos de

vitamina D₃ como los de 25-OH colecalciferol mostraron la misma tendencia en la intensidad de fluorescencia durante el tiempo de almacenamiento, cabe señalar que las muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol mostraron una intensidad mayor que el control positivo.

T8 mostró la mayor intensidad de fluorescencia (17181.51±378.65 UA) con la misma intensidad que el resto de los tratamientos al día 28, mientras que la menor intensidad la presentó T6 al día 1 (2689.67±456.23) e igual a T1 (2662.47±234.91), T2 (3664.63±341.76 UA), T5 (3356.40±456.70 UA), mientras que T7 (2169.66±267.98 UA) tuvo la menor intensidad al día 7 y al día 14 fue para T4 (2519.56±438.96UA).

La prueba de correlación fue positiva (0.130) con la concentración de TBARS y con la concentración de carbonilos totales (0.087), aunque negativa con la actividad reductora FRAP (-0.517) y la capacidad antioxidante por DPPH (-0.281), se puede decir que al disminuir la capacidad reductora y aumentar la presencia de radicales libres la intensidad de fluorescencia aumentó así como la concentración de carbonilos y la concentración de TBARS.

Las muestras empacadas con película permeable al oxígeno mostraron la mayor intensidad de fluorescencia (9488.09 UA) en comparación a las empacadas al vacío, esta respuesta era lo que se buscaba, dado que la película permeable al oxígeno permite el contacto de la muestra con agentes pro-oxidantes.

La interacción de los productos aldehídicos provenientes de la oxidación lipídica pueden reaccionar con los grupos amino de las proteínas (como la lisina) y formar bases de Schiff capaces de emitir fluorescencia (Kagan, 1986). La acumulación de este material fluorescente intracelularmente (llamado lipofuscina, cerósido o pigmento de la edad) ha sido encontrada en diferentes órganos y asociados a los procesos oxidantes (Seehafer, S., Pearce, D., 2006). La acumulación de lipofuscinas ha sido observada en músculos de rata con deficiencias de vitamina E. Aunque la formación de las bases de Schiff entre los productos oxidados de proteínas y lípidos también pueden estar implicados en la interacción de los azúcares y las proteínas (reacción de Maillard), estas interacciones pueden ayudar a los cambios en las propiedades funcionales y bioquímicas de la carne (Smith *et al.*, 1987).

Algunos factores como: pH, concentración de metales de transición y temperatura influyen en la generación de productos fluorescentes. En este trabajo, se encontró que la intensidad de fluorescencia aumentaba conforme transcurría el tiempo de almacenamiento, lo cual corresponde a lo informado por Armenteros *et al.* (2009), Chelh *et al.* (2007) y Estévez *et al.* (2008), ellos encontraron que la intensidad aumentó durante el tiempo de almacenamiento (día 7) de 300 a 600 UA, siendo intensidades parecidas a las encontradas en este trabajo ya que para ese día de almacenamiento se detectaron entre 250 y 500 UA con un posterior incremento en la intensidad de fluorescencia. Debido a que en este trabajo se encontró una relación positiva entre la concentración de carbonilos y la intensidad de fluorescencia se puede decir que esto contradice lo reportado por Chelh *et al.* (2007), ya que ellos observaron en el músculo *Longissimus dorsi* de cerdo con seis meses de edad, que la formación de los productos fluorescentes pueden disminuir conforme aumenta la concentración de grupos carbonilo, ya que los productos que pueden emitir fluorescencia pueden convertirse en productos más estables y reaccionar con el DNPH, en este trabajo no se observó el mismo efecto ya que los productos fluorescentes probablemente no se transformaron en otros compuestos que hayan interactuado con el DNPH y por lo tanto la concentración de carbonilos es menor que lo encontrado en la bibliografía.

Durante el almacenamiento en refrigeración en carne de bovino se encontró que los productos provenientes de la oxidación lipídica con las proteínas pueden generar compuestos capaces de emitir fluorescencia con características similares a las presentadas por las lipofuscinas (Renerre *et al.*, 1996).

De acuerdo a resultados obtenidos por Chelh *et al.* (2007) la intensidad de fluorescencia presentó un aumento durante el tiempo de incubación de su reacción, lo cual también se observó en este trabajo solo que durante el tiempo de almacenamiento. Estos resultados sugieren que la oxidación de las proteínas produce probablemente cromóforos fluorescentes de la lipofuscina y las bases de Schiff formadas por la oxidación lipídica y la unión con los grupos amino produce compuestos heterogéneos con estructura compleja.

7.3.4 Determinación de pH

El pH es un parámetro que afecta el color, la capacidad de retención de agua y la textura de la carne, por lo tanto, determina en gran medida el grado de aceptación de la carne por parte del consumidor (Hiu Y., Legarrera, I., 2006).

El análisis de varianza mostró que no existen diferencias significativas para todos los factores (tratamiento, día e interacción tratamiento-día), en muestras con ambos tipos de empaque. Lo anterior indica que las dosis y fuente de vitamina D no tuvieron efecto significativo ($P \leq 0.05$) sobre los valores de pH (Anexo, Tabla 6 y 10). A continuación, se muestran los resultados correspondientes a las muestras empacadas con película permeable al oxígeno.

No se obtuvieron diferencias significativas por efecto del tiempo de almacenamiento (Tabla 8), las muestras de T4 iniciaron con un valor de pH menor al resto de los demás tratamientos, pero al transcurrir el tiempo de almacenamiento aumentó ligeramente el pH, observándose esto en T3 y T5 al día 14, mientras que las muestras de T10 (control negativo) mostraron su mayor pH al día 7 y al día 21 (Figura 42). Las muestras de T8 presentaron un ligero aumento a partir del día 7 y el pH se mantuvo constante durante el resto del tiempo de almacenamiento, las muestras de T6, T7 y T10 mostraron un aumento al día 7 y 21 (Figura 43).

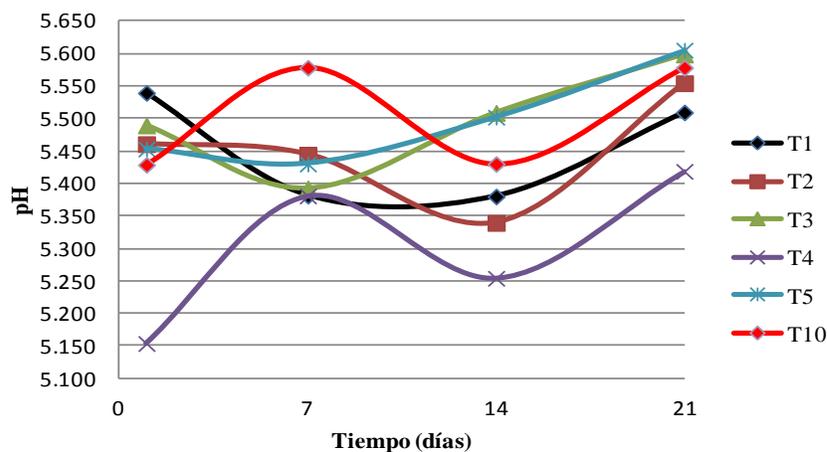


Figura 42. Variabilidad del pH en muestras provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃ durante el tiempo de almacén y empacados con película permeable al oxígeno

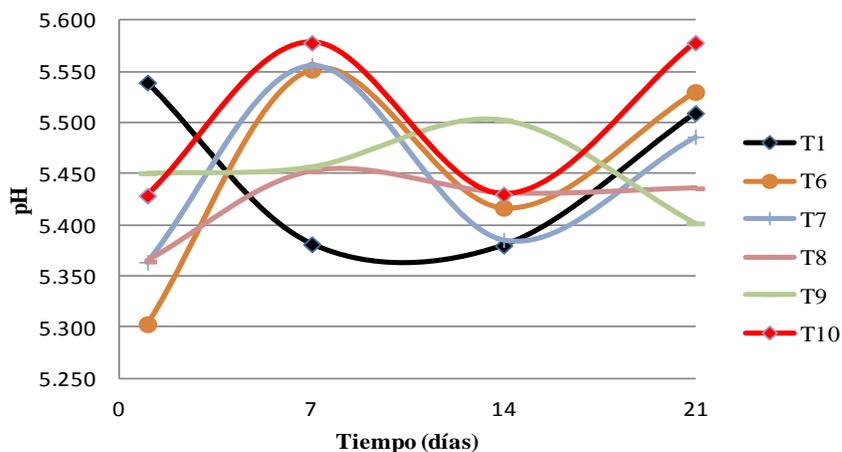


Figura 43. Variabilidad del pH en muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol durante el tiempo de almacén y empacados con película permeable al oxígeno.

Los valores de pH arrojaron una correlación negativa con la concentración de TBARS (-0.146) es decir, el pH no tuvo relación directa con la oxidación lipídica. La correlación fue negativa (-0.052) para la concentración de carbonilos, por lo tanto tampoco se observó una relación directa entre el pH y la oxidación proteica; mientras que la correlación para la concentración de cadaverina y putrescina fue positiva (0.05 y 0.096, respectivamente), el pH es un parámetro importante para la producción de aminas biogénicas, sin embargo, en este trabajo la producción de aminas se llevo a cabo sin valores altos de pH, lo cual coincide con lo encontrado por Ozogul *et al.* (2002), en donde indican que esto puede suceder porque en la muestra existe la concentración adecuada de precursores de aminoácidos libres y las condiciones necesarias para la producción de aminas biogénicas, por ejemplo, que la temperatura de almacenamiento haya sido mayor a 5 °C.

Las muestras con empaque al vacío no tuvo efecto significativo sobre el valor de pH ningún factor (tratamiento, día, tratamiento-día), es decir todos los tratamientos se comportaron de igual forma durante el tiempo de almacenamiento.

En las muestras de T4 se incrementó el pH a partir del día 7, al igual que las muestras de T2 y T10; sin embargo, las muestras de T1 y T3 sufrieron disminución del pH a partir del día 7,

mientras que en las muestras de T5 el pH aumentó su valor hasta el día 14 (Figura 44). Una tendencia parecida se observa en la Figura 45 en donde se observan los valores de pH que presentaron las muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, en donde las muestras de los tratamientos 7, 8 y 10 sufren un ligero aumento al día 7, mientras que las de T6 presentaron dicho aumento pero al día 14. Las muestras de los tratamientos 1 y 9 presentaron una disminución del pH durante el tiempo de almacenamiento siendo este último tratamiento, el que presentó la menor variación durante el tiempo de almacenamiento.

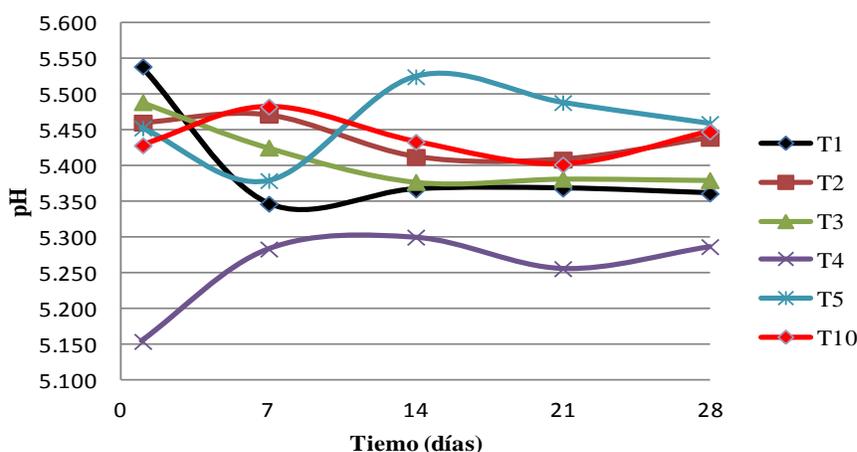


Figura 44. Variabilidad del pH en muestras provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃ durante el tiempo de almacén, empacados al vacío.

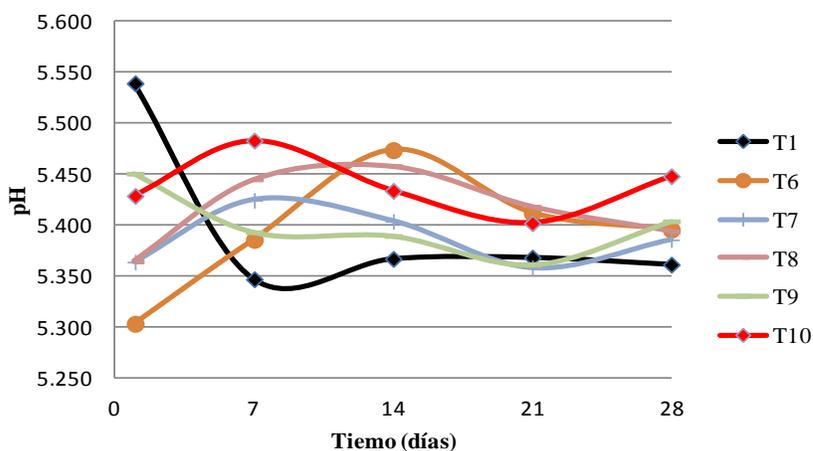


Figura 45. Variabilidad del pH en muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol durante el tiempo de almacén, empacados al vacío

Los valores de pH arrojaron una correlación negativa con la concentración de TBARS (-0.092), lo cual indica que hay una relación inversa entre los valores de pH y la oxidación lipídica. La correlación con la concentración de carbonilos fue negativa (-0.095), mientras que con la concentración de aminas biogénicas: cadaverina y putrescina la correlación fue positiva (0.049 y 0.074, respectivamente). Los valores de pH no se incrementaron durante el tiempo de almacenamiento, aunque, la formación de aminas biogénicas si se observó, lo cual se podría deber a que en muestras con empaque al vacío la proliferación de aerobios es menor pero pueden proliferar microaerófilos como algunas bacterias descarboxilantes, por lo tanto, la producción de aminas biogénicas se podría llevar a cabo (Ozgul *et al.*, 2002, Andrews *et al.*, 2007).

El pH *postmortem* de la carne es bajo entre 5.4 y 5.8 a las 24 horas, pero si este descenso se lleva a cabo rápidamente, es decir la velocidad de la glucólisis es alta, hay una desnaturalización de las proteínas y el agua no se une al músculo, por lo tanto, aumenta la reflectancia y la carne se torna pálida, obteniéndose una carne PSE (pálida, suave y exudativa), el pH final de la carne PSE es de 5.2 a 5.4 mientras que en la carne normal se encuentra entre 5.6 y 5.8. En un trabajo realizado previamente por Hernández *et al.* (2011) se encontró que los valores de pH se situaron alrededor de 5,71 durante los primeros 8 días de almacenamiento y los valores posteriores, al día 8 estuvieron entre 5.75 y 6.05, es decir los valores de pH aumentaron, efecto que no se observó durante el tiempo de almacenamiento de este trabajo.

Yasosky *et al.* (1984) reportaron que la oxidación de los lípidos se incrementa conforme el pH disminuye debido a que a pH menores a 6 hay una ionización de los residuos de histidina, que puede alterar la estructura terciaria de las proteínas reduciendo en su capacidad para secuestrar iones que catalizan la oxidación, este efecto se observó principalmente al día 7 de almacenamiento en muestras con empaque permeable al oxígeno ya que fue el día al cual se obtuvo la mayor concentración de TBARS.

Se han encontrado diferencias entre el pH de diferentes músculos, donde el *Longissimus dorsi* es menos oxidante en comparación de otros como el *B. femoris*. Además, de que el pH

también depende del poder tampón del propio músculo, el cual aumenta con la intensidad del metabolismo glucolítico (Renner *et al.*, 1996).

Hwang *et al.* 2001, señalan pequeñas diferencias en el pH con distintos tratamientos de envasado, siendo al vacío cuando se alcanza un menor pH, lo cual coincide con los resultados que se obtuvieron en este trabajo.

En muestras empacadas con valores de pH entre 5.2 y 5.5 se ha observado que el incremento en el pH se llevo a cabo hasta después del día 21 de almacenamiento, lo cual se observó en este trabajo ya que hubo un ligero aumento en los valores de pH a partir de este día, mientras que en muestras con valores de pH más elevados, casi cercanos a 6 el aumento en los valores de pH se observó a partir del día 7 (Zhu *et al.*, 2001).

De acuerdo a Andrews *et al.* 2007, la carne con valores de pH bajos se asocia frecuentemente con carne que presenta más exudado, dicha característica la presentaron las muestras que se utilizaron durante este trabajo. Estos bajos valores de pH se han asociado con una mayor cantidad de humedad en la superficie de corte lo que resulta de la desnaturalización de la proteína causado por las condiciones ácidas.

7.3.5 Determinación de Aminas biogénicas

El deterioro en la carne es causado por la acumulación de productos metabólicos o por la acción de enzimas extracelulares producidas por los microorganismos capaces de crecer a temperaturas de refrigeración. El principal interés de determinar las aminas biogénicas en la carne es la importancia que tienen desde el punto de vista higiénico-sanitario ya que se utilizan como indicadores tanto de seguridad como de calidad en la carne (Hiu, Y., Legarreta, I., 2006, Hernández-Jover *et al.*, 1997).

Existen evidencias de que las aminas como putrescina, cadaverina, entre otras pueden ser formadas durante el almacenamiento de la carne de cerdo (Hernández- Jover *et al.*, 1997). Por lo tanto estas son las aminas biogénicas detectadas en este trabajo.

7.3.5.1 Determinación de putrescina

El análisis de varianza mostró que existen diferencias significativas para los factores día e interacción tratamiento-día, en muestras con ambos tipos de empaque. Lo anterior indica que la dosis y fuente de vitamina D no tuvieron efecto significativo en la concentración de putrescina (Anexo, Tabla 6 y 10). A continuación, se muestran los resultados correspondientes a las muestras empacadas con película permeable al oxígeno.

Las muestras de T1 y T6 presentaron la mayor concentración de putrescina (314.96 ± 10.59 y 315.88 ± 78.52 ppm, respectivamente), mientras que las muestras de T3 y T8 (151.55 ± 23.34 y 103.96 ± 12.11 ppm, respectivamente) fueron diferentes a las de T6 y T9 presentaron la menor concentración de putrescina (46.98 ± 24.12 ppm, respectivamente Anexo, Tabla 8).

Todos los tratamientos fueron diferentes al día 21, siendo las muestras de T6 las que presentaron la mayor concentración de putrescina (875.55 ± 22.678 ppm) seguidos por las muestras de T3, T1, T7, T8, T2, T10, T4 y T5 (391.57 ± 10.675 , 314.96 ± 22.65 , 297.72 ± 21.45 , 314.59 ± 23.67 , 216.56 ± 25.87 , 209.53 ± 22.76 , 140.41 ± 21.65 y 148.76 ± 25.78 ppm, respectivamente), finalmente las muestras de T9 presentaron la menor concentración al día 21 (54.08 ± 8.54 ppm).

Al inicio del muestreo, la concentración de putrescina fue muy baja y aumentó significativamente a partir del día 14, tanto en muestras provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃ como en cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, a excepción de T6 que mostró la mayor concentración al día 21 (Figura 46 y 47).

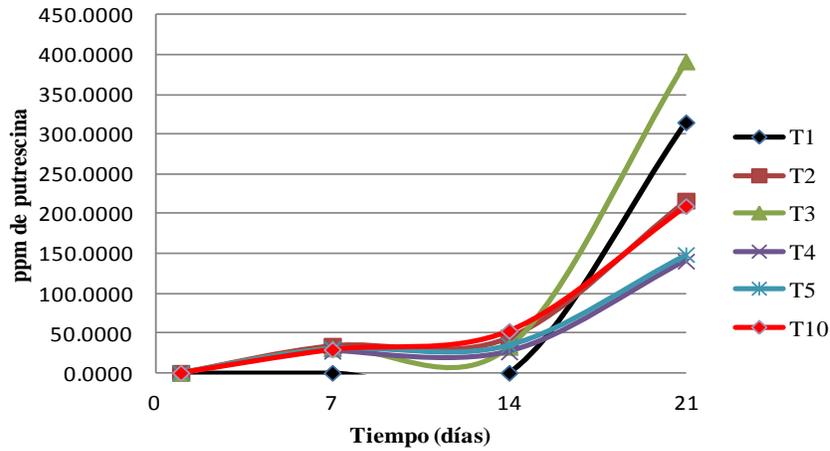


Figura 46. Variabilidad en la concentración de putrescina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃, empacados con película permeable al oxígeno

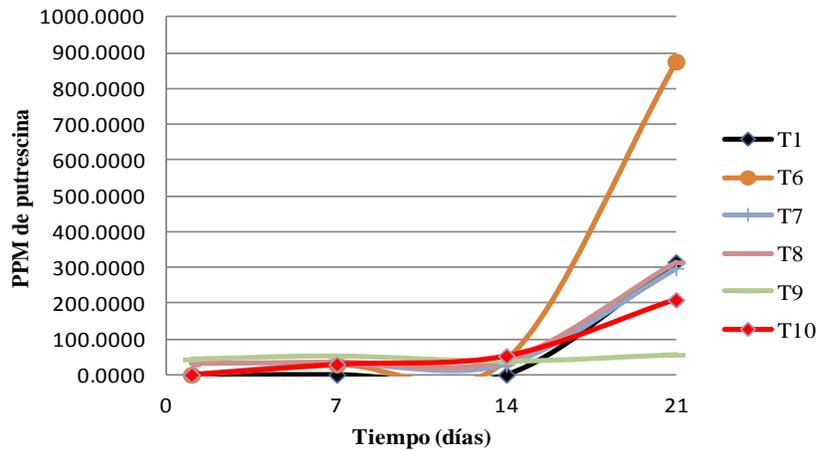


Figura 47. Variabilidad en la concentración de putrescina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol empacados con película permeable al oxígeno

La concentración de putrescina determinada en este trabajo oscila entre 50 y 400 ppm lo cual coincide con lo encontrado por Smela *et al.* 2003 en donde en carne cruda de cerdo encuentran cantidades de 401 ppm al día 16 de almacenamiento.

La generación de putrescina tuvo una correlación positiva con pH (0.096), lo cual es esperado, ya que la actividad amino descarboxilasa que realizan algunos microorganismos presentan un

pH óptimo entre 4 y 5.5, por lo tanto, el aumento en la producción de cadaverina se presentó considerablemente al final del almacenamiento debido a que las muestras presentaron una reducción por debajo de 5.8 en el pH (Silla, 1996).

A continuación se muestran los resultados correspondientes a las muestras con empaque al vacío, en las cuales todos los factores (tratamiento, día, tratamiento-día) fueron significativos ($P \leq 0.05$) en la producción de putrescina.

Las muestras de T4 y T7 arrojaron la mayor concentración de putrescina (142.313 ± 10.3 y 109.181 ± 9.22 ppm, respectivamente) siendo diferente a la concentración del resto de las demás muestras. Las muestras T1 y T3 fueron las que tuvieron la menor concentración de putrescina (24.74 ± 12.23 y 26.67 ± 10.40 ppm, respectivamente, Anexo, Tabla 12).

La concentración de putrescina fue significativamente mayor al día 21, tanto para las muestras del T4 como para las del T7; sin embargo, las muestras del T9 mostraron una concentración de putrescina sin tanta variación durante el tiempo de almacenamiento (Figura 48 y 49).

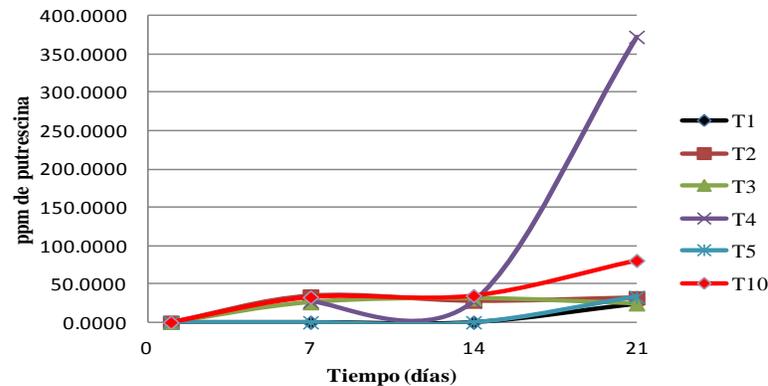


Figura 48. Variabilidad en la concentración de putrescina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃, empacados al vacío.

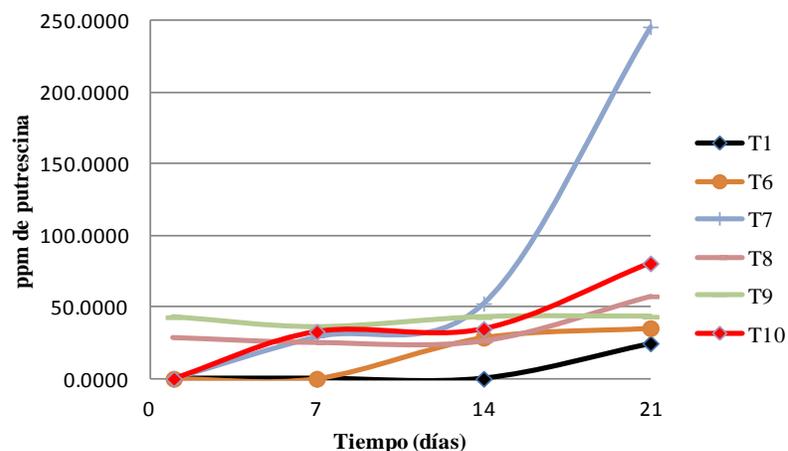


Figura 49. Variabilidad en la concentración de putrescina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío.

La generación de putrescina en muestras con empaque al vacío mostraron una correlación positiva (0.102) con los valores de pH (0.074), por lo tanto, en estas muestras la relación es directa entre el pH y la generación de aminas biogénicas. La presencia de microorganismos interviene en la producción de putrescina debido a que la carne fresca que se mantiene en refrigeración posee una elevada humedad y es alterada por bacterias; en muestras empacadas al vacío con frecuencia los microorganismos predominantes son los lactobacilos y/o *B. thermosphacta*, observándose una mayor presencia en carne cuyo pH es mayor a 6. En este trabajo no se obtuvieron valores de pH superiores a 6, pero si hubo presencia de enterobacterias y mesófilos totales durante el tiempo de almacenamiento, esto corresponde a lo reportado por Dainty *et al.* (1986) donde la producción de aminas biogénicas puede deberse a la actividad de una amplia variedad de microorganismos.

En la producción de putrescina, trabajos previos como el de Quintero B. (2001) encontraron producción de putrescina en carne de pollo inoculada con cultivos bioprotectores, adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a 10 °C. Al día 8, se encontraron valores de 21.07 hasta 77.79 ppm de putrescina; como se observa en este trabajo, las cantidades fueron parecidas a ese día pero aumentaron más durante el tiempo de almacenamiento.

Estadísticamente ambos tipos de empaque no presentaron diferencia significativa en la concentración de putrescina; en algunas estudios se ha encontrado que tanto los microorganismos patógenos como las bacterias ácido lácticas están presentes en empaques al vacío y permeables al oxígeno. Por lo tanto, dichos microorganismos pueden tener capacidad para convertir los aminoácidos en aminas biogénicas ya que la mayoría posee más de una actividad amino descarboxilasa, (Kuley *et al.*, 2012, Silla 1996).

7.3.5.2 Determinación de cadaverina

El análisis de varianza mostró que existe diferencia significativa para los factores día e interacción tratamiento-día en muestras con ambos tipos de empaque. Lo anterior indica que las dosis y fuente de vitamina D no tuvieron efecto significativo ($P \leq 0.05$) en la concentración de cadaverina (Anexo, Tabla 6 y 10). A continuación se muestran los resultados correspondientes a las muestras empacadas con película permeable al oxígeno.

Las muestras de T6 (568.78 ± 110.10 ppm) mostraron la mayor concentración de cadaverina, siendo diferentes a las muestras de los demás tratamientos, las muestras de T9 fueron las que mostraron la menor concentración de cadaverina (64.12 ± 12.32 ppm).

Al día 21 se obtuvo la mayor concentración de cadaverina para todas las muestras, siendo las muestras de T6 las que presentaron la mayor concentración (2218.35 ± 8.98 ppm) pero estadísticamente igual a las muestras de T1, T2, T7, T8 y T10 (1442.021 ± 8.76 , 899.022 ± 10.34 , 1049.159 ± 11.45 , 768.73 ± 12.67 y 854.42 ± 16.65 ppm, respectivamente); mientras que las muestras de T9 fueron las que presentaron la menor concentración de cadaverina a ese mismo día (128.25 ± 12.56 ppm).

El efecto del tiempo fue significativo en esta determinación ya que todos los días de almacenamiento fueron diferentes, en el día 1 y 7 la concentración de cadaverina fue menor, mientras que al día 14 se observó un aumento en la concentración de cadaverina, esto se observa en las Figuras 50 y 51, lo cual coincide con lo reportado por Ruiz, C., Jiménez, F., (2004) ya que ellos obtuvieron mayor concentración al día 14 de almacenamiento en muestras de carne de cerdo cruda.

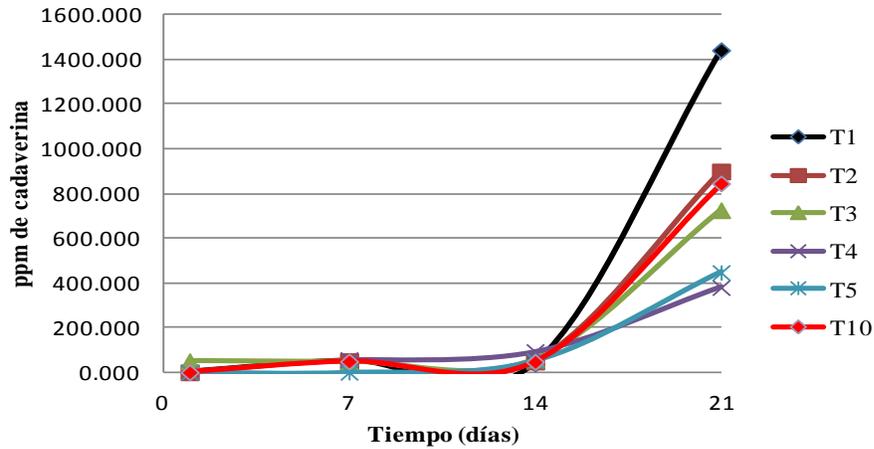


Figura 50. Variabilidad en la concentración de cadaverina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃, empacados con película permeable al oxígeno.

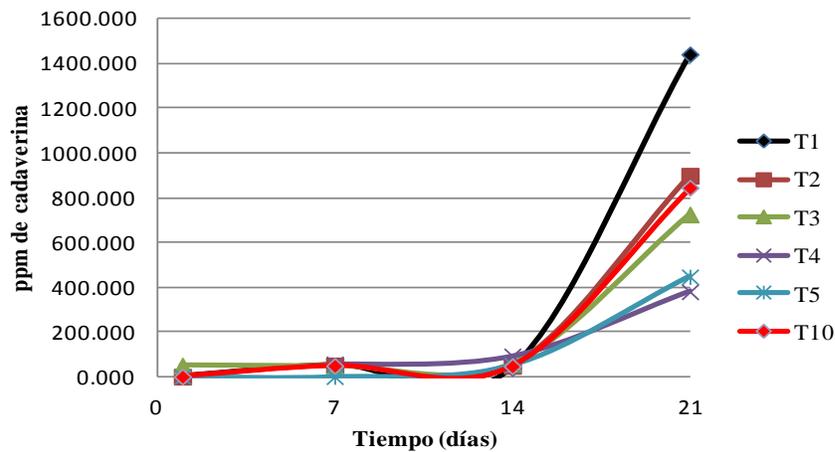


Figura 51. Variabilidad en la concentración de cadaverina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados con película permeable al oxígeno

La producción de cadaverina en muestras empacadas con película permeable al oxígeno mostraron una correlación positiva con los valores de pH (0.05), esta relación directa coincide con lo reportado por la literatura ya que bacterias del género *Bacillus*, así como, enterobacterias y *Brochotrix thermosphacta* poseen la capacidad de producir cadaverina (Dainty *et al.*, 1986). También, se ha comprobado que la presencia de *Pseudomonas*,

incrementa la generación de cadaverina en carne almacenada (Silla, 1996). Pircher *et al.* (2007) encontraron que la mayoría de las *Pseudomonas* (147 de 149 cepas) se aislaron a partir de carne de cerdo cruda y fueron capaces de formar alrededor de 100 mg/L de cadaverina.

A continuación se muestran los resultados correspondientes a las muestras con empaque al vacío, en donde los factores día y la interacción tratamiento-día fueron significativos ($P \leq 0.05$).

La mayor concentración de cadaverina la generaron T4 (939.29 ± 110.3 ppm), siendo significativamente para T7 y T10 (584.743 ± 90.22 y 411.89 ± 102.36 ppm, respectivamente). El resto de las muestras no presentaron diferencias en la concentración de cadaverina. Sin embargo, a partir del día 14 la concentración se incrementó significativamente en comparación al día 1 (Figura 52 y 53).

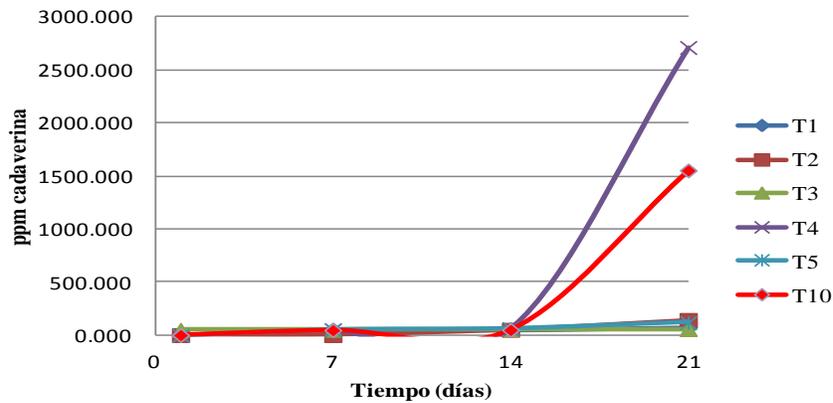


Figura 52. Variabilidad en la concentración de cadaverina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con vitamina D₃, empacados al vacío.

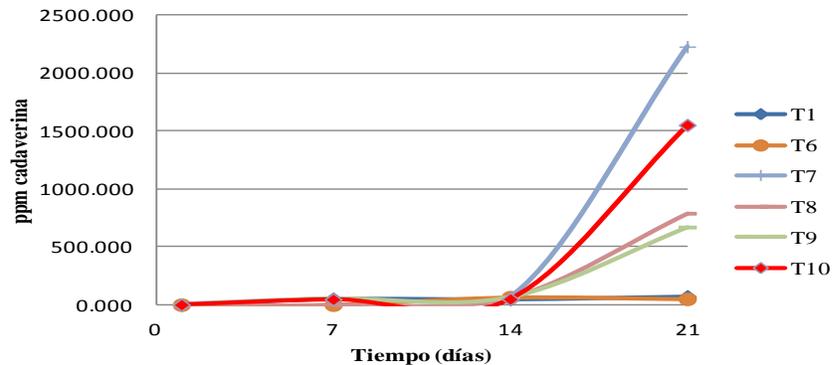


Figura 53. Variabilidad en la concentración de cadaverina durante el tiempo de almacén en cortes provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol, empacados al vacío.

La producción de cadaverina en muestras empacadas al vacío mostró una correlación positiva con el pH (0.049), por lo tanto en estas muestras el pH también presentó una relación directa con la producción de cadaverina con empaque al vacío.

La producción de cadaverina de acuerdo a Quintero B. 2001, se encuentra en valores de 16.98 hasta 58.45 ppm, al día 8 de almacenamiento; en este trabajo se observan resultados similares de cadaverina en ambos tipo de empaque al día 8. Después de este día de almaceamiento, la concentración fue mayor debido a que el músculo de cerdo es diferente en composición al de pollo; además de que el tiempo durante el cual se almacenó la carne fue más amplio, por lo tanto era de esperarse que el crecimiento bacteriano aumentara y por consiguiente la generación de aminas biogénicas, de acuerdo a Silla (1996), las enterobacterias producen principalmente cadaverina, aunque también se ha observado una correlación entre la producción de cadaverina y la cuenta de coliformes, por ejemplo, si se encuentra presente *E. coli* la generación de cadaverina aumenta (Jay, 1976). Estos resultados también corresponden a los reportado por Min *et al.* 2007 en donde inocularon porciones de lomo de cerdo con *Bacillus cereus* y obtuvieron con este microorganismo mayor generación de cadaverina.

En este trabajo la concentración de cadaverina oscila entre 2000 ppm, estos resultados fueron más elevados que los encontrados en la bibliografía, ya que en un trabajo previo realizado por Smela *et al.* (2003), la concentración de cadaverina fue de 601 ppm en carne de cerdo cruda al día 16 de almacenamiento, sin embargo en este trabajo al ser el tiempo de almacenamiento mayor, la concentración de cadaverina fue mayor.

De acuerdo a Halász *et al.*, (1994) la población de enterobacterias necesaria para que se produzca cadaverina debe de ser de 5 log ufc/g de carne, aunque en algunos otros trabajos de este mismo autor se reportan desde 1 log ufc/g de carne. Por lo tanto, se puede decir que no son necesarias elevadas cantidades de enterobacterias para que se lleve a cabo la descarboxilación de lisina a cadaverina. Ambos tipos de empaque no presentaron diferencia significativa en la concentración de aminas biogénicas, por lo tanto el empaque no fue un factor determinante para la aparición de cadaverina en las muestras.

A pesar de que en este trabajo no se presentaron diferencias significativas por efecto del tipo de empaque, algunos autores (Hernández-Jover *et al.*, 1997; Min *et al.*, 2007) sugirieron que la producción de aminas biogénicas también se genera en carne al vacío, además de que este tipo de determinaciones podría ser útil para evaluar la frescura de la carne, estos mismos autores proponen que el valor de aminas debería de ser por debajo de 5 $\mu\text{g/g}$, pero debido a la amplia variedad de métodos y a la variación natural presentada en cada producto no se ha podido establecer un índice de aminas biogénicas homogéneo.

Los resultados de la producción de cadaverina y putrescina tuvieron concordancia con los presentados por Dainty *et al.* (1986) y Halász *et al.* (1994) dado que en carne cruda de cerdo la concentración de cadaverina fue mayor que la de putrescina durante el tiempo de almacenamiento en muestras con ambos tipos de empaque.

8. CONCLUSIONES

- 1) Actividad antioxidante mediante métodos químicos:
 - a. La actividad antioxidante en la carne se modificó por efecto del tiempo y del tipo de empaque, al vacío y al día 7 la actividad antioxidante fue mayor.
 - b. La carne proveniente de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol mostró una mayor respuesta antioxidante durante el tiempo de almacenamiento. Las menores dosis de 25-OH colecalciferol (T6 y T7) tuvieron un comportamiento similar a las menores dosis de vitamina D₃ (T2 y T3).
 - c. La actividad reductora sobre el hierro (FRAP) se modificó por el efecto del tiempo, de la fuente de vitamina D y del tipo de envase, ya que las muestras provenientes de cerdos suplementados con 25-OH colecalciferol y empacadas al vacío mostraron una mayor actividad reductora.
- 2) Actividad enzimática:
 - a. La actividad enzimática de la catalasa, cambio por efecto del tiempo de almacenamiento y la fuente de vitamina D.
 - i. La carne obtenida a partir de los tratamientos con 25-OH colecalciferol, propiciaron una menor generación de SRO, por lo tanto, estos tratamientos se consideran apropiados para tener una mayor protección en la generación de peróxido en la carne.
 - b. La actividad de la GPX se modificó por efecto del tiempo de almacenamiento y por la fuente de vitamina D.
 - i. La vitamina 25-OH colecalciferol (T6 y T7) supone mantuvo bajas cantidades de SRO, por lo tanto, se considera apropiado el uso para retardar la producción de peróxido de hidrógeno en la carne de cerdo.
 - c. La actividad de la SOD no se modificó por efecto del tratamiento y por el tipo de empaque utilizado, únicamente por efecto del tiempo de almacenamiento.
- 3) La concentración de TBARS cambio por efecto del tiempo de almacenamiento y por efecto del tipo de envase, ya que la mayor concentración de TBARS fue al día 7 y con envase al vacío la concentración de TBARS fue menor.

- 4) La diferencia en el color se modificó por efecto del tiempo de almacenamiento y por el tipo de empaque, siendo las muestras con empaque al vacío en las que la diferencia de color fue menor.
- 5) Oxidación proteica:
 - a. La producción de grupos carbonilo se modificó por el tiempo de almacenamiento y por la fuente de vitamina 25-OH colecalciferol (T6 y T7) generando las menores concentraciones de carbonilos. La mayor concentración de grupos carbonilo fue al día 28.
 - b. La intensidad de fluorescencia se modificó solo por efecto del tiempo de almacenamiento.

En base a lo anterior:

En algunas determinaciones realizadas en este trabajo el tratamiento asignado y el tipo de empaque de las muestras no tuvo efecto alguno, sin embargo, el tiempo de almacenamiento fue significativo en todas las determinaciones que se realizaron. Además, se logró establecer una relación entre las pruebas FRAP y de DPPH• para determinar la capacidad antioxidante ya que durante el tiempo de almacén fueron complementarias. La actividad enzimática antioxidante de CAT y GPX están relacionadas con la producción SRO en la carne, por lo tanto, ambas pruebas se podrían utilizar como sistemas acoplados para determinar el daño oxidante. Los tratamientos que presentaron mejores resultados para las pruebas enzimáticas, pruebas antioxidantes químicas y en la estabilidad del color en carne de cerdo fueron en su gran mayoría los tratamientos con 25-OH colecalciferol o bien los tratamientos solo con altas concentraciones de vitamina D₃. Se obtuvo una relación entre la oxidación lipídica y la oxidación proteica durante el almacenamiento y por efecto de la adición de vitaminas. No se pudo determinar una tendencia en el comportamiento en general de la carne para los dos tipos de empaque utilizados.

A pesar de que la 25-OH colecalciferol en algunas determinaciones mostró efectos deseables en la carne de cerdo, sería conveniente estudiar algunas dosis diferentes para que se pudieran obtener resultados más contundentes en cuanto al beneficio de suministrar a los cerdos en finalización estas vitaminas.

9. SUGERENCIAS

De todas las variables estudiadas se sugiere utilizar: índice de color, actividad antioxidante (DPPH• y FRAP), pH y oxidación lipídica (TBARS) para futuros estudios, ya que estas variables son suficientes para monitorear la estabilidad oxidante de la carne durante el tiempo de almacenamiento.

Por otra parte para poder comprobar el efecto de la vitamina D₃ en la carne se sugiere que los métodos utilizados se complementen con otros, por ejemplo: buscando vitamina D en músculo, mediante el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), así como también realizar técnicas electroforéticas (uso de zimogramas) para poder corroborar que la actividad enzimática encontrada corresponde a la actividad de las enzimas antioxidantes.

Finalmente debió de haberse realizado un análisis para obtener la actividad antioxidante de las dietas, una vez obtenidos esos datos si no había diferencia, las dietas se pudieron haber reformulado.

10. PRODUCCIÓN

Hernández-Hernández I., López-Hernández LH., Braña-Varela D., Ponce-Alquicira E. Effect of dietary supplementation with vitamin D₃ and 25-OH D₃ in antioxidant stability of pork. 2012 5th International Congress Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries, Nuevo Vallarta, México.

Hernández-Hernández I., López-Hernández LH., Braña-Varela D., Ponce-Alquicira E. Effect of dietary supplementation with vitamin D₃ and 25-OH D₃ in antioxidant activity of the enzymes catalase, glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) of pork. 2012, 5th International Congress Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries, Nuevo Vallarta, México.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aebi, H. 1984. *Catalase in vitro*. Methods in enzymology. 105: 121-126
- AMSA 1991. *Guidelines for meat color evaluation*. In Proceedings 44th Annual Reciprocal Meat Conference, 9-12 June, Kansas, EUA Pp:1-17.
- Andrews, B., Hutchison, S., Unruh, A., Hunt, M., Boyer, J., Johnson, C. 2007. *Influence of pH at 24 h postmortem on quality characteristics of pork loins aged 45 days postmortem*. Journal of Muscle Foods. 18(4):401–419.
- Armenteros, M., Heinunen M., Ollilainen V., Toldrá F., Estévez M. 2009. *Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–ESI–MS)*. Meat Science. 83: 104-112
- Arnold, R.M., Arp, S.C., Scheller, K.K., Shaefer, D. M. 1993. *Tissue equilibration and subcellular distribution of vitamin E relative to myoglobin and lipid oxidation in displayed beef*. Journal of Animal Science. 71: 105
- Avanzo, J., De Mendoza, C., Piccoli, S.M. 2001. *Effect of vitamin E and selenium on resistance to oxidative stress in chicken superficial pectoralis muscle*. Comparative Biochemistry and Physiology. 129:163-173
- Badiu, D. S. 2009. *Química de los alimentos*. 5ª Edición. Editorial Parson Educación., México D. F.
- Ball, George. 2006. *Vitamins in food*. Analysis bioavailability and stability. Tylor and Francis group. New York pp: 107-116
- Bello, J. 2000. *Ciencia bromatológica. Principios generales de los alimentos*. Díaz de Santos. España, 179-181, 195.
- Bender, A. 1997. *Nutrición y alimentos dietéticos*. 2da Edición. Editorial Acribia Zaragoza. España. Pp: 279-285
- Bourges, H., Casaueva, E., Rosado, J. 2005. *Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana*. Tomo I. Editorial Medica Panamericana. México pp: 43-46
- Buckley, D., Gray, J., Asghar, A., Price, J., Crackle, R., Boorem, A., Pearson, A., Miller, E. 1989. *Effects of dietary antioxidants and oxidized corn oil on membranal lipid stability and pork product quality*. Journal of Food Science. 54:1193-1198
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. 1995. *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. Lebensm-Wissenschaft and Technologie. 28: 25-30.
- Carnagey, K., Huff-Lonergan, E., Trenkle, A., Wertz, A., Horst, R., Beitz, D. 2008. *Use of 25-hydroxyvitamin D₃ and vitamin E to improve tenderness of beef from the longissimus dorsi of heifers*. Journal of Animal Science. 86:1649-1657

- Chacón, A. 2004. *La suavidad de la carne: implicaciones físicas y bioquímicas asociadas al manejo y proceso agroindustrial*. Agronomía Mesoamericana. 15(2): 225-243
- Chelh, I., Gatellier, P., Santé-Lhoutellier V. 2007. *Characterization of fluorescent Schiff bases formed during oxidation of pig myofibrils*. Meat Science. 76:210-215
- Chihuailaf, R.H., Contreras, P.A. 1996. *Patogenésis del estrés oxidativo consecuencias y evaluación en salud animal*. Veterinaria México 33(3):265-283
- Criado, C., Moya, M. 2009. *Vitaminas y antioxidantes*. 2da Edición. Editorial Grupo Saned. Madrid, España. Pp:323-350
- Dainty, R., Edwards, R., Hibbard, C., Ramantanis, S. 1986. *Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packaged beef*. Journal of Application of bacteriology. 61:117-123.
- Descalzo, A. M., Insani, E. M., Biolatto, A., Sancho, A. M. 2005. *Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of argentine beef*. Meat Science. 70: 35-44.
- Descalzo, A. M., Rossetti, L., Sancho, A. M., García, P. T., Biolatto, A., Carduza, F., Grigioni, G. M. 2008b. *Antioxidant consumption and development of oxidation during ageing of buffalo meat produced in Argentina*. Meat Science. 79:582-588.
- Descalzo, A. M., Sancho, A. M. 2008a. *A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina*. Meat Science. 79: 423-426.
- De Mey, E., Drabik, G., De Maere, H., Peeters, M., Derdelinckx, G., Paelinik, H., Kowalska, T. 2012. *Dabsyl derivatisation as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography*. Food Chemistry. 130:1017-1023
- DeVore, R. V., Greene E.B. 1982. *Glutathione peroxidase in post-rigor bovine semitendinosus muscle*. Journal of food science. 47: 1406-1409
- Díaz-Acosta, A., Membrillo, J. 2006. *Consecuencias Fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos*. Tip Revista Especializada en ciencias químico-biológicas. 9 (1): 34-44
- Enright, K., Anderson, B., Ellis M. *The effects of feeding high levels of vitamin D3 on pork quality*. Journal of Animal Science. 76(1): 110-117
- Estévez, M. 2011. *Protein carbonyls in meat systems: A review*. Meat Science. 89:259-279
- Estévez, M., Kylli, P., Ruolanne, E., Kivikari, R., Heinonen, M. 2008. *Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions*. Meat Science. 80:1290-1296

- Fennema, R. O. 1998. *Química de los alimentos*. Editorial ACRIBIA S.A., Zaragoza España. Pp: 199-223
- Filgueras, R., Gatellier, P., Aubry, L., Thomas, A., Bauchart, D., Durand, D., Zambiasi, R., Santé-Lhoutellier, V. 2010. *Colour, lipid and protein stability of Rhea americana meat during air- and vacuum-packaged storage: Influence of muscle on oxidative processes*. Meat Science. 86:665–673.
- Fleet, J., DesMet, M., Johnson, R., Li, Y. 2012. *Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms*. Journal of Biochemical. 441:61-76
- García, B., Onel, G. 1995. *Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. Ciudad de la Habana, Revista Cubana de Investigación Biomédica. Pp: 14-22
- Gatellier, P., Mercier, Y., Juin, H., Renerre, M. 2005. *Effect of finish mode (pasture-or mixed-diet) on lipid composition, colour stability and lipid oxidation in meat from Charolais Cattle*. Meat Science. 69:175-186.
- Gil, A. 2010 *Tratado de nutrición: bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. Tomo I. 2da edición. Editorial Médica Panamericana. México D. F. Pp: 468-470
- Gordon, A., Barbut, S. 1992. *Mechanisms of meat batter stabilization: a review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 32(4): 299 - 332.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 4ta Edición. Oxford University Press, New York. Pp: 81-110, 336-340.
- Halász, A., Bárath, Á., Simon-Sakardi, L. y Hozalfel, W. 1994. *Biogenic amines and their production by microorganisms in food*. Trends in Food Science and Technology, 5:42-49.
- Hernández, P., Park, D., Soon K. 2001. *Chloride salt type/ionic strength, muscle site and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid oxidation in pork*. Meat Science 61:405-410
- Hernández, P., Zomeño, L., Ariño, B., Blasco, A. 2004. *Antioxidant, lipolytic and proteolytic enzyme activities in pork meat from different genotypes*. Meat Science. 66:525-529.
- Hernandez-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M. Veciana-Nogués, M. MarinC-Font, A. Vidal-Carou, M. 1997. *Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45:2098-2102
- Higgs, J. D. 2000. *The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality*. Trends in Food Science and Technology. 11(3): 85-95.
- Hiu, Y.A., Legarreta, A. I. 2006. *Ciencia y tecnología de carnes*. Editorial Limusa, México D. F. Pp. 212-223.

- Holmer, S., McKeith, R., Boler, D., Dilger, A., Eggert, J., Petry, D., McKeith, F., Jones, K., Killefer, J. 2009. *The effect of pH on shelf-life of pork during aging and simulated retail display*. Meat science. 82:86-93
- Hunt, J. R., Gallagher, S. K., Johnson, L. K., Lykken, G. I. 1995. *High- versus low meat diets: effects on zinc absorption, iron status, and calcium, copper, iron, magnesium, manganese, nitrogen, phosphorus and zinc balance in postmenopausal women*. American of Clinical Nutrition, 62: 621-632.
- Hwang, I., Thompson, J. 2001. *The interaction between pH and temperature decline early postmortem on the calpain system and objective tenderness in electrically stimulated beef longissimus dorsi muscle*. Meat Science. 58 (2):167-174
- Iris, F., Benzie, F., Strain, J. 1999. *Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidants activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration*. Methods in Enzymology. 299:15-27.
- Jan P., Yanishlieva, N., Gordon M. 1995. *Antioxidantes en los alimentos aplicaciones prácticas*. Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza España. Pp: 23,45, 69-71, 141-145.
- Jay, M., Shelef, A. 1976. *Effect of microorganisms on meat proteins at low temperatures*. Journal of Agricultural of Food Chemistry. 24 (6): 1113-1116.
- Juniper D., Phipps R., Ramos-Morales E., Bertin G. 2009. *Effects of dietary supplementation with selenium enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in lambs*. Animal Feed Science and Technology. 149: 228-239
- Kagan, V.E. 1986. *In lipid peroxidation in biomembranes* (pp 29). Boca Raton, Fl., CRC Press
- Knox, L., Van Laack, M., Davidson, M. 2008. *Relationships between ultimate pH and microbial, chemical, and physical characteristics of vacuum packaged pork loins*. Journal of Food Science, 73(3):104–110.
- Konigsberg, M. 2008. Radicales libres y estres oxidativo. Aplicaciones médicas. 2da edición, Manual moderno.
- Kuley, E., Balıkcı E., Gökdoğan, S., Ozogul, F. 2012. *Stimulation of Cadaverine Production by Foodborne Pathogens in the Presence of Lactobacillus, Lactococcus, and Streptococcus spp.* Journal of Food Science. 77(12):650-658.
- Lahucky R., Bahelka I., Kuechenmeister U., Vasickova K., Nuernberg K., Ender K., Nuernberg G. 2007. *Effects of dietary supplementation of vitamins D₃ and E on quality characteristics of pigs and longissimus muscle antioxidative capacity*. Meat Science, 77, 264-268.

- Lauridsen, C., Holm Nielsen, J., Henckel, P., Sorensen, M. 1999. *Antioxidative and oxidative status in muscles of pigs fed rapeseed oil, vitamin E and copper*. Journal of animal science. 77:105-115
- Lawrance J. 2005. *Handbook of vitamins*. 2da edición. Marcel Dekker Inc. New York and Besel, New York, pp: 60-72
- Lawrence R. W., Doyle J., Elliott R., Loxton I., McMeniman J. P., Norton B. W., Reid D. J., Tume R. W. 2006. *The efficacy of a vitamin D₃ metabolite for improving the myofibrillar tenderness of meat from Bos indicus cattle*. Meat Science, 72, 69–78
- Lawrie, R. A. 1998. *Ciencia de la carne*. 3ª Edición. Editorial. ACRIBIA S.A., Zaragoza, España. Pp:57-67,93-100,103-104,175-183
- Lindahl, G., Karlsson, H., Lundström, K., Andersen, J. 2006. *Significance of aging time on degree of blooming and colour stability of pork loin from different crossbreeds*. Meat Science: 72(4), 603–612
- Lund, M., Hviid, S., Claudi-Magnussen, C., Skibsted, L. 2008. *Effects of dietary soy bean oil on lipid and protein oxidation in pork patties during chill storage*. Meat Science. 79:727-733
- Lund, M., Lametsch, R., Hviid, M., Jensen, N., Skibsted, L. 2007 *High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine Longissimus dorsi during chikk storage*. Meat Science. 77:295-303
- Machlin, L. 1999. *Handbook of vitamins*. 2da Edición. Editorial Mercer Dekker, Inc. New York and Basel. New York, EUA. Pp: 60-71
- Mancini, R.A., Hunt, M.C., Kropf, C. 2003. *Reflectance at 610 nanometers estimates oxymyoglobin content on the surface of ground beef*. Meat Science. 64:157-162.
- Matte, J. 2007. *Estabilidad del color de la carne fresca*. Nacameh. 1:67-74
- Mei, L., Crum, A. D., Decker, E.A. 1994. *Development of lipid oxidation and inactivation of antioxidant enzymes in cooked pork and beef*. Journal of Food Lipids. 1:272-283.
- Min, B., Nam, K.C., Cordray, J., Ahn, D.U. 2008. *Endogenous factors affecting oxidative stability of beef loin, pork loin, and chicken breast and thigh meats*. Journal of Food Science. 73:439-446.
- Min, J., Lee, S., Jang, A., Jo, C., Lee, M. 2007. *Irradiation and organic acid treatment for microbial control and the production of biogenic amines in beef and pork*. Food Chemistry. 79:191-189
- Muller H., Tobin G.1991. *Nutrición y ciencia de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. Pp: 29-31
- Naguib, M., Yousry, M. 2000. *Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids*. Journal of agricultural food chemistry. (48):1150-1154

- O'Sullivan, M. G., Byrne, D. V., Martens, H., Andersen, H. J., Martens M. 2003. *Evaluation of pork color: prediction of visual sensory quality of meat from instrumental and computer vision methods of color analysis*. Meat Science. 65:909-918
- Ozogul, F., Taylor, K., Quantick, P., Ozogul, Y. 2002. *Changes in biogenic amines in herring stored under modified atmosphere and vacuum pack*. Journal of food science. 67(7):2496-2501
- Padilla, F. C., Rincón, A. M., Bou-Rached, L. 2008. *Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces*. Archivos latinoamericanos de nutrición. 58: 303-308.
- Palozza, P., Krinsky, N. 1992. *Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model*. Archives of biochemistry and biophysics. 297(2):291-295
- Papas, A. M., 1999. *Diet and antioxidant status*. Food Chemistry and Toxicology. 37: 999-1007
- Pradhan, A., Rhee, K.S., Hernández P. 2000. *Stability of catalase and its potential roel in lipid oxidation in meat*. Meat Science. 54:385-390
- Price, J. Schweigert, B. 1994. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. 2da Edición. Editorial ACRIBIA S. A., Zaragoza, España. Pp. 57-109, 175-188.
- Quintero B. 2001. *Empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la calidad microbiológica y fisicoquímica de carne de pollo almacenada en condiciones de abuso de temperatura*. Tesis de Maestría. UAM-Iztapalapa.
- Raharjo, S., Sofos, J. N., Schmidt, G. R. 1992. *Improved Speed, Specificity and Limit of Determination of an Aqueous Acid Extraction Thiobarbituric Acid C18 Method for Measuring Lipid Peroxidation in Beef*. J. Agric. Food Chem. 40(11): 2182-2185
- Renerre, M., Dumont, F., Gatellier, P. 1996. *Antioxidant enzymes activities in beef in relation to oxidant of lipid and myoglobin*. Meat Science 43(2):111-121
- Rhee, K. S., Anderson, L. M., Sams, A. R. 1996. *Lipid oxidation potential of beef, chicken and pork*. Journal of food Science. 61:8-12
- Ripoll G., Joy M, Muñoz F. 2011. *Use of dietary vitamin E and selenium (Se) to increase the shelf life of modified atmosphere packaged light lamb meat*. Meat Science, 87,88-93.
- Ruiz-Campillas, C y Jimenez-Colmenero, J.F. 2004. *Biogenic Amines in Meat and Meat Products*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44(7-8): 489-599.
- Sardar, S. 1996. *Comparative effectiveness of vitamin D₃ and dietary and vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidants system in Sprague-Dawley rats*. International. Journal of Vitamin Nutrition Research. 66:39-45.

-
- Seehafer, S., Pearce, D. 2006. *You say lipofuscin we say ceroid: defining autofluorescent storage material*. *Neurobiology of aging*. 27:576-58
 - Signorini, M. L., Guerrero, I. 2009. *Producción de aminas biogénicas en carne de bovino conservada con ácido láctico de origen químico y bacteriano*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 8(1): 41-49
 - Silla, M. 1996. *Biogenic amines: their importance in foods*. *International Journal of Food Microbiology* 29 (2): 13-23
 - Skrivanová E., Marounek M., De Smet S., Raes K. 2007. *Influence of dietary selenium and vitamin E on quality of veal*. *Meat Science*. 76:495-500
 - Smela, D., Pechova, P., Komprda, T., Klejdus, B., Kuban V. 2003. *Liquid chromatographic determination of biogenic amines in a meat product during fermentation and long-term storage*. *Czech journal food science*. 21(5):167-175
 - Smith, D. 1987. *Functional and biochemical changes in deboned turkey due to frozen storage and lipid oxidation*. *Journal of Food Science*. 52:22-26
 - Stadman, E. R. 1990. *Metal ion-catalysed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences*. *Free radical biology and medicine*. 8:315-325
 - Stadman, E. R. 1993. *Oxidation of free amino acids residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions*. *Annual review of biochemistry*. 62:797-821
 - Swigert K. S., McKeith F. K., Carr T. C., Brewer M. S., Culbertson M. 2009. *Effects of dietary vitamin D₃, vitamin E, and magnesium supplementation on pork quality*. *Meat Science*, 67, 81–86.
 - United State Department of Agriculture, 2004
 - Wilborn, B., Kerth, C., Owsley, W., Jones, W., Frobish, L. 2004. *Improving pork quality by feeding supranutritional concentrations of vitamin D₃*. *Journal of animal science*. 82(1):218-224
 - Wilborn, B., Kerth, C., Owsley, W., Jones, W., Frobish, L. 2004. *Improving pork quality by feeding supranutritional concentrations of vitamin D₃*. *Journal of Animal Science*. 82: 218-224
 - Wiseman H. 1993. *Vitamin D is a membrane antioxidant*. *Federation of European Biochemical Societies a través de Elsevier Science Publishers*. 326(1,2,3): 285-288.
 - Xia, X., Kung, B., Liu, Q., Liu, J. 2009. *Physicochemical change and protein-oxidation in porcine Longissimus dorsi as influenced by different freeze-thaw cycles*. *Meat Science* 83:239-245

- Xiong, Y.L. 2000. *Protein oxidation and implications for muscle foods quality*. En EA Decker y López Bote (editores), *antioxidants in muscle foods* (pp:85-111) New York; Willey
- Yasosky, J. J., Aberle, E. D., Peng, I. C., Mills, E. W. y Judge, M. D. 1984. *Effects of pH and time of grinding on lipid oxidation of fresh ground pork*. *Journal of Food Science*. 49: 1510–1512.
- Zhu, G., Brewer, S. 1998 *Discoloration of fresh pork as related to muscle and display conditions*. *Journal of Food Science*, 63(5):763–767.
- Zhu, L., Bidner, B., Brewer, M. 2001. *Postmortem pH, muscle and refrigerated storage effects on ability of vacuum-packaged pork to bloom*. *Journal of food science*. 66(8):1230-1235

12. ANEXOS

12.1 Gráficos de curvas patrón

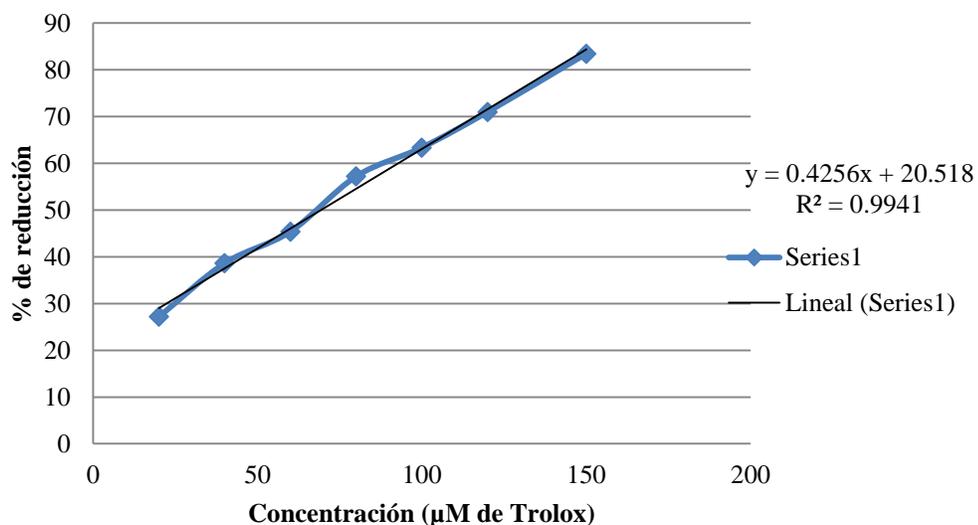


Figura 54. Curva de calibración a partir de Trolox para determinar la actividad reductora mediante el método de FRAP

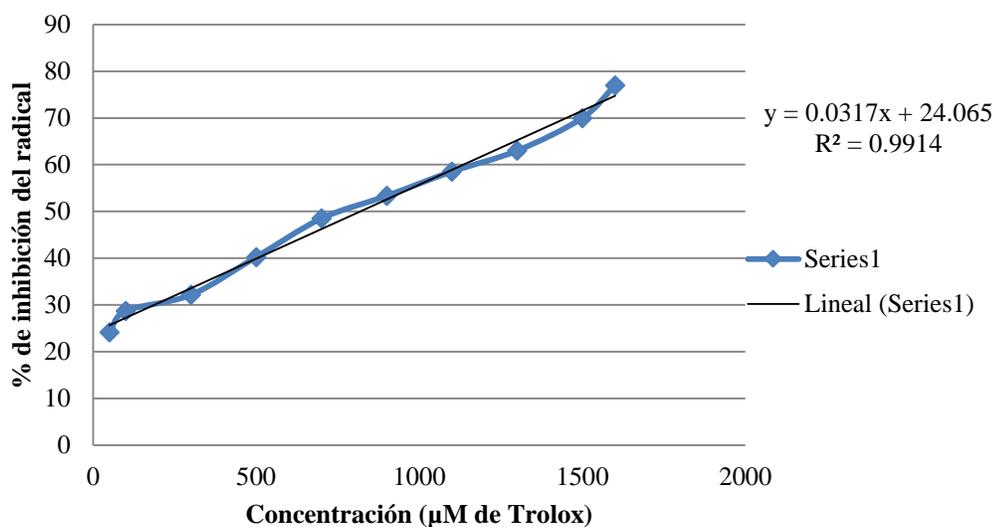


Figura 55. Curva de calibración a partir de Trolox para determinar la actividad antioxidante mediante la inhibición del radical DPPH^\bullet .

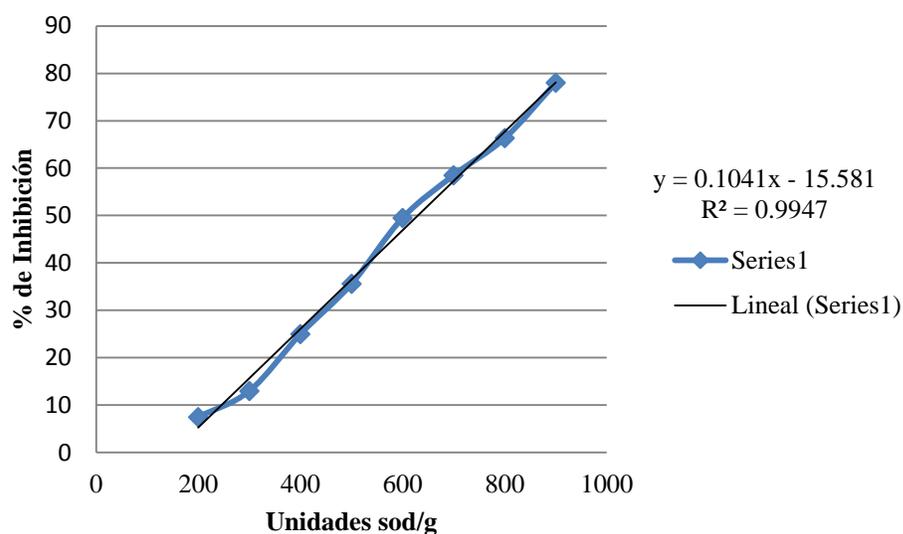


Figura 56. Curva de Inhibición de SOD

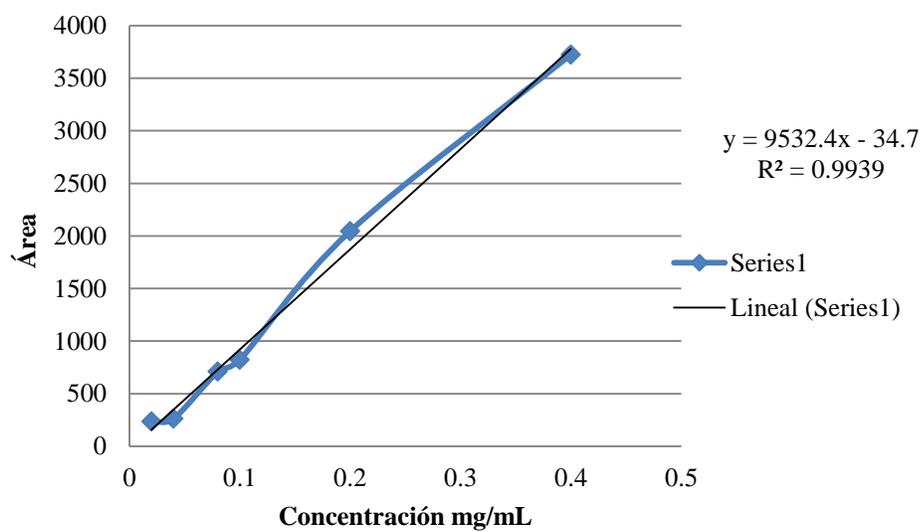


Figura 57. Curva de calibración para putrescina.

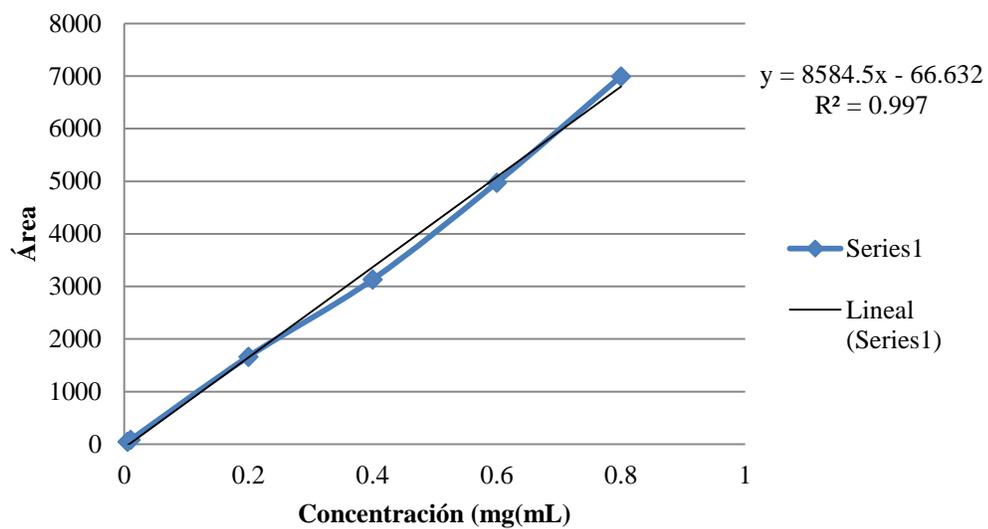


Figura 58. Curva de calibración para cadaverina.

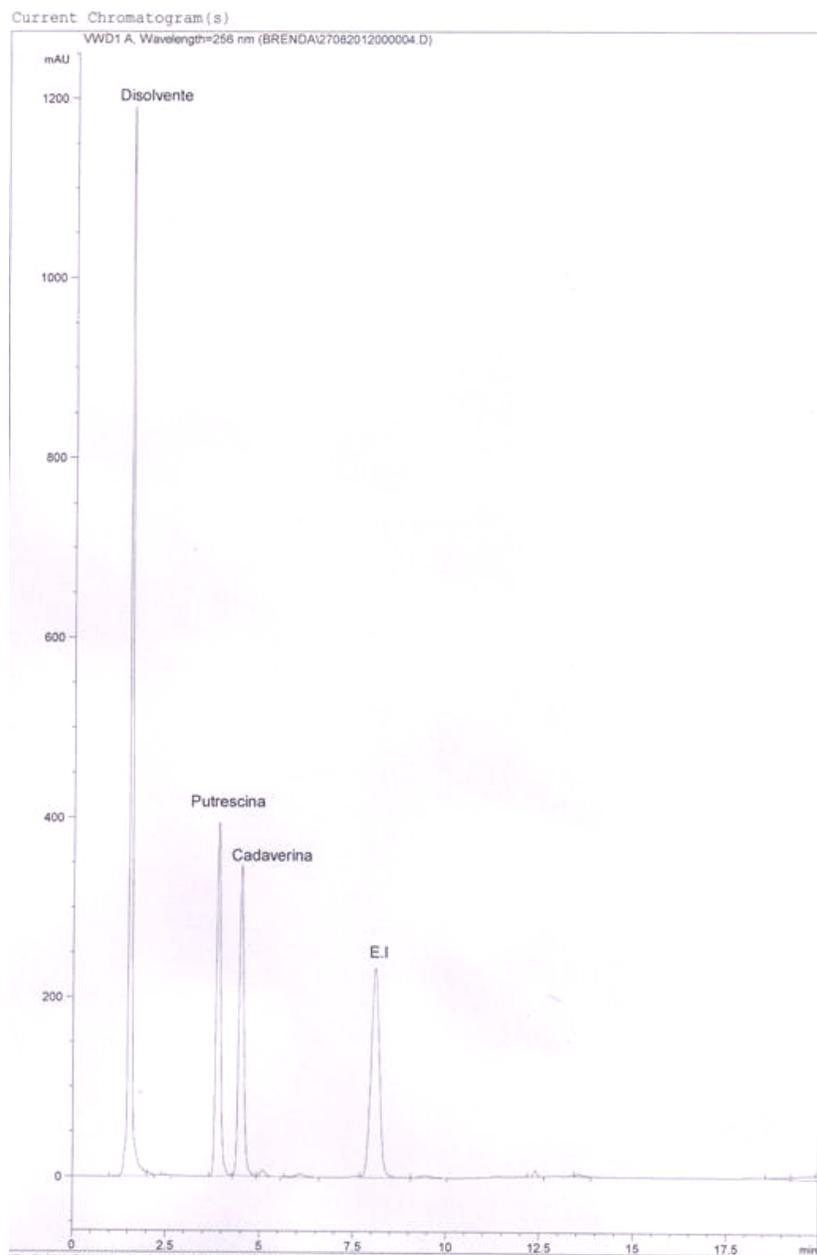


Figura 59. Cromatograma a 254 nm de la separación de aminas biogénicas mediante el uso de una columna de fase reversa poroshell 120 EC-C18 con una longitud de 4.6x50 mmy un tamaño de poro de 129A, volumen inyectado 20 μ L, con flujo de 0.5 mL/min en un gradiente de agua-metanol.

12.2 Análisis estadístico

Tabla 5. Procedimiento de análisis de varianza para las fuentes de variación en muestras empacadas con película permeable al oxígeno y que fueron significativas en el análisis discriminante.

Variable respuesta	Modelo			Fuente de variación	CM	F	p>F
	R ²	F	p>F				
DPPH (μM Trolox/100g de carne)	0.222	7.070	<0.0001	Tratamiento	17.57	1.87	0.056
				Día	213.02	22.66	<0.0001
				Tratamiento-día	28.815	3.157	<0.0001
FRAP (μM Trolox/100g de carne)	0.169	14.718	<0.0001	Tratamiento	3.12	1.017	0.038
				Día	49.49	16.95	<0.0001
				Tratamiento-día	5.697	1.873	0.002
Catalasa (CAT) (U/g de carne)	0.268	9.050	<0.0001	Tratamiento	392.18	3.48	<0.0001
				Día	29550.33	25.76	<0.0001
				Tratamiento-día	4755.367	4.589	<0.0001
Glutación Peroxidasa (GPX) (U/g de carne)	0.252	8.355	<0.0001	Tratamiento	23.345	4.717	<0.0001
				Día	95.374	19.270	<0.0001
				Tratamiento-día	23.329	4.644	<0.0001
Oxidación Lipídica (TBARS) (mg de MDA/Kg de carne)	0.355	13.63	<0.0001	Tratamiento	0.148	0.576	0.817
				Día	13.545	52.799	<0.0001
				Tratamiento-día	1.159	4.297	<0.0001
Diferencia de color (ΔE)	0.067	1.778	0.051	Tratamiento	0.003	0.995	0.044
				Día	0.014	4.128	0.007
				Tratamiento-día	0.005	1.541	0.026

Tabla 6. Procedimiento de análisis de varianza para las fuentes de variación en muestras empacadas con película permeable al oxígeno y que no fueron significativas en el análisis discriminante.

Variable respuesta	Modelo			Fuente de variación	CM	F	p>F
	R ²	F	p>F				
Superóxido dismutasa(SOD) (U/g de carne)	0.748	73.448	<0.0001	Tratamiento	2356.37	1.046	0.403
				Día	654480.22	290.652	<0.0001
				Tratamiento-día	52704.33	23.798	<0.0001
Aminas Biogénicas (Cadaverina, ppm)	0.742	6.215	<0.0001	Tratamiento	78042.21	0.901	0.539
				Día	1919439.50	22.157	<0.0001
				Tratamiento-día	234597.49	7.131	0.0290
Aminas Biogénicas (Putrescina, ppm)	0.653	4.080	0.001	Tratamiento	11786.95	0.864	0.568
				Día	187380.71	13.730	<0.0001
				Tratamiento-día	250138	33.878	0.035
Oxidación proteica (Intensidad de fluorescencia)	0.562	6.306	<0.0001	Tratamiento	26295704.84	0.605	0.788
				Día	10176089.74	23.408	<0.0001
				Tratamiento-día	1125146.93	2.352	0.007
Oxidación proteica (nM hidrazinas/mg de proteína)	0.175	1.044	0.423	Tratamiento	0.234	0.812	0.607
				Día	0.503	1.741	0.016
				Tratamiento-día	0.269	0.855	<0.0001
pH	0.027	0.0698	0.753	Tratamiento	0.073	0.516	0.863
				Día	0.177	1.247	0.293
				Tratamiento-día	0.059	0.389	1.000

Efecto de la suplementación de dietas con vitamina D₃ y 25-hidroxicoalciferol en la estabilidad oxidante de la carne de cerdo.

Tabla 7. Comparación de medias de los tratamientos obtenidos por la prueba de Duncan ($P<0.05$) en muestras empacadas con película permeable al oxígeno y que fueron significativas en el análisis discriminante.

Tratamiento	DPPH (μM Trolox/100g de carne)	FRAP (μM Trolox/100g de carne)	CAT (U/g de carne)	GPX (U/100g de carne)	Oxidación lipídica (mg MDA/Kg)	Diferencia de color (ΔE)
1	21.104±2.69 ^a	2.781±0.59 ^a	145.69±6.81 ^a	4.992±0.78 ^{abc}	1.017±0.44 ^a	5.228±0.33 ^{ab}
2	19.610±2.25 ^{ab}	2.676±0.38 ^a	131.753±3.43 ^{abc}	3.242±0.83 ^e	1.077±0.45 ^a	5.922±0.62 ^{ab}
3	19.180±1.75 ^b	2.760±0.14 ^a	118.360±5.85 ^{cd}	4.208±1.38 ^{cde}	0.997±0.13 ^a	5.354±0.55 ^{ab}
4	18.549±0.62 ^b	1.722±0.34 ^b	127.17±6.3 ^{abcd}	5.407±1.14 ^{abc}	1.009±0.40 ^a	5.479±0.42 ^{ab}
5	19.208±2.43 ^b	2.533±0.30 ^a	123.49±5.44 ^{bcd}	4.252±0.69 ^{cde}	1.015±0.19 ^a	5.968±0.35 ^{ab}
6	19.587±1.76 ^{ab}	2.156±0.12 ^a	111.781±14.66 ^d	5.597±1.68 ^{ab}	0.854±0.35 ^a	4.571±0.52 ^b
7	19.066±2.60 ^b	2.327±0.15 ^a	125.006±8.55 ^{bcd}	4.487±2.26 ^{bcd}	0.939±0.72 ^a	6.287±0.55 ^a
8	19.383±1.00 ^b	2.125±0.10 ^a	143.329±4.97 ^a	3.761±1.42 ^{de}	0.916±0.41 ^a	4.594±0.48 ^b
9	18.411±2.32 ^b	2.414±0.08 ^a	117.931±5.43 ^{cd}	5.448±1.21 ^{ab}	0.929±0.40 ^a	4.721±0.45 ^b
10	18.884±1.69 ^b	2.461±0.06 ^a	136.287±3.14 ^{ab}	5.737±1.01 ^a	0.898±0.60 ^a	4.881±0.46 ^{ab}

a,b,c,d,...superíndices diferentes dentro de columnas son significativamente diferentes entre sí ($p\leq 0.05$).

Tabla 8. Comparación de medias de los tratamientos obtenidos por la prueba de Duncan ($P<0.05$) en muestras empacadas con película permeable al oxígeno y que no fueron significativas en el análisis discriminante.

Tratamiento	Aminas biogénicas, Cadaverina (ppm)	Aminas biogénicas, Putrescina (ppm)	Carbonilos Totales (nM Hidrazinas/mg proteína)	Intensidad de Fluorescencia (Unidades Arbitrarias)	SOD (U/g de carne)	Ph
1	382.805±74.23 ^{ab}	314.96±10.59 ^a	0.595±0.03 ^a	5829.15±2124 ^a	835.265±16.23 ^a	5.453±0.25 ^a
2	249.339±75.25 ^{ab}	98.325±9.38 ^{bc}	0.0763±0.002 ^a	6693.20±1145 ^a	855.21±15.62 ^a	5.450±0.20 ^a
3	220.075±89.23 ^{ab}	151.55±23.34 ^{bc}	0.065±0.02 ^a	7876.94±1452 ^a	844.54±32.38 ^a	5.497±0.26 ^a
4	176.585±72.62 ^{ab}	64.598±13.35 ^{bc}	0.055±0.002 ^a	4899.12±1245 ^a	837.34±16.63 ^a	5.319±0.32 ^a
5	124.714±55.43 ^{ab}	71.36±10.30 ^{bc}	0.029±0.01 ^a	7306.59±2154 ^a	840.69±14.22 ^a	5.498±0.51 ^a
6	568.782±110.10 ^a	315.88±78.52 ^a	0.034±0.0015 ^a	5865.49±2365 ^a	829.58±18.13 ^a	5.451±0.50 ^a
7	262.29±42.12 ^{ab}	118.58±15.15 ^b	0.046±0.01 ^a	6330.69±2226 ^a	851.94±16.19 ^a	5.448±0.19 ^a
8	221.10±80.00 ^{ab}	103.96±12.11 ^b	0.0505±0.012 ^a	7926.51±1542 ^a	830.69±20.04 ^a	5.421±0.21 ^a
9	64.12±12.32 ^c	46.982±24.12 ^d	0.0385±0.011 ^a	7851.83±1821 ^a	845.58±11.83 ^a	5.453±0.61 ^a
10	235.094±102.69 ^{ab}	97.204±0.06 ^b	0.0703±0.04 ^a	7459.26±1013 ^a	847.674±9.81 ^a	5.504±0.84 ^a

a,b,c,d,...superíndices diferentes dentro de columnas son significativamente diferentes entre sí ($p\leq 0.05$).

Tabla 9. Procedimiento de análisis de varianza para las fuentes de variación en muestras empacadas al vacío y que fueron significativas en el discriminante.

Variable respuesta	Modelo			Fuente de variación	CM	F	p>F
	R ²	F	p>F				
DPPH (μM Trolox/100g de carne)	0.411	4.822	<0.0001	Tratamiento	6.65	0.499	0.045
				Día	702.045	52.623	<0.0001
				Tratamiento-día	0.396	0.592	<0.0001
Catalasa (CAT) (U/g de carne)	0.433	5.488	<0.0001	Tratamiento	6717.81	8.779	<0.0001
				Día	10144.20	13.256	<0.0001
				Tratamiento-día	2909.88	3.80	<0.0001
Glutatión Peroxidasa (GPX) (U/g de carne)	0.372	4.084	<0.0001	Tratamiento	50.398	7.044	<0.0001
				Día	142.889	19.889	<0.0001
				Tratamiento-día	21.340	15.585	<0.0001
Oxidación Lipídica (TBARS) (mg de MDA/Kg de carne)	0.367	3.99	<0.0001	Tratamiento	0.108	0.816	0.602
				Día	6.487	41.51	<0.0001
				Tratamiento-día	0.083	0.026	<0.0001
Diferencia de color (ΔE)	0.146	1.178	0.0204	Tratamiento	2.772	0.823	0.046
				Día	16.234	4.818	0.001
				Tratamiento-día	0.407	0.863	<0.0001
Oxidación proteica (nM hidrazinas/mg de proteína)	0.848	4.874	<0.0001	Tratamiento	0.004	3.179	0.695
				Día	0.036	31.121	<0.0001
				Tratamiento-día	0.003	2.236	0.007

Tabla 10. Procedimiento de análisis de varianza para las fuentes de variación en muestras empacadas al vacío y que no fueron significativas en el análisis discriminante.

Variable respuesta	Modelo			Fuente de variación	CM	F	p>F
	R ²	F	p>F				
FRAP (μM Trolox/100g de carne)	0.263	2.456	<0.0001	Tratamiento	1.948	0.869	0.033
				Día	51.576	23.020	<0.0001
				Tratamiento-día	0.774	0.568	<0.0001
Superóxido dismutasa(SOD) (U/g de carne)	0.847	38.088	<0.0001	Tratamiento	3560.60	1.991	0.040
				Día	796427.83	445.27	<0.0001
				Tratamiento-día	3321.51	1.85	0.003
Aminas Biogénicas (Cadaverina, ppm)	0.999	49.996	0.112	Tratamiento	313903.49	42.509	0.119
				Día	1524185.79	206.406	0.050
				Tratamiento-día	250138	33.878	0.035
Aminas Biogénicas (Putrescina, ppm)	0.999	30.215	0.143	Tratamiento	5788.61	36.699	0.128
				Día	13117.23	83.162	0.048
				Tratamiento-día	3395.466	21.527	0.019
Oxidación proteica (nM hidrazinas/mg de proteína)	0.848	4.874	<0.0001	Tratamiento	0.004	3.179	0.695
				Día	0.036	31.121	<0.0001
				Tratamiento-día	0.003	2.236	0.007
pH	0.019	0.556	0.888	Tratamiento	0.090	0.705	0.704
				Día	0.009	0.073	0.990
				Tratamiento-día	0.019	0.148	1.000

Efecto de la suplementación de dietas con vitamina D₃ y 25-hidroxicoalciferol en la estabilidad oxidante de la carne de cerdo.

Tabla 11. Comparación de medias de los tratamientos obtenidos por la prueba de Duncan ($P<0.05$) en muestras empacadas al vacío y que fueron significativas en el análisis discriminante.

Tratamiento	DPPH (μM Trolox/100g)	Carbonilos Totales (nM hidrazinas/mg proteína)	Catalasa (U/g)	GPX (U/100g)	Oxidación lipídica (mg MDA/Kg)	Diferencia de color (ΔE)
1	26.215 \pm 2.36 ^a	0.029 \pm 0.009 ^{bc}	149.56 \pm 4.04 ^a	10.61 \pm 0.47 ^a	0.029 \pm 0.008 ^a	5.388 \pm 0.88 ^a
2	23.22 \pm 1.14 ^{ab}	0.037 \pm 0.012 ^{bc}	120.78 \pm 0.82 ^a	4.268 \pm 0.1 ^{cd}	0.0289 \pm 0.009 ^a	5.362 \pm 1.35 ^a
3	20.875 \pm 0.47 ^{ab}	0.033 \pm 0.011 ^{bc}	149.174 \pm 3.34 ^a	2.344 \pm 0.70 ^d	0.033 \pm 0.004 ^a	4.844 \pm 1.72 ^a
4	17.058 \pm 1.37 ^b	0.069 \pm 0.025 ^{ab}	136.67 \pm 3.47 ^a	3.651 \pm 1.39 ^{cd}	0.026 \pm 0.003 ^a	3.477 \pm 1.79 ^b
5	19.857 \pm 0.34 ^b	0.026 \pm 0.01 ^c	147.571 \pm 1.40 ^a	6.155 \pm 1.04 ^{bcd}	0.0254 \pm 0.009 ^a	4.544 \pm 0.77 ^{ab}
6	23.82 \pm 0.42 ^{ab}	0.021 \pm 0.011 ^b	139.688 \pm 7.87 ^a	4.140 \pm 0.93 ^{cd}	0.024 \pm 0.005 ^a	4.391 \pm 1.1 ^{ab}
7	21.606 \pm 0.53 ^{ab}	0.073 \pm 0.015 ^a	111.903 \pm 3.18 ^b	3.412 \pm 0.82 ^{cd}	0.067 \pm 0.002 ^a	5.077 \pm 1.75 ^a
8	21.358 \pm 0.97 ^{ab}	0.062 \pm 0.013 ^{ab}	128.758 \pm 2.24 ^a	6.131 \pm 1.29 ^{bcd}	0.061 \pm 0.003 ^a	4.296 \pm 0.87 ^{ab}
9	21.730 \pm 0.91 ^{ab}	0.071 \pm 0.007 ^a	142.400 \pm 2.69 ^a	6.506 \pm 0.36 ^{bc}	0.070 \pm 0.005 ^a	4.520 \pm 0.83 ^{ab}
10	26.272 \pm 0.74 ^a	0.035 \pm 0.016 ^{bc}	120.262 \pm 5.89 ^a	7.885 \pm 0.80 ^b	0.035 \pm 0.006 ^a	4.863 \pm 1.37 ^a

a,b,c,d, ...superíndices diferentes dentro de columnas son significativamente diferentes entre sí ($p\leq 0.05$).

Tabla 12. Comparación de medias de los tratamientos obtenidos por la prueba de Duncan ($P<0.05$) en muestras empacadas al vacío y que no fueron significativas en el análisis discriminante.

Tratamiento	FRAP (μM Trolox/100 g de carne)	SOD (U/g)	Aminas biogénicas, Putrescina (ppm)	Aminas biogénicas, Cadaverina (ppm)	Intensidad de Fluorescencia (Unidades Arbitrarias)	pH
1	1.17 \pm 0.84 ^b	868.54 \pm 114.3 ^b	24.74 \pm 12.2 ^b	42.53 \pm 12.2 ^b	5829.15 \pm 1023.3 ^a	5.396 \pm 0.5 ^{ab}
2	2.928 \pm 0.50 ^a	879.59 \pm 101.4 ^{ab}	31.18 \pm 10.3 ^b	48.25 \pm 10.3 ^b	7873.72 \pm 1125.6 ^a	5.439 \pm 0.8 ^{aab}
3	2.37 \pm 0.11 ^a	896.29 \pm 103.8 ^a	26.676 \pm 10.4 ^b	52.85 \pm 10.4 ^b	7546.59 \pm 859.6 ^a	5.411 \pm 0.8 ^{ab}
4	1.88 \pm 0.45 ^b	892.70 \pm 100.3 ^a	143.313 \pm 10.3 ^a	939.28 \pm 110.3 ^a	6021.47 \pm 123.4 ^a	5.236 \pm 0.8 ^b
5	2.27 \pm 0.31 ^a	885.66 \pm 103.5 ^{ab}	33.140 \pm 10.3 ^b	57.81 \pm 10.3 ^b	7680.29 \pm 1362.4 ^a	5.461 \pm 0.6 ^a
6	2.26 \pm 0.11 ^a	887.190 \pm 110.2 ^{ab}	32.032 \pm 8.3 ^b	28.78 \pm 8.3 ^b	5414.35 \pm 874.5 ^a	5.394 \pm 0.5 ^{ab}
7	2.29 \pm 0.15 ^a	901.15 \pm 108.5 ^a	109.181 \pm 9.2 ^a	584.743 \pm 90.2 ^{ab}	6663.60 \pm 2105.6 ^a	5.387 \pm 0.5 ^{ab}
8	2.02 \pm 0.13 ^a	883.80 \pm 103.9 ^{ab}	34.717 \pm 80.3 ^b	213.42 \pm 80.3 ^{ab}	7926.37 \pm 1587.5 ^a	5.416 \pm 0.7 ^{ab}
9	2.12 \pm 0.07 ^a	886.052 \pm 96.1 ^{ab}	41.456 \pm 85.4 ^b	196.94 \pm 85.4 ^{ab}	7851.83 \pm 1698.5 ^a	5.400 \pm 0.4 ^{ab}
10	2.19 \pm 0.06 ^a	896.30 \pm 106.8 ^a	49.393 \pm 102.3 ^b	411.89 \pm 102.4 ^{ab}	7588.58 \pm 1325.5 ^a	5.439 \pm 0.8 ^{ab}

a,b,c,d, ...superíndices diferentes dentro de columnas son significativamente diferentes entre sí ($p\leq 0.05$).

Tabla 13. Prueba de Lambda de Wilks en muestras empacadas con película permeable

Lambda	0,070
F (Valor observado)	1,867
F (Valor crítico)	1,183
GDL1	216
GDL2	1094
p-valor	< 0.0001
alfa	0,05

Tabla 14. Matriz de confusión para los resultados de validación cruzada para muestras empacadas con película permeable:

de \ a	1	10	2	3	4	5	6	7	8	9	Total	% correcto
1	6	2	1	2	3	0	0	0	1	1	16	37,50%
10	1	8	0	0	0	2	1	1	1	2	16	50,00%
2	5	0	3	4	0	0	0	0	4	0	16	18,75%
3	4	0	2	2	1	1	1	2	2	1	16	12,50%
4	4	1	0	1	1	1	2	0	5	1	16	6,25%
5	3	1	0	0	1	2	2	1	1	5	16	12,50%
6	0	2	0	2	0	4	5	1	0	2	16	31,25%
7	0	4	0	2	1	2	1	1	3	2	16	6,25%
8	2	0	4	2	2	1	0	3	1	1	16	6,25%
9	0	4	0	0	0	4	1	2	1	4	16	25,00%
Total	25	22	10	15	9	17	13	11	19	19	160	20,63%

Tabla 15. Prueba de Lambda de Wilks en muestras empacadas al vacío:

Lambda	0,160
F (Valor observado)	1,606
F (Valor crítico)	1,178
GDL1	216
GDL2	1433
p-valor	< 0.0001
Alfa	0,05

Tabla 16. Matriz de confusión para los resultados de validación cruzada para muestras empacadas al vacío:

de \ a	1	10	2	3	4	5	6	7	8	9	Total	% correcto
1	10	1	1	1	0	1	1	1	3	1	20	50,00%
10	1	0	2	0	1	2	6	3	1	4	20	0,00%
2	1	3	6	5	2	1	0	0	2	0	20	30,00%
3	1	0	4	5	5	2	0	2	1	0	20	25,00%
4	0	1	0	7	2	0	0	4	4	2	20	10,00%
5	3	2	1	0	0	7	1	1	1	4	20	35,00%
6	3	0	1	0	2	3	5	4	2	0	20	25,00%
7	0	2	1	4	1	1	2	0	7	2	20	0,00%
8	1	1	0	0	1	2	4	5	4	2	20	20,00%
9	1	4	1	0	2	5	1	2	4	0	20	0,00%
Total	21	14	17	22	16	24	20	22	29	15	200	19,50%



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00120

Matrícula: 2121800120

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION DE DIETAS CON VITAMINA D3 Y 25-HIDROXICOLECALCIFEROL EN LA ESTABILIDAD OXIDANTE DE LA CARNE DE CERDO

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 2 del mes de abril del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA
MTRO. LUIS HUMBERTO LOPEZ HERNANDEZ
DRA. YENIZEY MERIT ALVAREZ CISNEROS

siendo los dos primeros asesores de la alumna y lectora la tercera, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: ISABEL HERNANDEZ HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:



ISABEL HERNANDEZ HERNANDEZ
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

A probar

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

ASESORA

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

ASESOR

MTRO. LUIS HUMBERTO LOPEZ HERNANDEZ

LECTORA

DRA. YENIZEY MERIT ALVAREZ CISNEROS