

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**Efecto de la oleorresina de *Capsicum chinense*
“ají panca” sobre el desarrollo microbiano en carne de
res empacada al vacío y almacenada en refrigeración**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencia de los
Alimentos

AUTOR

Eduardo Alexander SALAZAR SÁNCHEZ

ASESOR

María Elena SALAZAR SALVATIERRA

Lima – Perú

2017

*Ésta es para Jackie, mi ejemplo de
fortaleza y sacrificio. Sin tu apoyo no
hubiera avanzado hasta aquí...*

¡Gracias hermanita!

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. María Elena Salazar, muchas gracias por su paciencia, tiempo, aportes y consejos durante la ejecución de esta tesis.

A la Dra. Daphne Ramos, nuevamente gracias por la confianza depositada y por su valiosa ayuda en esta etapa de mi carrera. Siempre estaré en deuda con Usted.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Situación problemática	1
1.2. Formulación del problema	2
1.3. Justificación teórica	2
1.4. Justificación práctica	3
1.5. Objetivos	3
1.5.1. Objetivo general	3
1.5.2. Objetivos específicos	3
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	4
2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación	4
2.2. Antecedentes de la investigación	4
2.3. Bases teóricas	7
2.3.1. FRUTOS DEL GÉNERO <i>Capsicum</i>	7
2.3.1.1. Taxonomía	7
2.3.2. AJÍ PANCA	7
2.3.2.1. Descripción general	7
2.3.3. OLEORRESINA DE <i>Capsicum</i>	8
2.3.3.1. Generalidades	8
2.3.3.2. Métodos de extracción con solventes orgánicos	10
2.3.3.2.1. Maceración pasiva	10
2.3.3.2.2. Extracción con Soxhlet	11
2.3.3.2.3. Extracción asistida por ultrasonidos	12
2.3.3.2.4. Extracción enzimática	14

2.3.3.2.5. Extracción asistida por microondas	14
2.3.3.2.6. Extracción con fluidos supercríticos	15
2.3.3.3. Compuestos antimicrobianos en oleoresina de <i>Capsicum</i>	17
2.3.3.3.1. Capsaicinoides	17
2.3.3.3.2. Diversos compuestos fenólicos	19
2.3.4. CARNE	21
2.3.4.1. Generalidades	21
2.3.4.2. Conversión del músculo a carne	21
2.3.4.2.1. Fase pre rigor	22
2.3.4.2.2. Fase de <i>rigor mortis</i>	23
2.3.4.2.3. Fase post rigor	24
2.3.5. MICROBIOLOGIA DE LA CARNE	24
2.3.5.1. Generalidades	24
2.3.5.2. Factores que incluyen en la vida útil de la carne	25
2.3.5.3. Principales géneros microbianos en carne	27
2.3.5.3.1. Actividad microbiana de la carne en condiciones de aerobiosis	28
2.3.5.3.2. Actividad microbiana de la carne en condiciones de anaerobiosis	30
2.3.6. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE LA CARNE FRESCA	32
2.3.6.1. Refrigeración	33
2.3.6.2. Congelación	34
2.3.6.3. Irradiación	36
2.3.6.4. Empacado	37

2.3.6.4.1. Empacado al vacío	38
2.3.6.4.2. Empacado en atmosferas modificadas	39
2.3.6.4.3. Empaques activos e inteligentes	40
2.3.6.5. Uso de conservantes	45
CAPITULO 3: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	48
3.1. Proceso de obtención de oleorresina de Ají Panca	48
3.2. Estudio de las curvas de crecimiento microbiano en carne	51
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
4.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados	54
4.1.1. Características de la oleorresina de Ají Panca	54
4.1.2. Efecto de la oleorresina sobre la microbiota de la carne	55
4.1.3. Interacción entre bacterias ácido lácticas y <i>Brochothrix thermosphacta</i>	56
4.1.4. Efecto de la oleorresina sobre el pH de la carne	57
4.1.5. Vida útil del producto	59
4.2. Pruebas de hipótesis	60
4.3. Presentación de resultados	60
4.3.1. Características de la oleorresina de Ají Panca	60
4.3.2. Efecto sobre el desarrollo de aerobios mesófilos totales	61
4.3.3. Efecto sobre el desarrollo de aerobios psicrótrofos totales	63
4.3.4. Efecto sobre el desarrollo de bacterias ácido lácticas	64
4.3.5. Efecto sobre el desarrollo de <i>Brochothrix thermosphacta</i>	66
4.3.6. Interacción entre bacterias ácido lácticas y <i>Brochothrix</i> . <i>Thermosphacta</i>	68
4.3.7. Efecto sobre el pH de la carne	70

CONCLUSIONES	73
RECOMENDACIONES	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	88

LISTA DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1	Ventajas y desventajas de la maceración pasiva	11
Cuadro 2	Ventajas y desventajas del método de extracción Soxhlet	12
Cuadro 3	Contenido de capsaicinoides en extractos de <i>Capsicum</i>	18
Cuadro 4	Contenido de compuestos fenólicos totales en extractos de <i>Capsicum</i>	20
Cuadro 5	Compuestos fenólicos presentes en cultivares de <i>Capsicum annuum</i>	21
Cuadro 6	Defectos comunes en productos cárnicos y bacterias causantes	28
Cuadro 7	Condiciones óptimas para el almacenamiento de la carne refrigerada	34
Cuadro 8	Tiempo recomendado para el almacenamiento en congelación	35
Cuadro 9	Mezcla de gases utilizadas en el empaquetado con atmósferas modificadas para carnes y productos cárnicos	39
Cuadro 10	Compuestos activos naturales incorporados directamente a polímeros	44
Cuadro 11	Características de la oleoresina de Ají Panca	61
Cuadro 12	Recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/g)	61

Cuadro 13	Recuento de aerobios psicrótrofos totales (UFC/g)	63
Cuadro 14	Recuento de bacterias ácido lácticas (UFC/g)	65
Cuadro 15	Recuento de <i>Brochothrix thermosphacta</i> (UFC/g)	67
Cuadro 16	Valores de pH durante el almacenamiento	71

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Ají Panca	8
Figura 2	Oleoresina de <i>Capsicum</i>	9
Figura 3	Esquema de los cambios <i>post mortem</i> en las concentraciones de ATP, creatina fosfato, pH y rigor en función del tiempo	24
Figura 4	Estructura de un empaque activo con secuestradores de O ₂	41
Figura 5	Estructura de un empaque activo multicapa con antimicrobianos	43
Figura 6	Ajíes panca utilizados para el estudio	48
Figura 7	Evaporación y recuperación del solvente con rotavapor	49
Figura 8	Macerado concentrado en estufa a 40 °C	50
Figura 9	Muestra de oleoresina obtenida	50
Figura 10	Empacado al vacío de las muestras de carne	52
Figura 11	Curvas de desarrollo de aerobios mesófilos totales (log UFC/g)	62
Figura 12	Curvas de desarrollo de aerobios psicrótrofos totales (log UFC/g)	64
Figura 13	Curvas de desarrollo de bacterias ácido lácticas (log UFC/g)	66

Figura 14	Curvas de desarrollo de <i>Brochothrix thermosphacta</i> (log UFC/g)	68
Figura 15	Interacción entre bacterias ácido lácticas y <i>Brochothrix thermosphacta</i> en G1	69
Figura 16	Interacción entre bacterias ácido lácticas y <i>Brochothrix thermosphacta</i> en G2	70
Figura 17	Valores de pH cárnico durante el almacenamiento	71

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Determinación del contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina	103

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
AMT	Aerobios mesófilos totales
AOAC	Association Of Official Analytical Chemists
AST	Aerobios psicrótrofos totales
ATP	Adenosín Trifosfato
BAL	Bacterias ácido lácticas
h	hora
ISO	International Organization For Standardization
min	Minuto
NTP	Norma Técnica Peruana
NTS	Norma Técnica Sanitaria
pH	Potencial de Hidrógeno
UFC	Unidad Formadora de Colonia

RESUMEN

Los ajíes y pimientos son ampliamente consumidos en nuestro país y la actividad antimicrobiana de sus extractos se ha demostrado en diversas investigaciones *in vitro*. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de oleorresina de Ají Panca (*Capsicum chinense*) sobre el desarrollo microbiano en carne de vacuno empacada al vacío y almacenada en refrigeración, como una propuesta para la extensión de la vida útil de este producto. La oleorresina se obtuvo mediante extracción con etanol de grado alimentario y se cuantificó el contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina mediante HPLC-DAD. Se prepararon muestras de carne de vacuno de 50 g y se separaron en 2 grupos: G1, con aplicación de 2.5 mL de oleorresina a cada corte, y G2, como control. Luego, ambos grupos de muestras se empacaron al vacío y se almacenaron a 0 -4 °C por 90 días. En los días 0, 1, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 se midió el pH y se obtuvieron recuentos de aerobios mesófilos totales, aerobios psicrótrofos totales, bacterias ácido lácticas y *Brochothrix thermosphacta* a partir de ambos grupos. Además, se elaboraron las respectivas curvas de pH y de desarrollo microbiano para establecer la vida útil del producto. La oleorresina tuvo 1.39 mg de capsaicina y 0.54 mg de dihidrocapsaicina por gramo. En base a las curvas de pH y de recuentos microbianos, la vida útil de G1 fue de 70 días, mientras que en G2 fue 56. La aplicación de oleorresinas en productos cárnicos puede ser una alternativa para prolongar la vida útil de la carne.

Palabras clave: Ají panca, *Capsicum chinense*, oleorresina, carne de res, bacterias ácido lácticas, *Brochothrix thermosphacta*, vida útil

ABSTRACT

Chili peppers are widely consumed in our country and the antimicrobial activity of their extracts has been demonstrated on several *in vitro* investigations. The objective of this study was to evaluate the effect of the application of Aji Panca (*Capsicum chinense*) oleoresin on microbial growth of refrigerated vacuum packed bovine meat, as a proposal to extend the shelf life of this product. Oleoresin was obtained by extraction with food grade ethanol, and the contents of capsaicin and dihydrocapsaicin were measured by HPLC-DAD. Meat samples of 50 g were prepared and separated in two groups: G1, with application of 2.5 mL of oleoresin on each sample, and G2, as a control group. Then, both groups of samples were vacuum packed and stored at 0 – 4 °C for 90 days. On days 0, 1, 15, 30, 45, 60, 75 y 90, pH was measured, and counts for total mesophilic aerobes, total psychrotrophs aerobes, lactic acid bacteria, and *Brochothrix thermosphacta* were determined for both groups. Also, curves for pH and microbial growth were elaborated in order to establish the shelf life of the product. Our oleoresin contained 1.39 mg of capsaicin and 0.54 mg of dihydrocapsaicin per gram. Based on the pH and microbial counts curves, shelf life of the product was 70 days for G1, and 56 days for G2. Oleoresin application on meat products can become an alternative to extend meat shelf life.

Key words: Aji Panca, *Capsicum chinense*, oleoresin, bovine meat, lactic acid bacteria, *Brochothrix thermosphacta*, shelf life

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

La carne es un alimento de alto valor biológico debido a su contenido de nutrientes como sustancias nitrogenadas, lípidos, glucógeno, vitaminas, minerales y otros factores de crecimiento. Además, posee elevada actividad de agua (A_w) y pH ligeramente ácido con tendencia al neutro. En conjunto, estas condiciones favorecen la alteración debido al desarrollo de diversos microorganismos provenientes del medio ambiente y de la manipulación. Por ello, la industria alimentaria recurre a alternativas para retrasar el deterioro por acción microbiana y prolongar la aceptabilidad de este alimento.

Algunos de los métodos de conservación más comunes hoy en día son el empacado al vacío y la refrigeración, con los cuales se inhibe el desarrollo de diversos géneros responsables del deterioro de la carne, entre ellos, *Pseudomonas spp.* Sin embargo, ciertos microorganismos son capaces de desarrollarse a baja temperatura y con poca disponibilidad de oxígeno, como las bacterias ácido lácticas (BAL) y *Brochothrix thermosphacta*, asociados con la formación de limo, coloración y olores desagradables en la carne.

Otra práctica común es el uso de conservantes químicos sobre la carne fresca, como benzoatos, sulfitos, nitritos y nitratos, con el fin de mantener la calidad sensorial y microbiológica del producto, pero según la Organización Mundial de la Salud (OMS), estos productos son cancerígenos. Es así que crece la tendencia al reemplazo de estos agentes por alternativas inocuas, como ácidos orgánicos y aceites esenciales de origen vegetal, lo que hace importante la búsqueda de nuevas alternativas aprovechando los recursos naturales de nuestro país.

1.2. Formulación del problema

¿Cuál es el efecto de la oleoresina de Ají Panca sobre el desarrollo microbiano en carne de vacuno empacada al vacío y almacenada en refrigeración?

1.3. Justificación teórica

En la actualidad, es creciente la tendencia a reemplazar los productos químicos tradicionales usados en la industria alimentaria como conservantes de alimentos; esto se debe a que poseen efecto cancerígeno a largo plazo cuando su ingestión es frecuente. En su lugar, se establece entre los consumidores la preferencia por alternativas de origen natural que ejerzan el mismo efecto sobre el alimento y que sean inocuos.

Por ello, es importante la investigación de nuevas alternativas de origen natural, como las que se obtienen de vegetales cuyo uso está ampliamente difundido en nuestra cultura. Nuestro país produce y exporta miles de toneladas de ajíes y pimientos; sin embargo, estos son aprovechados principalmente como condimentos e ingredientes en la gastronomía. Asimismo, son escasas las investigaciones enfocadas en aprovechar el potencial antimicrobiano de estos frutos con el fin de preservar la calidad microbiológica de alimentos rápidamente deteriorables, como la carne y productos cárnicos.

1.4. Justificación práctica

La elaboración de oleoresina por maceración y concentración posterior es un procedimiento sencillo y hay diversas investigaciones que han determinado los parámetros para obtener un producto con características

antimicrobianas adecuadas. Además, la aplicación de este producto como paso previo al empacado al vacío es un procedimiento simple y rápido que podría mejorar la calidad microbiológica del producto durante el almacenamiento.

Asimismo, la determinación de las poblaciones microbianas se realiza mediante técnicas de recuento documentadas y ampliamente utilizadas en análisis de alimentos e investigaciones a nivel mundial. Dichas técnicas son de fácil realización e interpretación y aportan resultados confiables.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto de la oleorresina de *Capsicum chinense* (Ají Panca) sobre el desarrollo microbiano en carne de vacuno empacada al vacío y almacenada en refrigeración.

1.5.2. Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de la oleorresina de *Capsicum chinense* (Ají Panca) sobre el desarrollo de aerobios mesófilos totales (AMT), aerobios psicrótrofos totales (AST), BAL, y *B. thermosphacta* en carne de vacuno empacada al vacío y almacenada en refrigeración.
- Evaluar el efecto de la oleorresina de *Capsicum chinense* (Ají Panca) sobre el pH de la carne de vacuno empacada al vacío y almacenada en refrigeración.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación

La presente investigación es de tipo experimental; su propósito es introducir una variable independiente y evaluar los efectos que ésta ejerce sobre la variable dependiente. En otras palabras, la investigación trata de probar una relación causal (Ávila, 2006, p. 60). Esto se realiza mediante una prueba T para dos muestras.

Todo experimento es una prueba o ensayo donde se manipulan deliberadamente una o más variables independientes y se registran los cambios en la variable dependiente, todo dentro de un contexto controlado por el investigador (Montgomery, 1993, citado por Ávila, 2006, p. 60).

Además de la aplicación del experimento, el presente estudio también utiliza un control. Esto significa que si se detecta la influencia de la variable independiente sobre la variable dependiente, su modificación no se atribuye a variables extrañas o factores ajenos sino a la manipulación de la variable independiente (Ávila, 2006, p. 70).

2.2. Antecedentes de la investigación

Diversas investigaciones *in vitro* indican que los extractos de ajíes y pimientos poseen actividad antimicrobiana frente a bacterias de interés en inocuidad alimentaria, como *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* (Pistivsek,

2005, citado por Gutiérrez, 2014, p. 16). Colivet, Beloso y Hurtado (2006) señalan que con extractos etanólicos de ají verde dulce (*C. chinense*) al 25% ya hay inhibición de *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* (p. 168). También se ha demostrado que los extractos acuosos de *C. frutescens* poseen actividad antifúngica sobre *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y *Rhizopus sp.* cuando se aplican a concentraciones de 1.25 a 10 mg/mL (Soumya y Nair, 2012, p. 739). Asimismo, estudios realizados por Shayan y Saeidi (2013) demuestran que los extractos etanólicos de *C. annuum* L. impiden la formación de biofilms por *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, cuando se utilizan concentraciones de 5 a 10 mg/mL (p. 153). En nuestro país, Gutiérrez (2014) determinó para el extracto etanólico de Ají Panca que las concentraciones de 4.82 y 5.61 mg/mL eran suficientes para inhibir el desarrollo de *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente (p. 68).

También se han evaluado las propiedades de los frutos de *Capsicum* con el fin de mejorar la calidad microbiológica de algunos alimentos. Por ejemplo, en semillas de maní con aplicación de extracto acuoso de *C. frutescens* a concentración de 10 mg/mL, se ha reportado inhibición de hasta 83.4% en el crecimiento de especies de *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y *Rhizopus sp.*, siendo estos resultados comparables a los obtenidos con la aplicación de fungicidas sintéticos comerciales (Soumya y Nair, 2012, p. 747). En nuestro país, Llenque, Otiniano y Otiniano (2013) encontraron inhibición del desarrollo de *S. aureus* en crema huancaína preparada con concentraciones de 20, 25 y 30% (p/p) de ají escabeche licuado (*C. annuum* var. *longum*) (p. 9).

De modo similar, algunos autores han investigado las propiedades antimicrobianas de los extractos de *Capsicum* aplicados en carnes y productos cárnicos. Por ejemplo, Careaga, Fernández, Dorantes, Mota, Jaramillo y Hernández-Sánchez (2003) estudiaron la actividad del extracto de *C. annuum* aplicado a diferentes concentraciones sobre carne molida inoculada con *S. typhimurium* y *P. aeruginosa*, envasada y almacenada en refrigeración por 7 días. Ellos demostraron que el extracto inhibe el desarrollo de *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* a dosis de 0.3 y 1.5 mL de

extracto/100 g de carne, respectivamente; mientras que con 3 mL/100 g observaron efecto bactericida sobre *S. typhimurium* (p. 331). En nuestro país, Gutiérrez (2014) elaboró chorizos con 31% de Ají Panca en polvo y los inoculó experimentalmente con *E. coli* y *S. aureus*. Se redujeron las poblaciones dichas bacterias en 2.18 log y 2.56 log UFC/g, respectivamente (p. 89). Sin embargo, no hay estudios que evalúen el efecto de los extractos de ajíes y pimientos sobre el desarrollo microbiano de carnes y productos cárnicos durante el almacenamiento prolongado.

Se ha descrito extensamente que la actividad antimicrobiana de los frutos y extractos de *Capsicum* se debe a la presencia de sustancias como capsaicinoides y compuestos fenólicos, los cuales actúan mediante diversos mecanismos que incluyen la alteración de la permeabilidad de la membrana celular y de la síntesis de proteínas. Sin embargo, Sharma, Jain, Nair y Ramachandran (2013) estudiaron el efecto del extracto acuoso del chile rojo (*C. annum*), así como de la capsaicina pura sobre cultivos de la BAL *Lactobacillus acidophilus* incubados a 15, 20, 25, 30 y 37 °C, y demostraron que la población de este microorganismo no se redujo significativamente en ningún caso. En cambio, dichos autores reportaron una mayor producción de L-lactato a expensas de la D-glucosa en todos los tratamientos, fenómeno que atribuyeron al incremento del metabolismo bacteriano (p. 4142).

De aplicarse este último hallazgo en carnes y productos cárnicos, donde es común el desarrollo de BAL, sería posible potenciar el efecto antimicrobiano que naturalmente confieren los metabolitos de estas bacterias. Esto, aunado al efecto antimicrobiano de amplio espectro, propio de la oleoresina, constituiría una nueva estrategia natural para la conservación de carnes empacadas al vacío y refrigeradas.

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Frutos del género *Capsicum*

2.3.3.1. Taxonomía. El género *Capsicum* alberga entre 20 a 30 especies de ajíes y pimientos originarios de las regiones tropicales y subtropicales de América. Se han domesticado 5 especies (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*) de las cuales provienen todas las variedades consumidas por el hombre. Estos frutos son apreciados por su sabor y picor o pungencia, características que los han convertido en los condimentos de mayor uso. Han sido aprovechados por las culturas antiguas y se distribuyeron a nivel mundial tras la llegada de los españoles (León, 2000, p. 334).

La taxonomía de este género es dificultosa debido a que son escasas las características distintivas entre algunas especies. Según León (2000) (p. 334), la clasificación taxonómica es la siguiente:

- Reino: Plantae
- División: Spermatofita
- Clase: Dicotiledoneae
- Orden: Solanales
- Familia: Solanáceas
- Género: *Capsicum*

2.3.2. Ají Panca

2.3.2.1. Descripción general. El Ají Panca (*Capsicum chinense*) (figura 1) es conocido en todas las regiones tropicales y es el segundo ají más popular del Perú, después del ají amarillo (*C. baccatum*). Es originario del hemisferio occidental, aunque Nikolaus von Jacquin, científico que bautizó esta especie en 1776, sostuvo que provenía de China. La planta posee una altura que oscila entre 30 cm a 1.4 m. Sus hojas son de tono verde pálido a

leve, largas y arrugadas, y las flores son blancas con estambres de color púrpura. El fruto mide entre 8 a 12 cm de largo, y entre 2.5 a 3 cm de ancho. Sus semillas miden entre 3 a 5 mm, son redondas, ligeramente reniformes y de color amarillo, y se insertan en una placenta cónica de disposición central. Cuando el fruto está maduro, posee coloración marrón y pungencia leve (Bosland y Votava, 2000, p. 34; DeWitt y Bosland, 2009, p. 25).



Figura 1. Aji Panca. Fuente: <https://ceviche103.wordpress.com/2014/08/29/el-aji-protagonista-de-la-cocina-peruana-contemporanea-de-ceviche-103/>

2.3.3. Oleorresina de *Capsicum*

2.3.3.1. Generalidades. A partir de los frutos de *Capsicum* se elabora una gran variedad de productos destinados al consumo humano, como alimentos congelados, deshidratados, encurtidos, enlatados, salsas, etc. Un derivado de interés es la oleorresina, que consiste en el aceite obtenido tras la extracción con solventes orgánicos y posterior concentración. Es una sustancia de naturaleza oleosa y viscosa, coloración rojiza intensa, aroma característico de la especie procedente, fluida a temperatura ambiente y soluble en aceites (figura 2) (Fernández, 2007, p. 22-23).



Figura 2. Oleorresina de *Capsicum*. Fuente: <http://www.herbospice.com/es/productos/oleorresina>

Su origen data de los años 30, cuando surgió la necesidad de contar con un producto de alta pureza que mantenga las características de los ajíes y pimientos por períodos prolongados. Así, la oleorresina mantiene la uniformidad en aroma y color, es más estable y resistente a la acción microbiana, y facilita el manejo y almacenamiento. Estas cualidades constituyen una ventaja técnica y económica en comparación con las formas tradicionales de exportación. Hoy en día, sus usos son diversos e incluyen la fabricación de jaleas, confituras y mermeladas, que son más apetitosas al incluir oleorresina. También se les emplea en salsas, ensaladas, embutidos, conservas, comidas preparadas y congeladas, margarinas, mantequillas, quesos, diversos postres y bebidas, etc. (Fernández, 2007, p. 22,23; Salamanca & Sánchez, 2009, p. 23).

En cuanto a su composición, Fernández-Trujillo (2008) menciona que la oleorresina: “Presenta principalmente componentes lipofílicos como mono, di y triglicéridos; ácidos grasos libres, pigmentos (carotenos con estructura hidrocarbonada o xantofilas con oxígeno), aceites esenciales, resinas ácidas y sus ésteres, terpenos y productos de oxidación o polimerización de estos terpenos, ceras, esteroides vegetales y en mayor o menor medida capsaicinoides (Contreras-Padilla y Yahia, 1998; Ordóñez *et al.*, 2002; Reilly *et al.*, 2001; Salem y Olajos, 2001; Vesper y Nitz, 1997a). Sus otras vitaminas liposolubles son los tocoferoles con actividad vitamina E, principalmente el α -tocoferol, y en menor medida otros isómeros como β o δ (Daood *et al.*, 2002; Gnayfeed *et al.*, 2001; Viñas *et al.*, 1992)” (p. 253).

2.3.3.2. Métodos de extracción con solventes orgánicos. Las plantas poseen un complejo conjunto de compuestos como lípidos, pigmentos, aceites esenciales y sabores que son aprovechados en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria. Para obtenerlos, se realizan procesos de extracción basados en la diferencia de solubilidad de los componentes de la muestra en polvo, o fase sólida, en presencia de solventes de bajo punto de ebullición, o fase líquida. Cuando ambas fases están en contacto, algunos componentes de la fase sólida se separan y migran hacia el solvente. Este proceso es conocido como lixiviación (Geankoplis, 1999; citado por Velasco *et al.*, 2007, p. 54). Según la técnica de extracción y los componentes deseados, la proporción de la mezcla sólido-líquido variará (Fernández, 2007, p. 48).

Tradicionalmente, la obtención de oleorresinas y sus componentes (capsaicina, dihidrocapsaicina, carotenos y otros pigmentos, etc.) se realiza por maceración pasiva y por extracción con equipo Soxhlet. Sin embargo, estos métodos se llevan a cabo en períodos prolongados y utilizan grandes volúmenes de solvente. Por ello, se han desarrollado nuevas técnicas que mejoran el rendimiento y la calidad del extracto (Velasco *et al.*, 2007, p. 54). En los últimos años, las técnicas que vienen adquiriendo mayor interés son la extracción asistida por ultrasonidos, mediante agitación magnética, por tratamiento enzimático, asistida por microondas, y con fluidos supercríticos (Huie, 2002; p. 23).

2.3.3.2.1. Maceración pasiva. Es un método de extracción de uso común en el laboratorio. Las fases sólida y líquida entran en contacto directo y los componentes afines al solvente quedan disueltos en éste. Posteriormente, se retira el componente sólido no disuelto y la oleorresina se obtiene evaporando y recuperando el solvente mediante el uso de equipos como el rotavapor. (Salamanca y Sánchez, 2009, p. 47). En el cuadro 1 se resumen las ventajas y desventajas de este método de extracción.

Cuadro 1. Ventajas y desventajas de la maceración pasiva

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none"> • Permite la extracción directa de los alimentos en general. • El proceso puede realizarse a temperatura ambiente y sin degradación de compuestos termolábiles. • Se puede realizar con o sin agitación magnética. • Se logra extraer y mantener las propiedades de lo que se macera. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se requiere gran cantidad de solvente. • Es necesaria una etapa de evaporación final.

Fuente: Salamanca y Sanchez, 2009, p. 29.

El porcentaje de rendimiento que se obtiene mediante la maceración pasiva depende de la variedad del fruto y del solvente. Así, Rodríguez *et al.* (2000) obtuvieron oleorresina de 18 variedades de 3 especies de *Capsicum* con rendimientos comprendidos entre 8.95 a 10.85% para *C. annum*, 4.20 a 7.70% para *C. chinense*, y 6.40 a 12.42% para *C. frutescens* (p. 5). En nuestro país, Gutiérrez (2014) elaboró oleorresina de Ají Panca usando como solvente etanol de 96°, con un rendimiento de 4.13% (p. 66).

2.3.3.2.2. Extracción con Soxhlet. El equipo Soxhlet consta de un matraz de ebullición en contacto con una fuente de calor; sobre éste se sitúa una cámara en cuyo interior se encuentra un cartucho de material poroso y, en la parte superior, un condensador. El solvente se coloca en el matraz de ebullición y la muestra en polvo dentro del cartucho de material poroso. Al evaporarse, el solvente se desplaza a través de la cámara y alcanza el condensador en la parte superior del equipo, se condensa y cae sobre el cartucho con la muestra en polvo, lo que da inicio a la extracción. En la parte superior de la cámara del extractor se encuentra un sifón lateral a través del cual la mezcla cae al matraz de ebullición cuando la cámara se llena. Este proceso continúa, permitiendo la concentración de oleorresina en el matraz de ebullición y la recirculación del solvente en el sistema. Posteriormente, la

oleorresina se separa del solvente mediante destilación (Caldas, 2012, p. 20).

El rendimiento de la extracción Soxhlet depende de la variedad de *Capsicum* y de los solventes utilizados. En 2007, Restrepo *et al.* utilizaron n-hexano para obtener oleorresina de ají habanero (*C. chinense*) y tabasco (*C. frutescens*) logrando rendimientos de 5.71 y 8.51%, respectivamente. En el mismo estudio, se empleó acetato de etilo que permitió mayores rendimientos, con 10.16% para el ají habanero y 12.29% para el tabasco (p. 16). Por su parte, Bautista *et al.* (2008) obtuvieron oleorresina de páprika (*C. annuum* L.) con etanol como solvente y reportaron rendimientos entre 2.48 a 2.72% (p. 55-56). Asimismo, Giraldo *et al.* (2009) elaboraron oleorresina de páprika con solventes como éter de petróleo, hexano y acetato de etilo, y obtuvieron rendimientos de 11.93, 12.20 y 16.08%, respectivamente (p. 23). En el cuadro 2, se resumen las ventajas y desventajas de la extracción Soxhlet.

Cuadro 2. Ventajas y desventajas del método de extracción Soxhlet

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none"> • El solvente y la muestra est��n en contacto íntimo y repetido. • Se mejora la extracción debido al uso de un solvente limpio. • El solvente proviene de la condensación y est�� caliente, lo cual favorece la solubilidad del analito. • No requiere filtración posterior. 	<ul style="list-style-type: none"> • No es aplicable a alimentos recubiertos de grasa como los lácteos. • Es un proceso lento e imposible de acelerar. • Requiere grandes volúmenes de solvente. • No es aplicable a analitos termolábiles. • Se requiere una etapa de evaporación final.

Fuente: Salamanca y Sánchez, 2009, p. 29.

2.3.3.2.3. Extracción asistida por ultrasonidos. Esta técnica se basa en el fenómeno de cavitación que consiste en la formación y destrucción de

burbujas en un medio líquido, sometido a expansión y compresión por ondas ultrasónicas. Tras varios ciclos de formación y destrucción de las burbujas, éstas alcanzan un tamaño crítico e implosionan violentamente, formando puntos calientes que golpean las partículas sólidas en suspensión (Pérez-Campos *et al.*, 2016, <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/icap/article/view/998/996>).

La implosión de burbujas por el fenómeno de cavitación desintegra las estructuras rígidas como paredes celulares, semillas y otras partes de la planta, liberando el contenido intracelular y los compuestos activos al medio, lo que facilita la penetración del solvente y el transporte de los compuestos de interés. Todo esto mejora el proceso de extracción ya que reduce el tiempo, volumen de solvente y la temperatura, y además mantiene la estabilidad de los compuestos en la mezcla, en comparación con métodos convencionales. Sin embargo, los costos para implementar esta tecnología pueden ser elevados. Además, la filtración y centrifugación del material, y posterior concentración del extracto, son necesarias (Fernández, 2007, p. 48, 53; Veillet, Tomao & Chemat, 2010, p. 906).

Según diversos estudios, esta técnica mejora el rendimiento de extracción de capsaicinoides en comparación con técnicas convencionales. Por ejemplo, Boonkird, Phisalaphong & Phisalaphong (2008) compararon la extracción de capsaicinoides de *C. frutescens* por maceración (15 h), con equipo Soxhlet (5 h), y por ultrasonido (3 h), encontrando porcentajes de recuperación de capsaicinoides de 79.4, 92.0 y 87.4%, respectivamente (p. 1076). Casanova-Ortiz *et al.* (2015) realizaron la extracción de capsaicinoides de chile habanero fresco (*C. chinense Jacq.*) por esta técnica y por maceración, ambas por un período de 50 min. Observaron que tras 5 min de exposición a ultrasonidos ya es posible obtener más del 63% de la capsaicina total extraída, en comparación con la maceración (50%). Ellos concluyen que el mayor rendimiento se obtiene con la extracción por ultrasonido (34.33 mg/g base húmeda), en comparación con la maceración (28.08 mg/g base húmeda), lo que significa que el rendimiento del primer proceso es superior en 22.2% (p. 301).

2.3.3.2.4. Extracción enzimática. Esta técnica consiste en el uso de enzimas que degradan las paredes celulares y tejidos vegetales para liberar los componentes de interés al medio, facilitando la acción extractiva de los solventes (Fernández, 2007, p. 49). El tratamiento del material vegetal con enzimas como celulasas, hemicelulasas, pectinasas y proteasas, individualmente o en mezclas predeterminadas, mejora notablemente el rendimiento de la extracción (Baby & Ranganathan, 2016, p. 96).

Por ejemplo, Santamaría, Reyes-Duarte, Bárzana, Fernando, Gama, Mota & López-Munguía (2000) compararon la eficacia del tratamiento enzimático en la extracción de capsaicinoides del chile guajillo puya (*C. annuum* L.), utilizando etanol como solvente. Ellos reportaron que la extracción de capsaicinoides con el método convencional alcanzó un rendimiento de 80%, mientras que el tratamiento enzimático previo de la muestra permitió un rendimiento de 87% (p. 3063). En un estudio realizado por Salgado-Román, Botello-Álvarez, Rico-Martínez & Jiménez-Salas (2008), se utilizaron celulasas producidas por *Rhizopus nigricans* para la extracción de carotenoides y capsaicinoides de ají cayena y byadgi, dos variedades de *C. annuum*. Tras aplicar un proceso extracción de dos secuencias, la primera con hexano como solvente y la segunda con etanol, ellos obtuvieron rendimientos superiores a 96% para carotenoides y 85% para capsaicinoides, por separado (p. 10017).

2.3.3.2.5. Extracción asistida por microondas. Las microondas son ondas electromagnéticas de alta frecuencia que oscilan entre los 300 MHz y 300 GHz. El calor que generan inicia en el núcleo de la muestra y se extiende al exterior, a diferencia del calentamiento convencional donde el calor accede lentamente del exterior al interior. Su energía afecta a las moléculas por conducción iónica y por realineamiento de dipolos en la solución. En ambos casos se produce fricción y calentamiento debido a la resistencia de los iones y dipolos al movimiento inducido por las microondas. Así, cuando un solvente posee mayor momento dipolar, se calentará con mayor rapidez. Por ejemplo, las soluciones iónicas, como ácidos, poseen un momento dipolar permanente y absorben las microondas calentándose fácilmente; en cambio,

solventes apolares, como n-hexano y acetona, no se calientan con microondas (Fernández, 2007, p. 58).

Las investigaciones con frutos de *Capsicum* han demostrado que este método de extracción se realiza en poco tiempo. En este contexto, Csiktusnádi, Forgács, Cserhádi, Mota, Morais & Ramos (2000) obtuvieron pigmentos de páprika (*C. annuum*) en polvo por extracción asistida con microondas y establecieron un tiempo de 2 min para la extracción a 50 W, potencia con la que mantuvieron la muestra a temperaturas inferiores a 60 C, lo cual protege a los carotenos de los cambios estructurales por el calor (p. 44). Del mismo modo, Barbero, Palma y Barroso (2006) desarrollaron un método para extraer capsaicinoides de ajíes mediante el uso de microondas, encontrando que las condiciones óptimas para la extracción eran 125 C, con 25 mL de etanol al 100% como solvente y 0.5 g de ají fresco triturado, en un tiempo de extracción de 5 min (p. 227).

2.3.3.2.6. Extracción con fluidos supercríticos. Un fluido supercrítico es cualquier sustancia sometida a presiones y temperaturas superiores a su punto crítico termodinámico. El estado supercrítico confiere a la sustancia la capacidad de difundir como un gas y disolver como un líquido, convirtiéndola en un sustituto de los solventes orgánicos convencionales. Se pueden usar como fluidos supercríticos algunos compuestos como el acetileno, acetona, agua, dióxido de carbono, etano, etanol, metano, metanol, propano y propileno (Velasco *et al.*, 2007, p. 55).

La extracción inicia depositando el solvente en una cámara para enfriarlo; luego accede a una bomba donde se eleva la presión y temperatura del solvente por encima de su nivel crítico. En este estado, denominado supercrítico, el solvente alcanza un extractor que contiene la muestra y se arrastran selectivamente los compuestos de interés. Al reducir la presión y la temperatura, el solvente vuelve a su estado inicial y los componentes extraídos ya no son solubles. Así, ocurre la separación del extracto y el solvente se reutiliza en el ciclo (Esquível y Bernardo-Gil, 1993. p. 2).

Fernández (2007) menciona que el fluido más utilizado para este tipo de extracción es el CO₂. Esto se debe a que su temperatura crítica es de 31.1 °C, que es adecuada cuando se trabaja con compuestos termolábiles. Su presión crítica es de 73.8 bar, que es fácilmente alcanzable. Además, este gas no es tóxico ni inflamable, es inerte y no contamina el medio ambiente, a diferencia de los solventes orgánicos convencionales. El CO₂ está disponible en alta pureza y costos reducidos, posee gran capacidad de solvatación, selectividad y efectividad de extracción (p. 63). Dicho gas permite la obtención de oleorresina en cantidad similar a los métodos convencionales y con alta pureza e inocuidad, aspectos ideales para su uso en la industria alimentaria y farmacéutica (Pacho-Carrillo *et al.*, 2002, p. 96).

Mediante esta técnica, Giraldo, Gil, Alzate, Restrepo, Millan, Ordóñez & Restrepo (2009) obtuvieron oleorresina de paprika (*C. annuum* L.) con un rendimiento de 10.5% trabajando con 280 bar y 70 °C, pero el rendimiento se incrementó a 11.5% cuando la presión fue 350 bar. La calidad de este producto fue comparable al obtenido por extracción Soxhlet, aunque el uso de CO₂ representa ventajas en cuanto al impacto ambiental (p. 24). En nuestro paıs, Gamarra *et al.* (2011) elaboró oleorresina de rocoto (*C. pubescens*) usando CO₂ supercrıtico y obtuvo un rango de rendimiento entre 0.51 a 1.73% (p. 14).

Adicionalmente, es posible obtener componentes aislados a partir de una misma muestra mediante trituracion, fraccionamiento o peletizado previo, y variando la presion y temperatura del proceso. Ademas de oleorresinas y capsaicinoides, esta tecnica permite extraer aromas, β -caroteno, capsorrubeno, capsanteno, zeaxanteno, β -criptoxanteno, tocoferoles y pigmentos clorofılicos, con porcentajes de recuperacion de 90 a 100%. Con esta metodologıa es posible obtener extractos aromatizantes, colorantes o desodorizados, extractos de capsaicinoides para uso alimentario u oleorresinas ricas en zeaxantenos (Fernandez-Trujillo, 2008, p. 7).

2.3.3.3. Compuestos antimicrobianos en la oleoresina de *Capsicum*. Diversos estudios han determinado que la actividad antimicrobiana de la oleoresina de *Capsicum* se debe a la presencia de capsaicinoides y otros compuestos fenólicos.

2.3.3.3.1. Capsaicinoides. A excepción del pimiento dulce (*C. annuum* var. *annuum*), que no posee capsaicinoides (Stoica, Moscovici, Tomulescu y Babeanu, 2016, p. 93), los ajíes se caracterizan mundialmente por su pungencia o picor al ser consumidos, lo que se debe a la presencia de estos compuestos. Los capsaicinoides son un grupo de alcaloides derivados de la vainillilamina, sintetizados y almacenados en las células de la placenta del fruto (Vásquez-Flota, Miranda-Ham, Monforte-González, Gutiérrez-Carbajal, Velázquez-García & Nieto-Pelayo, 2007, p.353); debido a esta ubicación, se cree que ellos confieren protección química a las semillas (García-Galindo *et al.*, 1995, citados por Vásquez-Flota *et al.*, 2007, p. 353). Si bien los mamíferos perciben la pungencia de los ajíes, Tewksbury, Manchego, Haak & Levey (2006) señalan que las aves consumen semillas picantes y no picantes sin distinción; esto, además de su capacidad para migrar largas distancias pudo facilitar la diseminación de las semillas silvestres (p. 560).

Del total de capsaicinoides, más del 70% es capsaicina [N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil-8-metilnon-6-trans-enamida); (C₁₈H₂₇NO₃)], seguida de la dihidrocapsaicina [N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-8-metilnonenamida; (C₁₈H₂₉NO₃)], a los que se les agrupa como capsaicinoides mayoritarios. Otros derivados como la nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina, se encuentran en porcentajes reducidos. En estado puro, todas estas moléculas se presentan como cristales blancos, inodoros y de pungencia severa. La diferencia entre ellas es netamente estructural, debido a que no se han podido aislar en formas estables (Sethuraman, 1997, p. 7).

El contenido de capsaicinoides en los frutos varía ampliamente entre variedades y dentro de una misma, incluso cuando son cultivados con

condiciones controladas en un invernadero (Cázares-Sánchez *et al.*, 2005, p. 367). Es posible determinar y cuantificar los capsaicinoides mediante la cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) (Gutiérrez, 2014, p. 48), cromatografía de capa fina (TLC) (Soetarno, Sukrasno, Yulinah & Sylvia *et al.*, 1997, p. 59), o mediante espectrofotometría usando como estándar una solución de vainillina en acetato de etilo, que es procesada de la misma forma que la muestra de oleorresina (Cerón-Carrillo, Munguía-Pérez, García & Santisteban-López, 2014, p. 215).

El cuadro 3 muestra el contenido de capsaicinoides en algunos frutos de *Capsicum*, así como los solventes y métodos de detección empleados.

Cuadro 3. Contenido de capsaicinoides en extractos de *Capsicum*

Especie de <i>Capsicum</i>	Contenido de capsaicinoides	Solvente – Método	Fuente
Poblano (<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>)	EM 1: 0.009 mg/g EM 2: 0.011 mg/g EM 3: 0.020 mg/g	Metanol – espectrofotometría UV-Vis	Cerón-Carrillo <i>et al.</i> , 2014, p. 216
Ají Panca (<i>C. chinense</i>)	C: 10.074 mg/g DHC: 6.087 mg/g	Etanol – HPLC	Gutiérrez, 2014, p. 67
Pimenta malagueta (<i>C. frutescens</i>)	C: 31.1 mg/g DHC: 15.0 mg/g	Hexano – HPLC	Nascimento <i>et al.</i> , 2014, p. 5436
Habanero (<i>C. annuum</i>)	C: 5.88 mg/mL DHC: 0.86 mg/mL	Isopropanol – HPLC	Dorantes <i>et al.</i> , 2000, p. 127
Morrón (<i>C. annuum</i>)	C: no detectada DHC: no detectada	Isopropanol – HPLC	Dorantes <i>et al.</i> , 2000, p. 127

EM: Estado de maduración; C: Capsaicina; DHC: Dihidrocapsaicina

2.3.3.3.2. *Diversos compuestos fenólicos.* Se ha demostrado que los capsaicinoides no son las únicas moléculas responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos (Soetarno, Sukrasno, Yulinah & Sylvia, 1997, p. 60), y que dicha actividad no depende del nivel de pungencia inicial de los frutos (Cerón-Carrillo *et al.*, 2014, p. 214). Dentro de su composición, los extractos también presentan diversos compuestos fenólicos como polifenoles, flavonoides y carotenoides con potencial antimicrobiano. Estos compuestos afectan la permeabilidad de la membrana citoplasmática, el metabolismo y la síntesis de proteínas, retrasando o inhibiendo su proliferación (Brul y Coote, 1999, p. 7).

Los compuestos fenólicos presentes en cantidades moderadas en los frutos de *Capsicum*, son además potentes antioxidantes, ya que reaccionan con los radicales libres y los inactivan (Rigon, Leonardi, Miron, Schapoval, Rodrigues & Gosmann, 2012, p.233); dentro de este grupo, los flavonoides son considerados los compuestos de mayor actividad (Pavlovic, Mladenovic, Radovanovic, Acamovic-Dokovic, Zdravkovic & Zdrakovic, 2012, p. 10449). Asimismo, los carotenoides que confieren el color rojo a los frutos también inactivan los radicales libres con una potencia superior al β -caroteno; entre ellos se encuentran los carotenoides oxigenados como la capsantina, capsorubina y criptosantina, exclusivos del género *Capsicum* (Matsufuji, Nakamura, Chino & Takeda., 1998, p. 3471). Cabe mencionar que el potencial antioxidante de los extractos varía según factores como el genotipo y el estado de maduración del fruto (Deepa, Kaur, George, Singh & Kapoor, 2007, p. 128).

Para determinar la concentración de compuestos fenólicos totales en los frutos de *Capsicum* y sus extractos, diversos autores han utilizado y modificado el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Éste consiste en tratar la muestra con concentraciones variables de agua destilada y carbonato de sodio. Luego de la incubación en oscuridad y a temperatura ambiente, el reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con la muestra y forma un complejo azul cuya absorbancia se mide por espectrofotometría. Un estándar de ácido gálico se procesa de la misma manera que la muestra.

Finalmente, los resultados se expresan en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (Cerón-Carrillo *et al.*, 2014, p. 215; Nascimento *et al.*, 2014, p. 19).

El cuadro 4 muestra el contenido de compuestos fenólicos totales en algunas especies de *Capsicum*.

Cuadro 4. Contenido de compuestos fenólicos totales en extractos de *Capsicum*

Especie de <i>Capsicum</i>	Contenido de compuestos fenólicos totales	Solvente – método	Fuente
Poblano (<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>)	EM 1: 1.11 mg EAG/g EM 2: 1.08 mg EAG/g EM 3: 1.09 mg EAG/g	Metanol – Folin-Ciocalteu	Cerón-Carrillo <i>et al.</i> , 2014, p. 217
Serrano (<i>C. annuum</i> L. <i>acuminatum</i>)	EM 1: 1.66 mg EAG/g EM 2: 1.97 mg EAG/g EM 3: 2.43 mg EAG/g	Metanol – Folin-Ciocalteu	Cerón-Carrillo <i>et al.</i> , 2014, p. 217
Habanero (<i>C. chinense</i>)	EM 1: 2.94 mg EAG/g EM 2: 2.77 mg EAG/g EM 3: 2.12 mg EAG/g	Metanol – Folin-Ciocalteu	Cerón-Carrillo <i>et al.</i> , 2014, p. 217
Pimenta malagueta (<i>C. frutescens</i>)	4.9 mg EAG/g	Hexano – Folin-Ciocalteu	Nascimento <i>et al.</i> , 2014, p. 5436
Pimenta malagueta (<i>C. frutescens</i>)	110.6 mg EAG/g	Acetonitrilo – Folin-Ciocalteu	Nascimento <i>et al.</i> , 2014, p. 5436

EM: Estado de maduración; EAG: Equivalentes de ácido gálico

Adicionalmente, es posible identificar y cuantificar los principales compuestos fenólicos contenidos en un extracto mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las proporciones de estos compuestos varían según diversos factores, pero algunos son más comunes que otros. Por ejemplo, entre los compuestos fenólicos presentes en *C. annuum* L, y que son comunes en otros extractos, se tienen a los ácidos cafeico, cinámico, clorogénico, ferúlico, rosmarínico, siríngico y vainillínico, además

de la miricetina, naringenina y quercetina, cuyas concentraciones se muestran en el cuadro 5 (Pavlovic *et al.*, 2012, p. 10449).

Cuadro 5. Compuestos fenólicos presentes en cultivares de *Capsicum annuum*

Compuesto fenólico	Cantidad (mg/g)
Ácido cafeico	0.064 – 0.545
Ácido cinámico	0.040
Ácido clorogénico	0.799
Ácido ferúlico	0.072
Ácido Protocatecuico	0.343 – 0.519
Ácido rosmarínico	0.060 – 4.019
Ácido sinápico	0.250
Ácido siríngico	0.045
Ácido vainillínico	0.146
Miricetina	3.315
Naringenina	0.022 – 0.044
Quercetina	0.041

Fuente: Pavlovic *et al.*, 2012, p. 10449

2.3.4. Carne

2.3.4.1. Generalidades. El *Codex Alimentarius* define a la carne como “todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinen para este fin”. Este alimento es una fuente importante de proteínas de alto valor biológico; sus aminoácidos complementan los obtenidos de cereales y otras proteínas vegetales. Además, la carne es una fuente importante de hierro, zinc y diversas vitaminas del complejo B (Bender, 1992, <http://www.fao.org/docrep/t0562e/T0562E00.htm#Contents>).

2.3.4.2. Conversión del músculo a carne. El sacrificio del animal de abasto inicia con el desangrado, cuyo objetivo es la extracción de tanta sangre como sea posible, ya que ésta es un medio excelente para el desarrollo de los microorganismos causantes del deterioro (Forrest *et al.*,

1975, p. 126). La pérdida acelerada de sangre y la recirculación del volumen restante a los órganos vitales, conllevan al fallo en el aporte de oxígeno y nutrientes en los músculos; además, falla el sistema de eliminación de productos resultantes del metabolismo celular. Estos hechos dan inicio a una serie de cambios físicos y químicos que en conjunto se conocen como cambios *post mortem* o conversión del músculo en carne (Ordóñez, Cambero, Fernández, García, García de Fernando, de la Hoz & Selgas, 1999, p. 178).

Eskin & Shahidi (2013) divide el proceso de conversión en las fases de pre *rigor*, *rigor mortis* propiamente dicho, y post *rigor*, las cuales se describen a continuación:

2.3.4.2.1. *Fase pre rigor*. Durante la fase de pre *rigor* las fibras musculares modifican su metabolismo en un intento por mantener la homeostasis después del sacrificio. Con el cese del aporte de oxígeno, las fibras musculares utilizan el oxígeno remanente ligado a la mioglobina, aunque rápidamente se interrumpe el proceso de glucólisis aerobia y, en consecuencia, la producción de ATP por esta ruta (39 moléculas por unidad glucosil del glucógeno) se detiene. Paralelamente, debido a la acción de la creatina quinasa, la creatina fosfato se desdobla, libera energía y cede fosfato inorgánico al ADP para sintetizar más ATP, pero este mecanismo también se agota rápidamente. Debido a la importancia de esta molécula para la contracción y el metabolismo muscular, las ATPasas continuarán metabolizando el ATP disponible hasta agotarlo totalmente liberando ADP y fosfato inorgánico. Este último estimula la degradación anaerobia de las reservas de glucógeno, con producción de ácido láctico y cantidades insuficientes de ATP (3 moléculas por cada hexosa). Finalmente, dado que la fibra muscular es incapaz de eliminar las sustancias resultantes del metabolismo, ocurre la acumulación de ácido láctico que se traduce en el descenso progresivo del pH (Ordóñez *et al.*, 1999, p. 179; Eskin & Shahidi, 2013, p. 140; Strasburg, Xiong & Chiang, 2008, p. 950).

El pH final de la carne varía según diversos factores, entre ellos, el nivel de glucógeno disponible al momento del sacrificio. En animales sanos con niveles de glucógeno muscular adecuado, el pH inicial está entre 7 a 7.3 y, a medida que disminuye el ATP y se acumula el ácido láctico, desciende hasta 5.4 a 5.5. La especie animal influye en la velocidad de este descenso; en los bovinos se da lentamente, mientras que en porcinos ocurre con rapidez. Otros factores importantes son la especie y raza del animal, el estado nutricional y el tipo de músculo. Con referencia a este último, se sabe que en tejidos con predominio de fibras de contracción rápida o fibras blancas, el pH final alcanza valores de 5.5, 5.5 o 5.8 en carne de bovino, pollo o pavo, respectivamente. En cambio, cuando predominan las fibras rojas o de contracción lenta, el pH final es de 6.3, 6.1 o 6.4, para las mismas especies. Asimismo, la temperatura del músculo influye sobre el pH final. Temperaturas cercanas a 40 °C aceleran el descenso del pH, mientras que las bajas temperaturas lo retrasan. Esto se debe a que las reacciones enzimáticas se ven catalizadas por mayores temperaturas (Ordóñez *et al.*, 1999, p. 180).

2.3.4.2.2. Fase de rigor mortis. En los animales vivos, la unión de los filamentos de actina y miosina permiten que el músculo se contraiga. La formación del complejo actomiosina es reversible y depende de la presencia de ATP y Mg^{2+} . Sin embargo, en el músculo del animal sacrificado, la glucólisis anaerobia y la creatina quinasa aportan cantidades insuficientes de ATP que en breve tiempo se agotan. En consecuencia, la unión de la actina y miosina se vuelve irreversible. Es en este punto cuando el músculo se acorta y adquiere rigidez (Forrest *et al.*, 1975, p. 130).

El tiempo de presentación de este fenómeno varía entre ejemplares de la misma especie y según el tipo muscular de un mismo animal (Forrest *et al.*, 1975, p. 131). En mamíferos, el complejo actomiosina se forma dentro de 1 a 12 h *post mortem* (0.25 a 3 h en porcinos y 6 a 12 h en bovinos) y perdura por 15 a 20 h (Ordóñez *et al.*, 1999, p. 182; Eskin & Shahidi, 2013, p. 139). En el caso de las aves de corral, el tiempo de manifestación es inferior a 4 h

(menos de 0.5 h en pollos y menos de 1 h en pavos) (Ordóñez *et al.*, 1999, p. 182; Serrano, Humada y Maestro, 2012, p. 11).

2.3.4.2.3. Fase post rigor. En el estado de post *rigor*, la carne se vuelve tierna y aceptable para el consumidor (Eskin & Shahidi, 2013, p. 139). El ablandamiento que ocurre durante la maduración y envejecimiento de la carne se debe, en parte, a la acción de las catepsinas, enzimas lisosomales que se activan cuando el pH desciende. Éstas degradan el colágeno del tejido conectivo y las proteínas de la carne (Forrest *et al.*, 1975, p. 133).

Los cambios en el pH, ATP, creatina fosfato y *rigor mortis* se resumen en la figura 3.

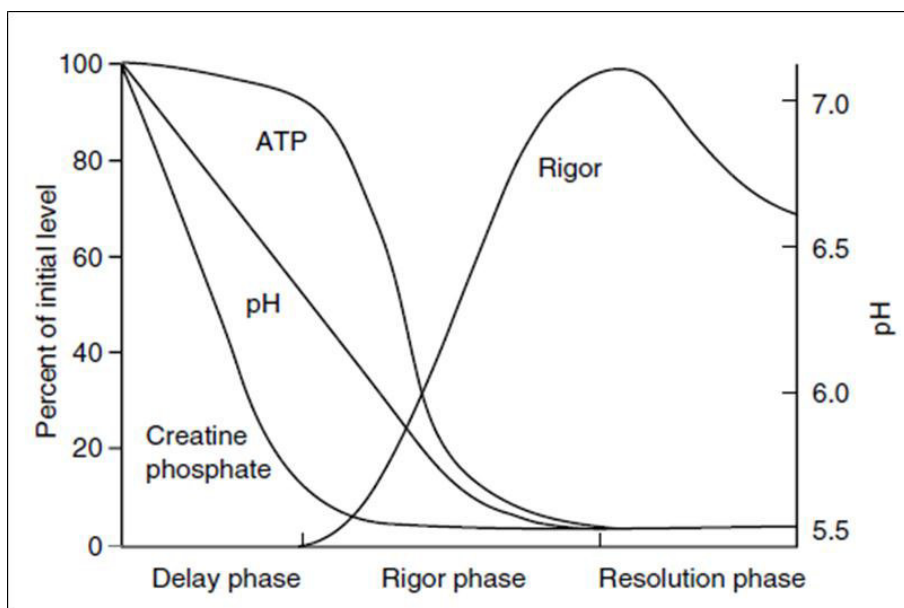


Figura 3. Esquema de los cambios *post mortem* en las concentraciones de ATP, creatina fosfato, pH y rigor en función del tiempo. Fuente: Chiang *et al.*, 2007, citados por Strasburg *et al.*, 2008, p. 951.

2.3.5. Microbiología de la Carne

2.3.5.1. Generalidades. La carne es un medio ideal para el desarrollo de microorganismos causantes del deterioro debido a su pH cercano al neutro,

alto contenido de humedad, presencia de aminoácidos, proteínas, minerales, vitaminas y otros factores de crecimiento. Estas condiciones favorecen el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos, como bacterias y mohos; de los cuales las primeras son las más importantes en el deterioro (Yadav & Singh, 2004, p. 300).

La adherencia bacteriana a la superficie de la carne es un proceso complejo que abarca dos etapas. En la etapa inicial, la adherencia ocurre débilmente por fuerzas de Van Der Waals y las bacterias pueden eliminarse por arrastre con el lavado. Sin embargo, con el transcurso del tiempo, en la segunda etapa ocurre la secreción de polímeros extracelulares que permiten la fijación de las bacterias a la superficie y su remoción se dificulta. Además se vuelven más resistentes al tratamiento térmico y al cloro (Notermans y Kampelmacher, 1983, citados por Moreno, 1991, p. 138).

Por lo general, el músculo se obtiene estéril y la microbiota inicial de la carne se relaciona con la contaminación proveniente de la piel, pelos, plumas, contenido gastrointestinal, materia fecal, aire, agua, suelo, operarios, instalaciones, etc. Inicialmente, la contaminación alcanza niveles entre 10^2 a 10^4 UFC/cm² de carne, los mismos que pueden variar drásticamente en las siguientes etapas del procesamiento, con un riesgo de deterioro mayor (Gill, 1998, citado por Russo *et al.*, 2006, p. 797).

2.3.5.2. Factores que influyen en la vida útil de la carne. Tras la colonización, el desarrollo de los microorganismos causantes del deterioro en carne depende de diversos factores, agrupados por Mossel (1971) en los cuatro siguientes grupos:

- Intrínsecos, que hacen referencia a las características propias de la carne una vez obtenida (Aw, pH, contenido de nutrientes como glucosa disponible, ácido láctico, lípidos y proteínas, etc.) (p. 98).
- Extrínsecos, que engloban las condiciones de almacenamiento de la carne (temperatura, humedad relativa y composición de la atmósfera) (p. 102).

- De procesamiento, como los tratamientos químicos y físicos que se llevan a cabo para preservar la carne (cocido, salado, adición de preservantes químicos, etc.) (p. 103).
- Implícitos, que reflejan las interrelaciones entre los diversos grupos de microorganismos presentes en la carne, así como sinergismos y antagonismos entre ellos (p. 106).

Nychas, Skandamis, Tassou & Koutsoumanis (2008) consideran a la temperatura como el factor más importante que influye sobre el deterioro de la carne (p. 78). El desarrollo microbiano se da dentro de rangos óptimos de temperatura, específicos para cada bacteria. Es así que el manejo de dicho parámetro durante el almacenamiento influye sobre el tipo, la velocidad y extensión de la actividad microbiana. La variación de temperatura en pocos grados resulta selectiva y favorece el desarrollo de otros grupos microbianos con la aparición de alteraciones distintas (Forrest *et al.*, 1975, citados por Mateauda, 2013, p. 12). Sin embargo, cuando el consumidor adquiere, transporta y almacena el producto, lo somete a fluctuaciones de temperatura que no es posible controlar, además de desviarse de las recomendaciones de almacenamiento indicadas por el productor, lo que conlleva a la reducción de la vida útil de la carne (Nychas *et al.*, 2008, p. 78).

El contenido de glucosa y el pH inicial también son factores críticos relacionados con el tiempo de inicio del deterioro. Las bacterias utilizan los compuestos solubles presentes en el tejido muscular, principalmente glucosa y aminoácidos. De estos, el primero es el sustrato más utilizado y su concentración en la superficie de la carne determina que no se degraden otras sustancias. Con valores de pH adecuados, el nivel de glucosa estará comprendido entre 100 a 1000 $\mu\text{g/g}$; si este nivel es aproximadamente 100 $\mu\text{g/g}$, la aparición de los primeros signos de deterioro, como olores desagradables, se da cuando las bacterias alcanzan una población de 10^8 UFC/cm², mientras que con niveles iniciales de glucosa de aproximadamente 1000 $\mu\text{g/g}$, el deterioro no se manifiesta hasta cuando la densidad microbiana alcanza las 10^9 UFC/cm². Sin embargo, cuando el valor

de pH es alto y casi neutro, el nivel de glucosa será reducido, por lo que con 10^6 UFC/cm² ya empiezan a aparecer los signos del deterioro. Finalmente, cuando se agota la glucosa, las bacterias degradarán los aminoácidos produciendo una gran cantidad de amoníaco y en menor medida sulfuros orgánicos y aminas, responsables de malos olores en la carne y coloraciones anormales (Bell, 2001, citado por Kamenik, 2013, p. 5).

La disponibilidad de oxígeno durante el almacenamiento también juega un rol importante en la vida útil de la carne debido a su acción selectiva. Si bien gran número de bacterias son facultativas, algunas son estrictamente dependientes del oxígeno, como *Pseudomonas spp.*, mientras que otras se desarrollan únicamente en ausencia total de éste, como *Clostridium spp.* Estas características también determinan la ubicación de las bacterias en la carne; las aerobias estrictas se establecerán en la superficie, y las anaerobias estrictas en las áreas más internas de la carne (Forrest *et al.*, 1975, citados por Mateauda, 2013, p. 16).

2.3.5.3. Principales géneros microbianos en carne. La microbiota habitual en la carne es muy heterogénea. Los géneros más frecuentes y asociados con el deterioro son *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, así como BAL y géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (Kamenik, 2013, p. 5). Además, la carne puede contaminarse con agentes patógenos como *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enteropatógeno, *Clostridium perfringens* y *C. botulinum* (Cardenas y Giannuzzi, 2005, p. 40).

Según Pennacchia *et al.* (2011), los grupos microbianos mayormente asociados con el deterioro de la carne fresca son *Pseudomonas spp.*, enterobacterias, *B. thermosphacta* y las BAL (p. 84). En conjunto, éstas causan el deterioro visible de la carne debido a reacciones metabólicas con los nutrientes y liberación de productos de desecho. El cuadro 6 resume los

defectos más comunes de la carne y productos cárnicos, asociados a la acción microbiana.

Cuadro 6. Defectos comunes en productos cárnicos y bacterias causantes

Defecto	Producto cárnico	Bacteria
Limo	Carnes	<i>Pseudomonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Brochothrix</i>
Enverdecimiento por H ₂ O ₂	Carnes	<i>Weissella</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
Enverdecimiento por H ₂ S	Carnes empacadas al vacío	<i>Shewanella</i>
Producción de H ₂ S	Carnes curadas	<i>Vibrio</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
Olor sulfuroso	Carnes empacadas al vacío	<i>Clostridium</i> , <i>Hafnia</i>
Olor a col	Tocino	<i>Providencia</i>
Putrefacción	Jamón	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Proteus</i>
Hueso hediondo	Todas las carnes	<i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i>
Sabor ácido	Jamón	BAL, <i>Enterococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>

Fuente: Nychas *et al.*, 2008, p. 79.

2.3.5.3.1. Actividad microbiana de la carne en condiciones de aerobiosis.

La carne almacenada en condiciones aerobias se deteriora con rapidez debido, principalmente, al desarrollo de especies de *Pseudomonas*, como *P. fragi*, *P. lundensis*, *P. putida* y *P. fluorescens* (Kamenik, 2013, p. 5). Éstas son bacterias ubicuas, Gram negativas, móviles, aerobias estrictas, oxidasa y catalasa positivas y que no forman esporas. Algunas son psicrótrofas, por lo que producen la alteración del producto aún en condiciones de refrigeración. Atacan los carbohidratos oxidándolos, algunas reducen los nitratos y el óxido a trimetilamina y dimetilamina, y otras son fuertemente

lipolíticas. Además, pueden producir pigmentos amarillos, verdes o azulados (Delgado & Quartino, 2013, p. 20).

Cuando la población de *Pseudomonas* se incrementa hasta 10^7 a 10^8 UFC/g y se agota la glucosa y el ácido láctico de la carne, ocurre la aparición de limo y olores desagradables debido a que estas bacterias elaboran proteasas y lipasas extracelulares que metabolizan los aminoácidos y lípidos de la carne para continuar su desarrollo. Esto supone una ventaja frente a otros microorganismos que no obtienen nuevos nutrientes tras el agotamiento de la glucosa o que tienen acción proteolítica débil. Sin embargo, los productos del metabolismo incluyen amoníaco, aminas (putrescina y cadaverina) y sulfuros que conllevan a la aparición del característico olor desagradable cuando la carne empieza a deteriorarse. (Nychas *et al.*, 2008, p. 79).

Las *Enterobacteriaceae* se caracterizan por su capacidad para fermentar lactosa con producción de ácido y gas. Son bacilos gram negativos aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Se encuentran en el intestino del hombre y los animales, pero también se ubican en el suelo y agua (Delgado & Quartino, 2013, p. 19). Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, los géneros *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Hafnia* son comunes en el deterioro de la carne. Particularmente, *Serratia liquefaciens* ha sido comúnmente aislada de carnes almacenadas a diferentes atmósferas. Otras bacterias reportadas son *Citrobacter freundii* y *Proteus vulgaris* que se han detectado en carne molida almacenada en condiciones aerobias y anaerobias (Kamenik, 2013, p. 6).

El género *Shewanella* también está implicado en el deterioro de la carne en atmósferas aerobias; especies como *S. putrefaciens* liberan sustancias como el sulfuro de hidrógeno que produce coloración verdosa de la carne cuando se combina con la mioglobina y forma sulfomioglobina. Este género también puede encontrarse en carne empacada al vacío y refrigerada, sobre todo

cuando la carne posee un pH inicial elevado; el deterioro ocurre cuando su población alcanza las 10^6 UFC/cm² (Kamenik, 2013, p. 6).

También son comunes las especies de *Acinetobacter* y *Moraxella*, que aprovechan preferentemente los aminoácidos produciendo ésteres y sulfuros; sin embargo, sus metabolitos constituyen un porcentaje reducido y el deterioro suele atribuirse más a las *Pseudomonas* (López, 2004, p. 20).

2.3.5.3.2. Actividad microbiana de la carne en condiciones de anaerobiosis. El almacenamiento en anaerobiosis inhibe el crecimiento de bacterias aerobias estrictas, como *Pseudomonas*, pero favorece el desarrollo de anaerobias facultativas como las BAL y *B. thermosphacta*. Ambas deterioran la carne empacada al vacío y almacenada en refrigeración, sobre todo en las fases tardías del almacenamiento (Mateauda, 2013, p. 18).

Las BAL son gram positivas de forma cocoide o bacilar, anaerobias facultativas e inmóviles. Son altamente competitivas en atmósferas modificadas y bajas temperaturas, no requieren de oxígeno para proliferar, toleran el dióxido de carbono, nitritos, humo, pH bajo, concentraciones elevadas de sales, carbohidratos y productos de degradación de las proteínas, condiciones que inhiben el crecimiento de otras bacterias. Normalmente, su presencia en la carne significa un incremento de la vida útil debido a que inhiben el desarrollo de bacterias alterantes y patógenas al convertir los carbohidratos en ácido láctico, que ejerce acción bacteriostática (Stamer, 1976, citado por Mateauda, 2013, p. 19; Delgado & Quartino, 2013, p. 20).

Signorini (2007) menciona que la población de BAL representa un bajo porcentaje en la carne al inicio del empacado al vacío; sin embargo, en estas condiciones pueden proliferar hasta constituir el 70 a 90% de la microbiota presente (p. 30). Entre las principales especies de BAL se incluyen a *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus*, *L. fuchuensis*, *L. algidus*, *Carnobacterium*

divergens, *C. maltaromaticum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella spp.* (Doulgeraki *et al.*, 2012, citados por Kamenik, 2013, p. 7).

B. thermosphacta es un pequeño bacilo gram positivo, anaerobio facultativo que no forma cápsulas ni endosporas y es oxidasa negativo. Mide aproximadamente entre 0.6 a 0.75 μm de ancho y 1 a 2 μm de largo, y es capaz de crecer en presencia de 50% de CO_2 . Junto con las BAL, son considerados como responsables del deterioro en carnes empacadas al vacío y en atmósferas modificadas (Delgado & Quartino, 2013, p. 21). Un estudio realizado por Nowak y Czyzowska (2011) concluye que algunas cepas de *B. thermosphacta* son capaces de incrementar el potencial de deterioro de la microbiota coexistente. Dichas autoras reportan que en presencia de esta bacteria, cultivos de *E. coli* y *Pseudomonas* incrementan su producción de cadaverina (p. 573).

Respecto a esta bacteria, López (2004) resume que: “Puede crecer en relativamente bajas actividades de agua (Skovgaard, 1985) y su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20-25 °C, si bien puede multiplicarse entre 0 y 30 °C (Peter y col. 1986). Todas las cepas crecen en presencia de NaCl al 6.5% y algunas incluso en concentraciones superiores al 10% (Gardner, 1981). El pH de crecimiento óptimo es 7.0, pero en aerobiosis puede multiplicarse entre valores de pH de 5.0-9.0 (Brownlie, 1966). En anaerobiosis, algunos autores como Grau (1980), citan que no puede crecer a pH inferiores a 5.8, mientras que otros, como Mano (1997), han observado el crecimiento de esta bacteria en carnes envasadas en atmósferas modificadas en ausencia de oxígeno a valores de pH incluso de 5.3” (p. 13).

Cuando se encuentra en un medio aerobio, *B. thermosphacta* libera ácido acético, acetoína y ácidos grasos volátiles como butírico e isovalérico, que confieren el olor dulzón a la carne alterada (Dainty y Hibbard, 1980, 1983, citados por López, 2004, p. 13); en condiciones anaerobias, esta produce ácido láctico y pequeñas cantidades de ácidos grasos volátiles.

Posteriormente, tras el agotamiento de la glucosa disponible, su carácter proteolítico le permite degradar los aminoácidos generando H₂S, además de ácido láctico, etanol y ácidos grasos de cadena corta que provocan olores desagradables en la carne. (Delgado & Quartino, 2013, p. 21).

El deterioro en el empaque al vacío también puede deberse a especies psicrótrofas del género *Clostridium*. La contaminación con este género bacteriano se debe al contacto de la carne con partículas del suelo y excremento. La alteración común por estas bacterias es la hinchazón del empaque debido a la abundante producción de gas tras la fermentación del ácido láctico una vez que se agota la reserva de glucosa en la carne. Otra alteración asociada a este género es el “hueso hediondo” que consiste en la aparición de olor nauseabundo en la profundidad del músculo, cerca de la inserción con los huesos, donde las condiciones son estrictamente anaerobias. (Kamenik, 2013, p. 8).

También se ha reportado la presencia de *Hafnia alvei* y de *Rahnella* en carne molida y empacada en atmósfera modificada y al vacío. Esto principalmente durante las etapas tardías del almacenamiento (Kamenik, 2013, p. 6).

2.3.6. Métodos de conservación de la carne fresca

Los métodos de conservación de la carne se basan en el control de los procesos fisicoquímicos y de la actividad enzimática muscular y microbiana. Tradicionalmente, los métodos de conservación se basan en el control de la temperatura (cocido, pasteurizado, refrigeración, congelación, etc.), control de la humedad y control por acción antimicrobiana (radiación, empaçado, agentes químicos, etc.). En la actualidad, los métodos más investigados son los de inactivación no térmica, como la alta presión hidrostática, sistemas de empaçado con atmósferas modificadas, empaques activos, uso de componentes antimicrobianos y biopreservación. Todas estas alternativas son sencillas, ahorran energía y no afectan al medio ambiente; además,

preservan adecuadamente la apariencia del producto y eliminan microorganismos alterantes y patógenos (Zhou, Xu & Liu, 2010, p. 120). Los métodos más conocidos se describen a continuación.

2.3.6.1. Refrigeración. Es el método tradicional más importante para garantizar la preservación de la carne (Signorini, 2007, p. 30) ya que extiende la fase de latencia y reduce la velocidad de crecimiento de los microorganismos (Cárdenas y Giannuzzi, 2005, citados por Mateauda, 2013, p. 15).

En la refrigeración, la vida útil de la carne no sobrepasa las 2 semanas, aunque este período puede variar según factores como condiciones previas de manipulación, densidad microbiana inicial, temperatura, pH, potencial redox, etc. (Ordóñez *et al.*, 1999, p. 232). A nivel doméstico, es recomendable consumir la carne fresca refrigerada dentro de los 4 primeros días de almacenamiento; de lo contrario deberá congelarse (Forrest *et al.*, 1975, p. 226). Cuando la carne se almacena a $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, su vida útil se incrementa en 30 a 70%, en comparación con el almacenamiento a temperaturas entre 0.2 a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kamenik, 2013, p. 4). Si bien este período es suficiente para que la carne se distribuya localmente, el comercio actual requiere que este alimento se transporte a lugares lejanos, por lo que es difícil asegurar la calidad microbiológica del producto cuando el tiempo de transporte es prolongado. (Ordóñez *et al.*, 1999, p. 232).

La carne refrigerada se puede almacenar sin empaque o con éste. Cuando se opta por no empacarla, se encuentra en contacto con el entorno, por lo que es necesario controlar también la humedad relativa y la velocidad del aire, con el fin de prevenir la desecación excesiva o la acumulación de agua en la superficie (Ordóñez *et al.*, 1999, p. 228). Si la carne se envuelve en películas de PVC solo tiene una vida útil de 5 a 7 días, lapso en el cual sus niveles de metamioglobina superan el 40% y producen una coloración marrón que es motivo de descarte de los cortes debido a que son poco atractivos para el consumidor (Greene *et al.*, 1971, p. 941). Por ello, hoy en

día son más comunes las técnicas de empaqueo para preservar la carne, las mismas que son complementarias al almacenamiento a bajas temperaturas. El cuadro 7 resume las condiciones adecuadas de almacenamiento de la carne refrigerada.

Cuadro 7. Condiciones óptimas para el almacenamiento de la carne refrigerada

Tipo de almacenamiento	Condiciones óptimas
Carne no envasada	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura: -1 a 2 °C • Humedad relativa: 85 a 95% • Velocidad de circulación del aire: 0.1 a 0.2 m/s • Compromiso intermedio entre conservación (HR 85%) y mermas de peso (HR 95%).
Carne envasada (sólo con envoltura plástica o con envoltura plástica y al vacío o en atmósferas modificadas)	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura: -1 a 2 °C • Humedad relativa sin significancia • Velocidad de circulación del aire suficiente como para permitir el intercambio de la temperatura

Fuente: Ordóñez et al., 1999, p. 229.

2.3.6.2. Congelación. Es un método que se basa en la solidificación del agua contenida en los alimentos. En el caso de la carne y productos cárnicos, es necesario considerar que el punto de congelación del agua en el interior de la célula muscular es inferior al del medio extracelular. Esto se debe a la mayor concentración de solutos orgánicos e inorgánicos a nivel intracelular. Además, significa que durante la congelación, el agua del exterior tiende a convertirse en hielo primero (Forrest *et al.*, 1975, p. 228; Ordóñez *et al.*, 1999, p. 239).

La tasa de congelación de la carne depende del tamaño del corte y características de la metodología a emplear (Zhou *et al.*, 2010, p. 120). Independientemente de esta última, la velocidad de congelación, temperatura y el contenido de agua son factores que determinan la eficacia

del proceso y la calidad sensorial del producto tras el período de almacenamiento. Cuando la congelación es lenta, se forman grandes cristales de hielo en el medio extracelular y, debido a la diferencia de concentración de solutos, parte del agua interna migra al exterior contribuyendo con el aumento de tamaño de los cristales. Esto se pone de manifiesto en la descongelación, ya que la pérdida de agua por exudado y goteo es mayor, y la carne pierde elasticidad (Ordóñez *et al.*, 1999, p. 238); en cambio, cuando la congelación es rápida, la formación de cristales se da uniformemente tanto dentro como fuera de la fibra muscular; además, reduce la pérdida de agua al descongelar (Zhou *et al.*, 2010, p. 120).

Se sabe que a temperaturas inferiores a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ se detiene el desarrollo microbiano y la actividad enzimática de la carne. Es así que la congelación comercial ($-29\text{ }^{\circ}\text{C}$) y doméstica ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) permiten la preservación hasta por 1 a 2 años (Forrest *et al* 227). Ordóñez *et al* (1999) describen que según la especie animal y la temperatura de almacenamiento en congelación, el tiempo de vida útil puede variar, siendo mayor a menores temperaturas (p. 241) tal como se observa en el cuadro 8.

Cuadro 8. Tiempo recomendado para el almacenamiento en congelación

Producto	Temperatura		
	$-12\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-18\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-30\text{ }^{\circ}\text{C}$
Vacuno	4 meses	4 meses	12 meses
Tenera	3 meses	3 meses	8 meses
Ovino	3 meses	6 meses	12 meses
Porcino	1 meses	2 meses	3 meses
Aves	2 meses	8 meses	10 meses

Fuente: Ordóñez *et al.*, 1999, p. 241

Ordóñez *et al.* (1999) recomiendan que el procedimiento se realice una vez transcurrido el *rigor mortis* y con la carne previamente refrigerada. Si se realiza antes, la rigidez cadavérica se manifestará durante la descongelación, por lo que la pérdida de agua debido al acortamiento será

mayor (p. 239). Esto afecta la aceptabilidad del producto en comparación con la carne fresca o refrigerada (Bender, 1992, <http://www.fao.org/docrep/t0562e/T0562E00.htm#Contents>). Además, si bien ninguno de los nutrientes de la carne se vuelve indigerible o se destruye con la congelación, ocurren pérdidas en el valor nutritivo cuando algunos componentes hidrosolubles, como sales, vitaminas, aminoácidos y proteínas, se pierden durante la descongelación (Forrest *et al.*, 1975, p. 227).

2.3.6.3. Irradiación. La radiación electromagnética puede ser de energía baja (microondas y ondas de radio), intermedia (luz visible), alta (rayos X y gamma), y muy alta (propia de elementos como el uranio). La energía proveniente de los rayos X y gamma, así como de electrones acelerados, se conoce como “radiación ionizante” y es suficiente para retirar electrones de un átomo creando iones o radicales libres (Brewer, 2009, p. 2).

Así, la irradiación de alimentos consiste en el uso de radiaciones ionizantes con el fin de eliminar la microbiota presente, detener procesos bioquímicos y prolongar la vida útil. Para este fin, se utilizan isotopos aprobados, como el cesio radiactivo (^{137}Cs) y el cobalto radiactivo (^{60}Co) (Brewer, 2009, p. 2), los cuales permiten eliminar bacterias sin elevar la temperatura del alimento, característica por la que la irradiación también se conoce como “esterilización fría” (Forrest *et al.*, 1975, p. 245). Este método se emplea en un número creciente de países debido a su versatilidad, seguridad, eficacia, ahorro de energía y nula contaminación del medio ambiente. (Farkas, 1998, p. 190).

La irradiación mejora la calidad microbiológica de los alimentos debido a que elimina agentes del deterioro y patógenos. Por ejemplo, a una dosis de 1 kilogray (kGy) ya es posible eliminar la mayoría de microorganismos del deterioro de la carne (Forrest *et al.*, 1975, p. 245); en canales de aves se recomiendan dosis de 2.5 a 5 kGy (Mulder, 1984, p. 418). Estas dosis no afectan significativamente la calidad sensorial de este producto, pero extiende su vida útil de 6 a 14 días, reduciendo el número de patógenos

como *Salmonella* y *Campylobacter* (Kampelmacher, 1983, p. 117). En carne de conejo, la irradiación con dosis de 3 kGy es efectiva frente a patógenos como *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae* y *E. faecalis*; además, extiende la vida útil y no afecta sensorialmente la carne (Badr, 2004, p. 546).

Sin embargo, cabe mencionar que el producto aún es susceptible de deteriorarse debido al desarrollo de microorganismos que resistieron al proceso (Forrest *et al.*, 1975, p. 245), como bacterias de los géneros *Achromobacter* y *Lactobacillus*, y levaduras. Éstas últimas resisten mejor la irradiación en comparación con las bacterias, aunque no produzcan cambios notorios en la carne y su crecimiento eventualmente sea superado por las bacterias (Thornley, Ingram & Barnes, 1960, p. 494).

Asimismo, se ha descrito el cambio de color en la carne fresca debido a la susceptibilidad de la mioglobina a la energía ionizante (Brewer, 2009, p. 2). Al respecto, Brewer (2004) menciona que es posible contrarrestar este fenómeno mediante la alimentación de los animales de abasto con antioxidantes o combinando la irradiación con otros métodos como la adición de antioxidantes directamente sobre el producto antes de la irradiación, o el empaquetado de la carne con atmósferas modificadas. (p. 13).

2.3.6.4. Empacado. En la actualidad, es común que las piezas de carne se empaquen en películas plásticas antes de exponerlas para la venta o almacenarlas. Sin embargo, la carne es aceptada por el consumidor sólo cuando posee un color rojo brillante y esto ocurre naturalmente en contacto con el oxígeno ambiental. Por lo tanto, para repetir este efecto con el empaquetado, se requieren películas que sean altamente permeables al O₂, pero de baja permeabilidad a CO₂, vapor de agua y aromas. Existen diversos plásticos que cumplen con estos requerimientos. Entre ellos se tienen películas delgadas de polietileno de alta y baja densidad, celofán DMLS, cloruro de polivinilo (PVC), etc. Según las necesidades de conservación de cada producto, la industria alimentaria ha combinado estos

polímeros con el fin de obtener películas mixtas que reúnan diversas características de interés (Guevara, 2010, p. 196).

Existen diversas formas de preservar la carne con la tecnología del empaçado; éstas pueden ser: empaçado al vacío, empaçado en atmósferas modificadas con niveles altos o bajos de O₂, y uso de empaques activos (Scetar, Kurek & Galic, 2010, p. 34; Zhou *et al.*, 2010, p. 124). La elección del método de empaçado dependerá de la especie que provee la carne, el tiempo que se requiere almacenar, las características de la carne (DFD o PSE) y el pH inicial; asimismo, la composición de la atmósfera determinará el color, velocidad de decoloración y calidad microbiológica de la carne (Guevara, 2010, p. 195).

2.3.6.4.1. Empaçado al vacío. Es una técnica común que se ha usado exitosamente en diversos países para preservar la carne; es adecuada para grandes cortes con pH normal; en cambio, no lo es para cortes irregulares o con huesos (Scetar *et al.*, 2010, p. 35). Además, elimina el exudado ya que el empaque se adhiere firmemente a la carne y limita el espacio libre para la acumulación del mismo (Guevara, 2010, p. 200); logra la extensión de la vida útil de la carne entre un 50 a 400% debido a la selección microbiana, en donde los cambios en las concentraciones de O₂ y CO₂ dentro del empaque inhiben el desarrollo de bacterias aerobias estrictas como *Pseudomonas* (Garriga *et al.*, 1996, citados por Signorini, 2007, p. 31). Según Nissen, Sorheim y Dainty (1996) estas condiciones prolongan la vida útil de la carne a más de 70 días (p. 185); por su parte, Mateauda (2013) reporta que la carne empaçada al vacío tiene un tiempo de vida útil de hasta 90 días a 0-1 °C (p. 47).

Tras el almacenamiento prolongado en carnes con envoltura simple, aparece una coloración marrón en la superficie de la carne debido a la formación de metamioglobina. Con el fin de prevenir dicho cambio y extender el período de aceptabilidad del producto, el empaçado al vacío debe conferir niveles de O₂ inferiores al 0.15% en la atmósfera que rodea a la carne. No obstante,

Mancini y Hunt (2005) mencionan que el color rojo púrpura intenso debido a la formación de desoximioglobina es también una característica que puede reducir la aceptabilidad de la carne empacada al vacío (p. 107); sin embargo, el color rojo brillante reaparece al exponer nuevamente la carne al O₂ ambiental (Guevara, 2010, p. 200).

2.3.6.4.2. Empacado en atmósferas modificadas. En esta metodología, es necesario remover o cambiar la composición del aire atmosférico que rodea la carne (Zhou *et al.*, 2010, p. 123) y reemplazarla con mezclas de gases como CO₂ (inhibidor de la microbiota aerobia), O₂ (adecuado para mantener el color rojo brillante de la carne) y N₂ (inerte y complementario que evita el colapso del empaque cuando el CO₂ se disuelve en la carne) (Ordóñez *et al.*, 1999, p. 232). Algunas de estas mezclas se observan en el cuadro 9.

Cuadro 9. Mezcla de gases utilizadas en el empacado con atmósferas modificadas para carnes y productos cárnicos

Producto	Composición de los gases (%)		
	O ₂	CO ₂	N ₂
Carnes rojas	60-85	15-40	-
Carne de cerdo	80	20	-
Pollo	-	25	75
Pescado blanco	30	40	30
Pescado oleoso	-	60	40
Salmón	20	60	20
Jamón	-	20-35	65-80
Carne procesada	-	-	100

Fuente: adaptado de Guevara, 2015, p. 16, y Scetar *et al.*, 2010, p. 37

Cuando se usan atmósferas con niveles elevados de O₂, la carne empacada posee una coloración aceptable para el consumidor; sin embargo, estas condiciones favorecen el desarrollo de bacterias aerobias y reducen el tiempo de vida útil de la carne a 8 a 10 días a 4 °C, y 4 a 7 días a 8 °C (Sorheim, Nissen & Nesbakken, 1999, p. 160). Con una mezcla de 70% de O₂ y 30% de CO₂ es posible extender la aceptabilidad hasta los 12 días;

estos períodos son cortos en comparación con otras técnicas y se deben a que el O₂ favorece la oxidación de lípidos, asociada a olores y sabores rancios, desagradables para el consumidor. (Aspé, Roeckel, Marti & Jiménez, 2008, p. 58). En cambio, cuando se usan atmósferas con escaso a nulo O₂, 0.4% de CO, 20 a 30% de CO₂, y N₂ como complemento, mejoran las condiciones de color, sabor, olor y calidad microbiológica; no obstante, cabe mencionar que una de las desventajas de este método es que su apariencia fresca enmascara el deterioro microbiológico y los recuentos microbianos elevados (Scetar *et al.*, 2010, p. 39).

2.3.6.4.3. Empaques activos e inteligentes. Los empaques activos consisten en sistemas que incorporan aditivos para mantener o extender la calidad sensorial de la carne y su vida útil. El uso de estos empaques ha crecido en los últimos años debido a la creciente demanda de nuevas alternativas para extender la vida útil de los alimentos. Dentro de estos sistemas se encuentran los secuestradores de O₂, secuestradores o emisores de CO₂, agentes absorbentes de humedad, y antimicrobianos (Mohebi y Marquez, 2015, p. 3947). En cuanto a los empaques inteligentes, éstos monitorizan y detectan algunas propiedades de los alimentos que contienen y brindan información en tiempo real sobre el estado del producto al fabricante, distribuidor o consumidor (Kerry, O'Grady & Hogan, 2006, p. 114). Dentro de esta categoría se encuentran los que actúan como indicadores de integridad, frescura y tiempo/temperatura (Scetar *et al.*, 2010, p. 39).

Dentro de los sistemas empleados en empaques activos, los secuestradores de O₂ son económicamente viables y proveen una alternativa al uso de las atmósferas modificadas; en su mayoría, se basan en el principio de oxidación del hierro (Smith, Ramaswamy & Simpson, 1990, citados por Kerry *et al.*, 2006, p. 115). Consisten en bolsitas de polvo de hierro con envoltura altamente permeable al O₂ y al vapor de agua, los cuales ingresan y oxidan el hierro, previniendo los cambios oxidativos en la carne. Son colocadas entre el alimento y el empaque y funcionan adecuadamente en refrigeración y congelación, así como en alimentos que se someten a microondas.

Asimismo, es posible incorporar los secuestradores de O_2 entre las capas del empaque, mejorando la remoción de O_2 debido a que el secuestrador entra en contacto con toda la superficie externa del alimento; además, resultan más efectivos cuando se utilizan más de estas capas en un mismo empaque (Ozdemir & Floros, 2004, p. 186). La estructura de un empaque activo con secuestradores de O_2 se muestra en la figura 4.

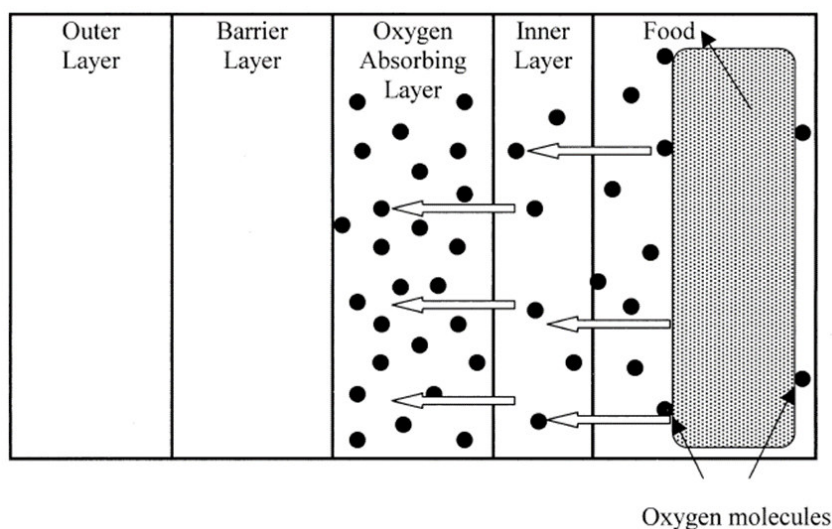


Figura 4. Estructura de un empaque activo con secuestradores de O_2
Fuente: Ozdemir & Floros, 2004, p. 186.

Otros componentes secuestradores de O_2 son las enzimas, como la glucosa oxidasa o alcohol oxidasa. Sin embargo, son costosos en comparación con el polvo de hierro y son sensibles a los cambios de temperatura, pH, Aw y niveles de sustratos y solventes (Ozdemir & Floros, 2004, p. 186). También existen sistemas que aprovechan otros compuestos susceptibles de oxidación como el ácido ascórbico, colorantes fotosensibles, ácidos grasos insaturados como oleico o linoleico, y extracto de arroz (Floros, Dock & Han, 1997, citados por Kerry *et al.*, 2006, p. 115).

Dentro de los empaques activos también se han utilizado emisores y secuestradores de CO_2 ; la función de los primeros es liberar CO_2 en el empaque para inhibir el crecimiento microbiano (Kerry *et al.*, 2006, p. 116);

consisten en bolsitas de carbonato ferroso o una mezcla de ácido ascórbico y bicarbonato de sodio que simultáneamente secuestran el O₂ y liberan CO₂ (Rooney, 1995, citado por Kerry *et al.*, 2006, p. 116). El líquido que se libera de la carne empacada se absorbe en estas bolsitas y a cambio se libera CO₂ para reemplazar a las moléculas del mismo que fueron absorbidas en la carne, previniendo así el colapso del empaque (Scetar *et al.*, 2010, p. 40). Sin embargo, es necesario considerar que la inhibición de microorganismos de deterioro por el CO₂ reduce la competencia entre bacterias y permite el desarrollo de *C. botulinum* y otros patógenos (Sivertsvik, 2003, citado por Kerry *et al.*, 2006, p. 116). Se ha reportado que concentraciones elevadas de CO₂ disminuyen el desarrollo de *C. botulinum* pero la expresión y producción de su toxina se incrementó sobremanera, lo que implica mayor riesgo de presentación del botulismo (Lövenklev, Artin, Hagberg, Borch, Holst & Radström, 2004, p. 2934).

En cuanto a los captadores de CO₂, suelen utilizarse los hidróxidos de calcio, sodio, potasio, óxido de calcio y sílica gel. Estos pueden usarse para remover el CO₂ del empaque para evitar la hinchazón y ruptura durante el almacenamiento (Kerry *et al.*, 2006, p. 117).

El propósito de los empaques activos que absorben humedad es inhibir el crecimiento microbiano, preservar la calidad visual impidiendo que el empaque se empañe durante el almacenamiento (Ozdemir y Floros, 2004, p.187), y evitar los cambios en la textura y sabor. Dichos empaques consisten en dos capas de plástico microporoso, como polietileno o polipropileno, en cuyo interior se colocan polímeros capaces de absorber hasta 500 veces su peso en agua; entre estos polímeros, se utilizan sales de poliacrilato, carboximetil celulosa, copolímeros de almidón (Day 2003 y Reynolds, 2007, citados por Scetar *et al.*, 2010, p. 40), y principalmente sílica gel, debido a que no es tóxico ni corrosivo (Ozdemir y Floros, 2004, p. 187).

El uso de empaques activos con antimicrobianos es una alternativa prometedora para la industria cárnica. Esto se debe a que la contaminación microbiana de la carne ocurre superficialmente y los intentos para retrasar el deterioro mediante sprays o inmersión en sustancias antimicrobianas han enfrentado dificultades como la neutralización de compuestos al contacto con la carne o la difusión de los mismos hacia el interior del alimento (Kerry *et al.*, 2006, p. 117).

Los empaques activos con antimicrobianos constan de 4 capas: externa, de barrera, matriz de antimicrobiano, y control. La sustancia antimicrobiana migra desde la capa matriz y atraviesa controladamente la capa control hasta alcanzar el alimento (Ozdemir y Floros, 2004, p. 189) (figura 5).

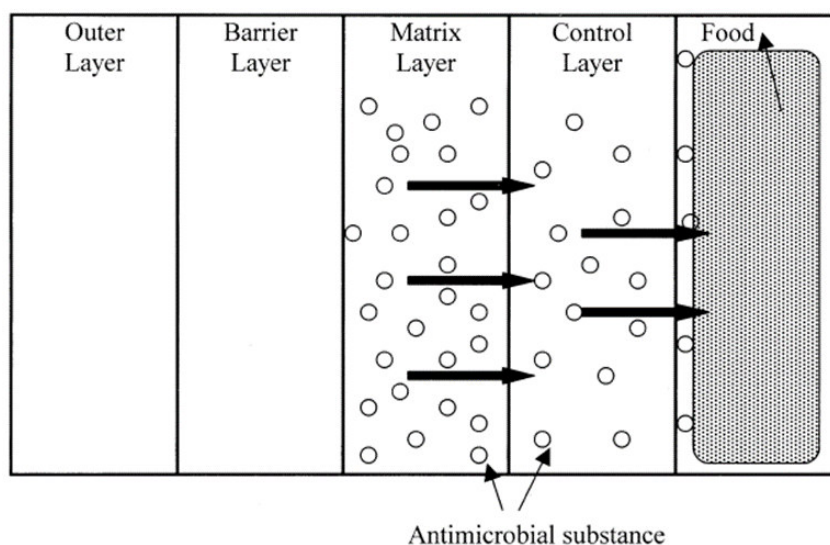


Figura 5. Estructura de un empaque activo multicapa con antimicrobianos. Fuente: Ozdemir y Floros, 2004, p. 190

Según Cooksey (2005), los antimicrobianos se pueden emplear en empaques activos mediante diversas estrategias; una consiste en la incorporación del antimicrobiano en una bolsita conectada al empaque desde la cual se libera la sustancia durante el almacenamiento; otra se trata de la incorporación directa del antimicrobiano en la composición del empaque, caso en el que debe tenerse en cuenta la resistencia del

antimicrobiano cuando se emplea el calor para elaborar el empaque. Además, puede recubrirse el empaque con una sustancia que contenga al aditivo, la misma que no debe someterse a temperaturas elevadas y puede adicionarse al final del proceso de elaboración. También es posible utilizar macromoléculas con capacidad de formar películas (p. 981).

Los agentes antimicrobianos que pueden utilizarse en empaques activos incluyen a los ácidos orgánicos, sales ácidas, anhídridos ácidos, ácidos parabenoicos, alcoholes, bacteriocinas, ácidos grasos y sus esteres, agentes quelantes, enzimas, metales, antioxidantes, antibióticos, fungicidas, agentes sanitizantes, polisacáridos, fenoles, compuestos botánicos volátiles, extractos de plantas y especias, y probióticos (Cutter, 2006, citada por Zhou *et al.*, 2010, p. 125). El cuadro 10 muestra algunos de compuestos activos naturales, así como los polímeros portadores y los productos cárnicos hacia los cuales se destina el empaque.

Cuadro 10. Compuestos activos naturales incorporados directamente a polímeros

Compuesto activo	Polímero portador	Sustrato
Nisina	Revestimiento de silicona Polietileno	Carne de res Carcasas
Ácido láctico	Alginato	Carne magra de res
Tocoferol	Polietileno de baja densidad	Carne de res
Extracto de Rosemary	Poliestireno	Filetes de cordero
Tomillo, Rosemary y salvia	Capa de caseinato entrecruzado y suero	Carne molida
Extracto de orégano	Poliestireno	Filetes de cordero
Quitosano	Quitosano	Jamón cocido
Triclosan	Matriz de plástico	Bacterias patógenas y asociadas a la superficie de la carne

Fuente: Zhou *et al.*, 2010, p. 124

2.3.6.5. *Uso de conservantes.* El ácido láctico es un agente inhibidor usado para preservar la carne pero se ha descrito que decolora el producto y produce olores pungentes (Teotia, 1974, citados por Zhou *et al.*, 2010, p. 122). Una de las tecnologías más difundidas para preservar la carne es el uso de preservantes químicos sintéticos (Gutiérrez, Barry-Ryan & Bourke, 2009, p. 142); sin embargo, hoy en día la percepción de estos compuestos es negativa. Kahl y Kappus, (1993) demostraron que los preservantes químicos butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT) promueven la aparición de tumores en diversos órganos (p. 329). Asimismo, Yadav & Singh (2004) describen que los conservantes químicos atentan contra la salud del consumidor debido a su efecto residual (p. 300).

Todo ello ha conllevado a la investigación de nuevas alternativas para la preservación de carnes, que sean inocuas y seguras para el medio ambiente. Particularmente, se está investigando el uso de aceites esenciales derivados de plantas, los mismos que se caracterizan por ser hipoalergénicos, mejoran el aroma y sabor de la carne, aportan beneficios para el consumidor debido a la capacidad antioxidante y anticancerígena de sus componentes (Chivandi, Dangarembizi, Nyakudya y Erlwanger, 2016, p. 85).

Numerosas investigaciones demuestran el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales; sin embargo, estos resultados no se reflejan del mismo modo cuando se usan como preservantes de carnes. El contacto directo con la carne podría afectar la calidad organoléptica de la misma debido a reacciones o interacciones químicas. Algunos aceites confieren a la carne nuevos aromas que llamarían la atención del consumidor; además, aplicar aceites esenciales a gran escala significaría un costo elevado (Chivandi *et al.*, 2016, p. 85). Por ello, nuevas tecnologías hacen uso de empaques activos en cuya composición se incluye un reducido porcentaje de aceite esencial que se libera desde el empaque y difunde hacia la carne. Esto constituye una solución natural y una nueva alternativa frente al uso de los conservantes químicos (Skandamis y Nyachas, 2002, p. 36).

Los agentes fitoquímicos que componen los aceites esenciales ejercen su acción antimicrobiana alterando la permeabilidad de la pared y membrana de los microorganismos. Debido a su naturaleza lipofílica, los aceites esenciales difunden estas barreras y alcanzan el citoplasma induciendo diversos cambios morfológicos y fisiológicos (Sikkema, De Bont, Poolman, 1995, p. 206).

En las bacterias, la desintegración de la membrana induce la pérdida del ARN, proteínas y afecta el equilibrio iónico, crítico para la supervivencia bacteriana (Ballal *et al.*, 2007, citados por Chivandi *et al.*, 2016, p. 89); la pérdida de potasio debido a la permeabilidad de membrana alterada por los aceites esenciales conlleva a la muerte celular. Además, se alteran las bombas de protones y hay flujo descontrolado de iones H⁺, lo que modifica el pH celular e inhibe la función de transportadores de iones dependientes de H⁺. El daño en las membranas también afecta la síntesis de ATP, lo que reduce la viabilidad celular. Además, se afectan transferasas, oxidorreductasas, canales proteicos y otras estructuras y enzimas involucradas en la respiración celular y asociadas a la membrana plasmática de la bacteria (Chivandi *et al.*, 2016, p. 90).

A pesar de los beneficios que demuestra el uso de aceites esenciales en la preservación de carnes, el uso de altas concentraciones de estos generan cambios en la calidad, sabor y olor de la carne (Sultanbawa, 2011, citado por Chivandi *et al.*, 2016, p. 90); asimismo, se han reportado casos de dermatitis alérgicas por el contacto directo con aceites esenciales o tras la ingesta de una infusión de hierba de limón (Bleasel, Tate, Rademarker, 2002, p. 211). También se reportan casos de toxicidad e irritación de la piel tras el consumo frecuente de alimentos tratados con aceites esenciales (Chivandi *et al.*, 2016, p. 90).

La utilidad de los aceites esenciales depende de su estabilidad y bioactividad. Sultanbawa 2011 menciona que la estabilidad de los fitoquímicos en los aceites se reduce debido a interacciones con los

componentes de la carne; esto puede deberse a la capacidad de las proteínas y lípidos de la carne para ligarse a los fitoquímicos (Sultanbawa, 2011, citados por Chivandi *et al.*, 2016, p. 90). Asimismo, si bien la incorporación de aceites esenciales elimina diversos organismos en la carne, es posible que el nuevo ecosistema permita el desarrollo de otros microorganismos no deseados (Davidson y Branen, 2005, citados por Chivandi *et al.*, 2016, p. 90). Por ello, aún son necesarias las investigaciones para evaluar todos los aspectos relacionados al uso de estos aceites (Chivandi *et al.*, 2016, p. 90).

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Proceso de obtención de oleorresina de Ají Panca

Tipo, lugar y tiempo del estudio. El presente estudio es de tipo experimental y se realizó en el Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental (LSPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, región Lima, Perú, en el transcurso del año 2016.

Adquisición de Ají Panca. Se adquirió un lote de 20 kg de Ají Panca de un distribuidor mayorista local (figura 6). Se registró como procedencia del fruto la provincia de Barranca, ubicada a 49 msnm y a 190 km al noroeste de la ciudad de Lima, Perú. El lote se transportó al LSPSA.



Figura 6. Ajíes panca utilizados para el estudio

Procesamiento del Ají Panca. Cada fruto se escobilló y lavó con agua corriente para eliminar impurezas visibles, como tierra y restos vegetales; los ejemplares en mal estado, picados o rotos fueron descartados. Se optó por

la deshidratación a 65 °C y por 20 h, parámetros determinados en nuestro estudio para la obtención de frutos secos, quebradizos y con peso constante. Estos procesos se realizaron en las instalaciones de una empresa privada; tras la molienda, el lote fue empacado en bolsas de polietileno de alta densidad y transportado de vuelta al LSPSA, protegido de la luz directa.

Extracción de oleorresina. La oleorresina de Ají Panca se obtuvo mediante lixiviación con etanol (Colivet *et al.*, 2006) y maceración pasiva. El insumo se mezcló con etanol rectificado de grado alimenticio en una relación muestra/solvente de 1 kg/10 L. Además, el tiempo de maceración fue no menor a 12 h (Rodríguez *et al.*, 2000). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y protegida de la luz directa. El macerado se filtró y la remoción del solvente se realizó con un rotavapor acoplado a una bomba de vacío (Buchi R-100) regulado a 60 °C y a 200 ± 20 mbar (figura 7), y finalmente en una estufa (Memmert 854 Schwabach) a 40 °C (figura 8) para evitar la deshidratación excesiva del producto. La oleorresina obtenida, un líquido viscoso, homogéneo, de coloración rojiza intensa y aroma característico a la especie (figura 9), se almacenó en frascos ámbar y en refrigeración.

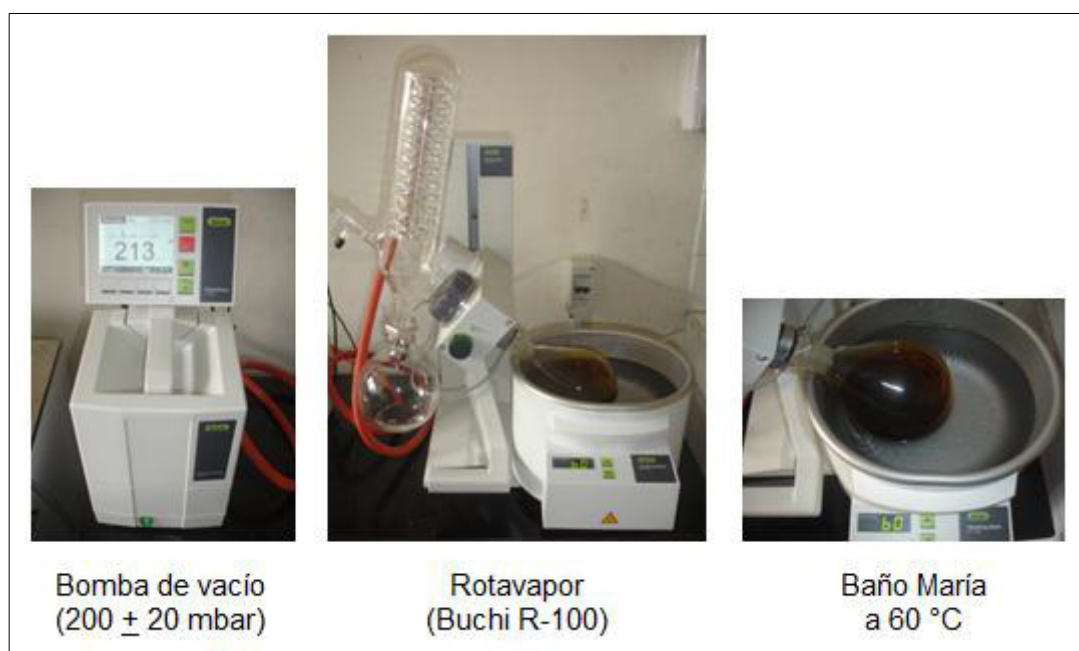


Figura 7. Evaporación y recuperación del solvente con rotavapor



Figura 8. Macerado concentrado en estufa a 40 °C

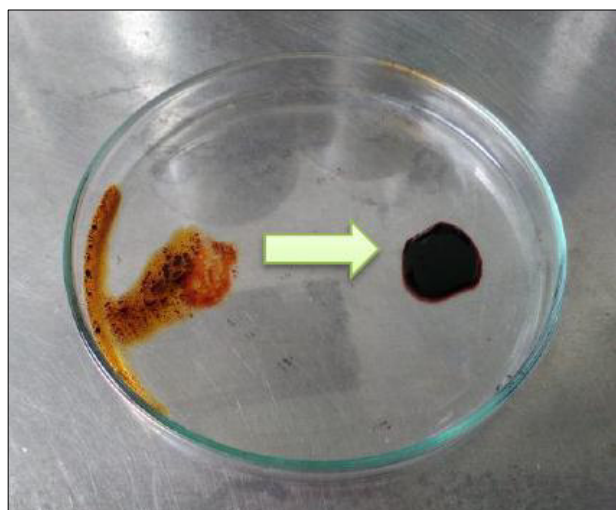


Figura 9. Muestra de oleorresina obtenida.

Caracterización de la oleorresina. El rendimiento del proceso de extracción se calculó considerando el volumen de oleorresina obtenido a partir de 100 g de Ají Panca en polvo. Además, se realizó el control de calidad microbiológica de la oleorresina mediante el recuento de AMT en agar Plate Count con incubación a 35 °C por 48 h (ICMSF, 2000, p. 114). Las evaluaciones mencionadas se hicieron por triplicado. Adicionalmente, se determinó el contenido de capsaicinoides mayoritarios (capsaicina y dihidricapsaicina) en la oleorresina de Ají Panca por HPLC-DAD (AOAC, 1996; método 995.03) en la Unidad de Investigación de Productos Naturales

de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en la región Lima, Perú (anexo 1).

3.2. Estudio de las curvas de crecimiento microbiano en carne

Adquisición de carne. Se adquirieron 5 kg del músculo cuadrado de un bovino (*Bos taurus*) faenado 48 h antes en un matadero local. La carcasa de donde se retiró el músculo permaneció almacenada en refrigeración hasta el momento de la compra. La carne se trasladó inmediatamente al LSPSA en un cooler con geles refrigerantes y se midió el pH inicial al llegar al laboratorio.

Preparación de las muestras. El bloque de carne fue lavado cuidadosamente y a partir de éste se prepararon cortes de 50 g que fueron distribuidos en dos grupos: G1 y G2.

A cada corte de G1 se le aplicó asépticamente una dosis de 2.5 mL oleorresina de Ají Panca extendiéndola en toda la superficie de la carne. Esta dosis se eligió tomando como base los resultados de Careaga *et al.* (2003) quienes señalan que 1.5 mL/50 g es bactericida contra patógenos como *S. typhimurium* (p. 331), así como estudios previos con la misma dosis realizados en el LSPSA así como evaluaciones previas realizadas en el LSPSA.

En el caso de G2, los cortes no recibieron ninguna aplicación y sirvieron como grupo control. Finalmente, todas las muestras se empacaron al vacío con una selladora (Oster FoodSaver modelo V2240) (figura 10) y se almacenaron en refrigeración (0 – 4 °C) por 90 días.



Figura 10. Empacado al vacío de las muestras de carne.

Análisis microbiológicos. En los días 0, 1, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 se tomaron aleatoriamente 3 muestras de cada grupo para realizar las siguientes pruebas microbiológicas:

- Recuento de AMT en Agar Plate Count incubando a 35 °C por 48 h (ICMSF, 2000, p. 114).
- Recuento de AST en Agar Tripticasa de Soya incubando a 7 °C por 10 días (ICMSF, 2000, p. 114).
- Recuento de BAL lácticas en Agar Man Rogosa Sharpe incubando a 30 °C por 72 h en condiciones microaerofílicas (Hall, Ledenbach y Flowers, 2001, p. 201).
- Recuento de *B. thermosphacta* en Agar Sulfato de estreptomicina, acetato de talio y actidiona (STAA) incubando a 25 °C por 48 h. (Gardner, 1966, p. 455). Las colonias sospechosas se confirmaron con la prueba de oxidasa.

Medición de pH. Además de los análisis microbiológicos, se registró el pH de las muestras de carne de ambos grupos en los días mencionados utilizando el potenciómetro (Hanna HI 2211) y según las especificaciones de la NTP-ISO 2917 (1998), es decir, el pH se midió por triplicado en una misma muestra practicando pequeñas incisiones en la superficie de la carne de aproximadamente 1 cm, de modo que se pueda introducir el electrodo para realizar la lectura directamente del jugo liberado tras el corte.

Análisis de datos. Los datos se colectaron en hojas de cálculo de Microsoft Excel y se elaboraron curvas de desarrollo microbiano y de pH. Se usó la prueba T de Student para evaluar diferencias significativas entre G1 y G2 en cada período de análisis. Se trabajó con un nivel de confianza del 95% y usando el paquete estadístico IBM SPSS 22.

Para establecer los niveles aceptables de población microbiana, se consideraron los Criterios Microbiológicos de la Calidad Sanitaria e Inocuidad de la Carne Cruda, Refrigerada o Congelada (N. T. S. N° 071 – 2008/MINSA) que establecen un “m” = 5 log UFC/g y “M” = 7 log UFC/g.

También se realizó un análisis de regresión para las curvas de desarrollo de AMT, así como de valores de pH con el fin de estimar el tiempo de vida útil de la carne en el estudio. Esto se llevó a cabo solamente en aquellos intervalos de días de almacenamiento en donde se alcanzaban los valores límites de log UFC/g o de pH.

Asimismo, se consideró un valor límite de aceptabilidad para el pH de 6.4, según lo establecido en los Requisitos de las Carnes Rojas (N. T. P. 201.001:1977).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados

4.1.1. Características de la oleorresina de Ají Panca

El rendimiento de extracción de oleorresina de Ají Panca (12.53 ± 0.30 %) difiere con lo reportado por diversos autores que también usaron etanol como solvente orgánico. Así, Rodríguez *et al.* (2000) elaboraron oleorresina de otras variedades de *C. chinense* con rendimientos que oscilaron entre 4.20 a 7.70%. Asimismo, reportaron rendimientos de 8.95 a 10.85% y de 6.40 a 12.42% para variedades de *C. annum* y *C. frutescens*, respectivamente (p. 5). Nuestros resultados también difieren con lo reportado por Gutiérrez (2014), quien elaboró oleorresina de Ají Panca con un rendimiento de 4.13% (p. 66). Esto demuestra que el rendimiento de extracción de compuestos activos de origen vegetal es altamente variable. Se ha descrito que factores como el estado de maduración del fruto, contenido inicial de componentes activos, las condiciones de cultivo de la planta, el tipo de solvente, tiempo de exposición de la materia prima a éste, técnica de extracción, entre otros, influyen directamente en el rendimiento de los procesos de extracción (Vásquez-Flota *et al.*, 2007, p. 357).

Los contenidos de capsaicina (1.39 mg) y de dihidrocapsaicina (0.54 mg) por gramo de oleorresina de Ají Panca fueron inferiores a los reportados por Gutiérrez (2014), quien en su producto cuantificó hasta 10.97 y 6.09 mg de capsaicina y dihidrocapsaicina, respectivamente, mediante la misma técnica analítica (p. 67). Es necesario considerar que el contenido de estos compuestos cambia entre variedades y dentro de una misma planta, incluso cuando se cultivan en condiciones controladas de invernadero (Cázares-

Sánchez *et al.*, 2005). Además, la procedencia y condiciones de cultivo son algunos de los factores que influyen sobre el contenido de componentes activos en los frutos (Vásquez-Flota *et al.*, 2007, p. 357). Los frutos de Ají Panca usados para nuestro estudio provinieron de la provincia de Barranca, mientras que Gutiérrez trabajó con frutos de un huerto en la ciudad de Lima. El menor contenido de capsaicinoides también puede atribuirse a la dilución de los compuestos activos cuando el porcentaje de extracción es mayor, tal como demuestran Dorantes *et al.* (2000). Ellos mencionan que el volumen de oleorresina que se recupera tras la extracción es inversamente proporcional al contenido de capsaicinoides (p. 4).

El Ají Panca es un fruto de pungencia leve. Por ello, se justifica que nuestros resultados sean inferiores en comparación con otras variedades más picantes de *Capsicum*, como la pimienta malagueta (*C. frutescens*) cuyas concentraciones de capsaicina y dihidrocapsaicina fueron de 109.80 y 42 mg/g de extracto, respectivamente (Nascimento *et al.*, 2014, p. 5436). De modo opuesto, el pimiento dulce (*C. annuum* var. *annuum*) no posee capsaicinoides y por ello no se detectan sus niveles en las pruebas analíticas (Dorantes *et al.*, 2000, p. 127; Stoica *et al.*, 2016, p. 93)

El recuento de AMT en la oleorresina fue menor a 10 UFC/mL. Se ha descrito que a concentraciones elevadas de componentes activos, ocurre la desnaturalización de proteínas bacterianas (Aminzare, Hashemi, Hassanzad & Hejazi, 2016, p. 67). Teniendo en cuenta que las oleorresinas se analizaron puras, es posible atribuir nuestros resultados a dicho mecanismo. Estos hallazgos y el uso de etanol de grado alimentario para la extracción, implicarían que nuestro producto es inocuo.

4.1.2. Efecto de la oleorresina sobre la microbiota de la carne

En G1, se hallaron recuentos inferiores para todos los microorganismos durante todo el almacenamiento, en comparación con las poblaciones de G2; nuestros hallazgos pueden atribuirse al efecto antimicrobiano de los

capsaicinoides y otros compuestos fenólicos, presentes en la oleorresina de Ají Panca. A bajas concentraciones, estos compuestos afectan la actividad enzimática y el metabolismo energético de las bacterias, mientras que concentraciones mayores pueden desnaturalizar las proteínas. Asimismo, modifican la estructura y alteran la permeabilidad de las paredes y membranas bacterianas, favoreciendo la pérdida de compuestos desde los ribosomas. Finalmente, interfieren con la transferencia de electrones, intercambio de nutrientes, síntesis de proteínas y otras actividades enzimáticas, (Aminzare *et al.*, 2016, p. 67).

Más aún, las condiciones del ecosistema generado en G1 contribuyen con la actividad antimicrobiana. Se ha descrito que la sensibilidad bacteriana a los efectos de los aceites esenciales aumenta cuando el pH, la temperatura y los niveles de oxígeno disminuyen. Cuando el pH es ácido, los aceites se vuelven más hidrofóbicos, lo que les permite disolverse fácilmente y atravesar las membranas lipídicas bacterianas (Juven *et al.*, 1994, p. 629).

4.1.3. Interacción entre BAL y *B. thermosphacta*.

El crecimiento de BAL en productos cárnicos es deseable debido a la producción de bacteriocinas que inhiben el desarrollo de agentes patógenos y de alterantes, como *B. thermosphacta*. Sin embargo, se ha descrito que cuando la carne se almacena al vacío y en refrigeración, tanto las BAL como *B. thermosphacta* son los responsables del deterioro del producto en la mayoría de los casos (Cárdenas y Gianuzzi, 2005, p. 40).

En el grupo con oleorresina se observó que entre el día 15 y 45 de almacenamiento la población de BAL se incrementa mientras que los recuentos de *B. thermosphacta* declinan. Este hallazgo no se manifiesta del mismo modo en el grupo control. Diversos estudios han demostrado una relación inversa entre el desarrollo de BAL y *B. thermosphacta* en los productos cárnicos. Se sabe que las BAL producen bacteriocinas como nisina y lactatos que inhiben el crecimiento de *B. thermosphacta*. Olaoye y

otros (2015) evaluaron la actividad antimicrobiana de dos BAL, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I23 y *Lactococcus lactis* subsp. *hordinae* E91, aplicadas tanto individualmente como en cultivo mixto, contra *B. thermosphacta* en carne de cerdo almacenada a 30 °C por 168 h. Tras 48 h, los recuentos de *B. thermosphacta* en estos grupos fueron inferiores a los del grupo control libre de BAL (p. 49).

Más aún, Sharma y otros (2013) demostraron que la capsaicina presente en el extracto de *Capsicum annuum* no afecta significativamente la población de *Lactobacillus acidophilus*, una BAL. Sin embargo, el extracto incrementó el metabolismo bacteriano y con ello la producción de L-lactato, reduciendo el pH en el medio de cultivo (p. 4142). Por ello, es posible atribuir el descenso de *B. thermosphacta* tanto a la mayor producción de bacteriocinas por parte de las BAL presentes normalmente en la carne, como a la acción directa de la oleoresina.

4.1.4. Efecto de la oleoresina sobre el pH de la carne

En general, durante los primeros 30 días, en ambos grupos se observó el descenso de pH desde 5.95 ± 0.08 (G1) y 6.09 ± 0.17 (G2) al día 0, hasta valores de 5.71 ± 0.03 (G1) y 5.73 ± 0.15 (G2) al día 30 de almacenamiento. Este proceso es natural y ocurre durante la maduración de la carne. Se debe a la degradación espontánea de las reservas de glucógeno mediante el metabolismo anaerobio, con el fin de obtener moléculas de ATP para mantener la homeostasis del tejido (Ordóñez *et al.*, 1999, p. 179). Durante este proceso, también se produce ácido láctico que se acumula en la carne debido a la incapacidad del tejido para eliminar esta sustancia. Todo ello se traduce en el descenso progresivo del pH (Strasburg *et al.*, 2008, p. 950).

Sin embargo, también se observó que a lo largo de los 90 días de almacenamiento, el pH de la carne en G1 se mantuvo siempre por debajo de G2. Además, al día 1 se encontró un descenso significativo ($p < 0.05$) del pH en G1 (5.87 ± 0.18) en comparación a G2 (6.20 ± 0.11). Estos eventos

pueden atribuirse al efecto que ejerce la capsaicina, un componente de la oleorresina, sobre el tejido muscular. Mahmmoud (2008) describe que la capsaicina estimula hasta en 3 veces la actividad de la bomba ATPasa dependiente de Ca^{2+} , ubicada en la membrana del retículo sarcoplásmico. Esto incrementa la hidrólisis de ATP, con acumulación de ADP y P inorgánico. Además, cuando el pH del medio es más ácido, el estímulo para la hidrólisis de ATP es aún mayor (p. 21420). Más aún, se ha descrito que la acumulación de P inorgánico estimula la degradación anaerobia de las reservas de glucógeno en la carne, lo que incrementa la producción de ácido láctico y reduce con rapidez el pH (Eskin & Shahidi, 2013, p. 140).

Cabe considerar que los valores de pH de G2, superiores durante todo el almacenamiento, también pueden atribuirse al metabolismo microbiano. Dado que G2 actuó como grupo control sin aplicación de ningún agente inhibidor, las poblaciones microbianas fueron superiores y consumieron con mayor rapidez la glucosa disponible en la superficie de la carne (Bell, 2001, citado por Kamenik, 2013, p. 5). Esto significa que una incipiente actividad proteolítica pudo llevarse a cabo desde el inicio del almacenamiento, con degradación de los ácidos y liberación de compuestos nitrogenados que incrementan el pH de la carne (Quesada, Sendra, Navarro y Sayas-Barberá, 2016, p. 7).

El pH óptimo de la carne de bovino oscila entre 5.5 a 6.3 (Ordóñez *et al.*, 1999, p. 180). En nuestro estudio, el pH de G1 se mantiene dentro de niveles adecuados hasta el día 60 de almacenamiento (5.76 ± 0.06). En cambio, en G2 solo fue adecuado hasta el día 45 (5.87 ± 0.09). Posteriormente, el pH de ambos grupos se incrementa hasta niveles inaceptables, aunque en todo momento la oleorresina mantiene el pH de G1 ligeramente inferior a G2. Esto significaría que, en cuanto al pH, la oleorresina de Ají Panca contribuye preservando la carne hasta por un período de 60 días a una temperatura de 2 ± 2 °C, con un lapso adicional de 15 días en comparación con el empacado tradicional, sin aditivo alguno, que mostró un pH inaceptable al día 45. Sin embargo, la calidad de la carne no

depende únicamente de este parámetro, sino también de su calidad microbiológica.

4.1.5. Vida útil del producto

Los Criterios Microbiológicos de la Calidad Sanitaria e Inocuidad de la Carne Cruda (N. T. S. N° 071 – 2008/MINSA) permiten inferir que la carne de G1 es un producto aceptable hasta el día 13 de almacenamiento en refrigeración, manteniendo una calidad intermedia durante el período restante de almacenamiento. Sin embargo, G2 mantiene su calidad microbiológica hasta el día 3 de almacenamiento, y su calidad intermedia se mantiene hasta el día 70, a partir del cual supera los 7 log UFC/g y se convierte en un producto no apto para el consumo humano.

En cuanto a los valores de pH, los Requisitos de las Carnes Rojas (N. T. P. 201.001:1977) establecen un valor máximo de pH de 6.4. Al respecto, G1 mantiene niveles adecuados hasta el día 70 de almacenamiento, momento aproximado en el que se alcanza dicho valor máximo, lo que obliga al consumo inmediato del producto o a su descarte. En cambio, la carne de G2 sólo mantiene un nivel adecuado de pH hasta el día 56.

En conjunto, estos hallazgos permiten establecer que la vida útil de la carne de G1 es de 70 días, mientras que G2 permanece apta para el consumo hasta los 56 días. Nuestros resultados se aproximan a lo descrito por López, Braña y Hernández (2013), quienes señalan que la vida útil de la carne varía en función de diversos factores. Si la carne se procesa en malas condiciones de higiene, su vida útil no superará los 2 días (p. 4), mientras que un corte de carne de buena calidad tendrá una vida útil de 5 a 7 días. Sin embargo, estos períodos pueden extenderse hasta por 30 a 50 días cuando la carne se empaca al vacío y se refrigera a 2 °C (p. 7). En cambio, la vida útil de nuestro producto es menor en comparación con lo reportado por Mateauda (2013), quien evaluó los cambios fisicoquímicos y el desarrollo microbiológico en carne de vacuno empacada al vacío y almacenada

durante 142 días a 0 ± 1 °C. Él determinó que el tiempo de vida útil de la carne en estas condiciones es de hasta 90 días, período dentro del cual los recuentos de microorganismos (AMT, AST, BAL, coliformes totales, *B. thermosphacta*, *Salmonella sp.* y *E. coli* O157:H7) se mantienen por debajo de 7 log UFC/g, aunque durante los 142 días de almacenamiento no se observó que la carne alcance el pH de maduración adecuado, quizá debido a su valor inicial elevado (p. 47).

4.2. Pruebas de hipótesis

Hipótesis general:

La aplicación de oleorresina de Ají Panca disminuye el desarrollo microbiano en carne de vacuno empacada al vacío y almacenada en refrigeración.

Hipótesis específicas:

- Hay menor recuento de AMT, AST, BAL y *B. thermosphacta* en la carne de vacuno con aplicación de oleorresina de Ají Panca, empacada al vacío y almacenada en refrigeración.
- El pH de la carne de vacuno con aplicación de oleorresina, empacada al vacío y almacenada en refrigeración, se mantiene a niveles aceptables por un período mayor.

4.3. Presentación de resultados

4.3.1. Características de la oleorresina de Ají Panca

El cuadro 11 muestra las características de la oleorresina de Ají Panca obtenida en nuestro estudio.

Cuadro 11. **Características de la oleoresina de Aji Panca**

Característica	
Rendimiento de extracción	12.53 ± 0.30 %
Capsaicina	1.39 mg/g de extracto
Dihidrocapsaicina	0.54 mg/g de extracto
Recuento de AMT	< 10 UFC/mL

4.3.2. Efecto sobre el desarrollo de aerobios mesófilos totales

El cuadro 12 muestra los recuentos de AMT en UFC/g para ambos grupos de carne hasta el día 90 de almacenamiento en refrigeración. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de G1 y G2 en los días 45 ($p=0.02$), 60 ($p=0.01$), 75 ($p=0.00$) y 90 ($p=0.01$) de almacenamiento en refrigeración.

Cuadro 12. **Recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/g)**

Día	Con oleoresina (G1)	Control (G2)	D. S.
0	4.04 ± 0.18 log (10 964.78)	4.07 ± 0.44 log (11 748.98)	-
1	3.91 ± 0.06 log (8 128.31)	4.85 ± 0.98 log (70 794.58)	-
15	5.13 ± 1.17 log (134 896.29)	5.90 ± 0.12 log (794 328.23)	-
30	5.43 ± 0.68 log (269 153.48)	6.39 ± 0.51 log (2 454 708.92)	-
45	5.51 ± 0.24 log (323 593.66)	6.14 ± 0.14 log (1 380 384.26)	Sí
60	5.66 ± 0.37 log (457 088.19)	6.85 ± 0.14 log (7 079 457.84)	Sí
75	5.79 ± 0.06 log (616 595.00)	7.08 ± 0.22 log (12 022 644.35)	Sí
90	6.04 ± 0.21 log (1 096 478.20)	7.27 ± 0.33 log (18 620 871. 37)	Sí

D. S.: diferencia significativa entre G1 y G2 ($p<0.05$)

La figura 11 muestra el desarrollo de los AMT en G1 y G2 durante los 90 días de almacenamiento. Se observa que la población de estos

microorganismos se mantiene a niveles inferiores en G1 en comparación con G2 durante todo el almacenamiento.

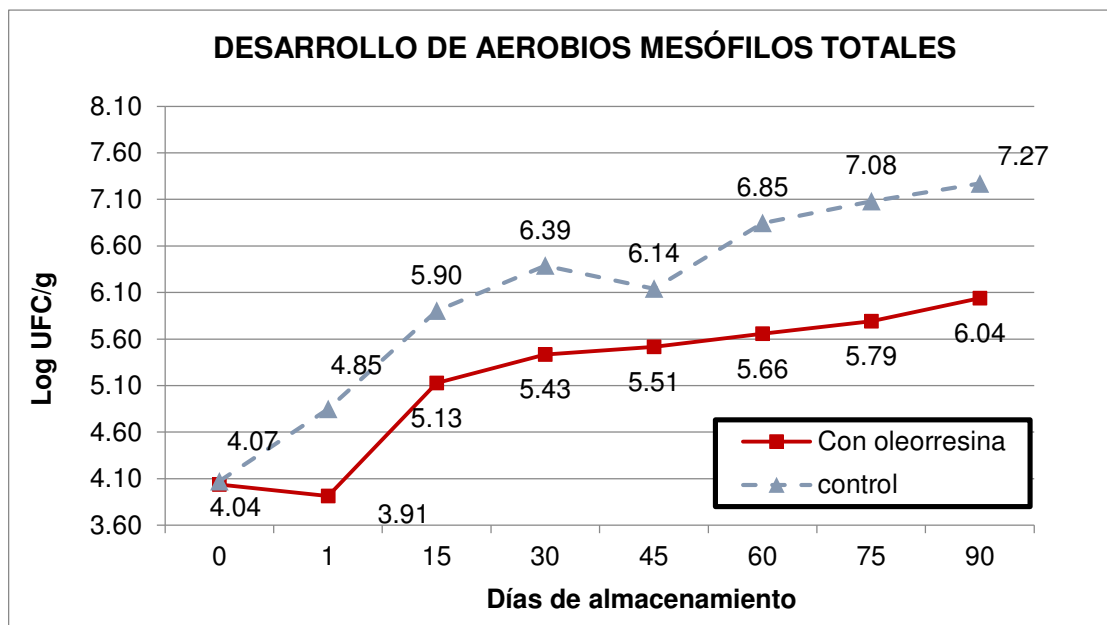


Figura 11. Curvas de desarrollo de aerobios mesófilos totales (log UFC/g)

El análisis de regresión realizado entre los días 1 a 15 de almacenamiento de G1 ($y = 0.0871x + 3.8229$; $R^2 = 1$), permitió determinar que el recuento de AMT alcanza el límite aceptable ($m = 5$ log UFC/g) a los 13 días. Luego de este período, la calidad del producto es intermedia. En este grupo, el límite de inacceptabilidad ($M = 7$ log UFC/g) no se alcanza dentro de los 90 días de almacenamiento. En cuanto a G2, se realizó el análisis de regresión para los intervalos de 1 a 15 días ($y = 0.075x + 4.775$; $R^2 = 1$) y de 60 a 75 días ($y = 0.0153x + 5.93$; $R^2 = 1$) de almacenamiento. En este grupo, el límite de aceptabilidad se alcanzó a los 3 días de almacenamiento y el producto se volvió peligroso para la salud a partir de los 70 días de almacenamiento.

4.3.3. Efecto sobre el desarrollo de aerobios psicrótrofos totales

El cuadro 13 muestra los recuentos de AST en UFC/g para ambos grupos de carne hasta el día 90 de almacenamiento en refrigeración. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de G1 y G2 en el día 75 ($p=0.01$) de almacenamiento.

Cuadro 13. Recuento de aerobios psicrótrofos totales (UFC/g)

Día	Con oleoresina (G1)	Control (G2)	D. S.
0	5.32 ± 0.06 log (208 929.61)	5.55 ± 0.46 log (354 813.39)	-
1	5.03 ± 0.66 log (107 151.93)	5.75 ± 0.56 log (562 341.33)	-
15	5.48 ± 0.74 log (301 995.17)	6.09 ± 0.41 log (1 230 268.77)	-
30	5.83 ± 0.57 log (676 082.98)	6.20 ± 1.36 log (1 584 893.19)	-
45	5.07 ± 0.91 log (117 489.76)	5.76 ± 0.38 log (575 439.94)	-
60	6.61 ± 0.45 log (4 073 802.78)	7.14 ± 0.06 log (13 803 842.65)	-
75	6.92 ± 0.06 log (8 317 637.71)	7.43 ± 0.18 log (26 915 348.04)	Sí
90	7.38 ± 0.30 log (23 988 329.19)	8.02 ± 0.65 log (104 712 854.81)	-

D. S.: diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$)

La figura 12 muestra el desarrollo de los aerobios psicrótrofos totales en G1 y G2 durante 90 días de almacenamiento en refrigeración. Se observa que la población de estos microorganismos se mantiene a niveles inferiores en G1 comparación con G2.

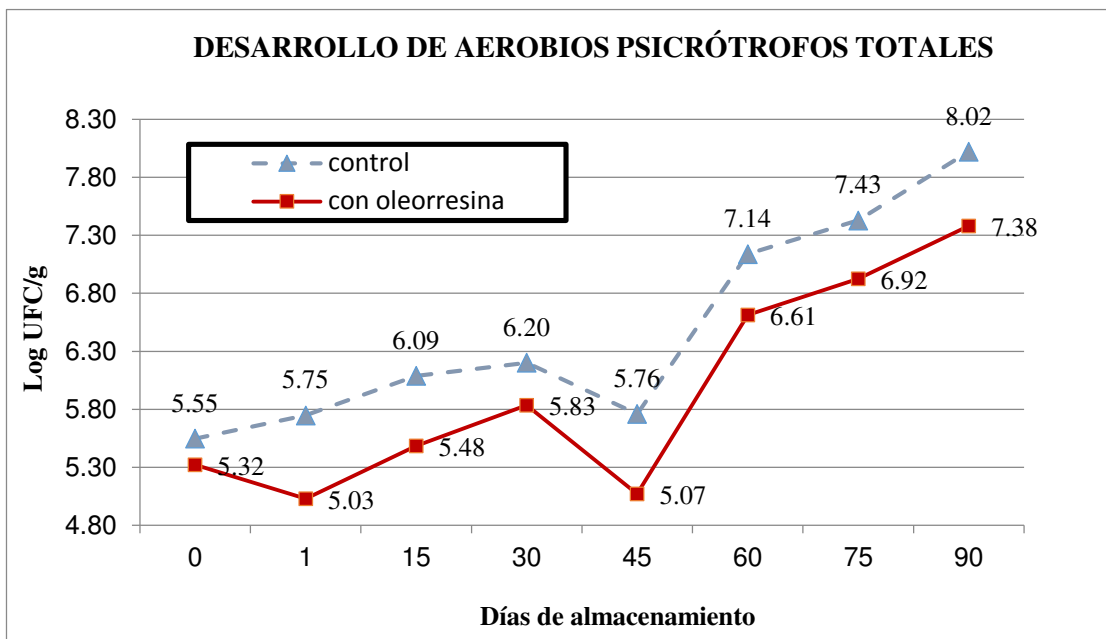


Figura 12. Curvas de desarrollo de aerobios psicrótrofos totales (log UFC/g)

4.3.4. Efecto sobre el desarrollo de bacterias ácido lácticas

El cuadro 14 muestra los recuentos de BAL en G1 y G2 hasta el día 90 de almacenamiento en refrigeración. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los días 15 ($p=0.04$), 75 ($p=0.02$) y 90 ($p=0.03$) de almacenamiento en refrigeración.

Cuadro 14. Recuento de bacterias ácido lácticas (UFC/g)

Día	Con oleoresina (G1)	Control (G2)	D. S.
0	3.16 ± 0.23 log (1 380.38)	3.14 ± 1.09 log (1 445.44)	-
1	2.74 ± 0.26 log (549.54)	3.72 ± 0.59 log (5 248.07)	-
15	4.44 ± 0.78 log (27 542.29)	5.81 ± 0.23 log (645 654.23)	Sí
30	5.46 ± 0.65 log (288 403.15)	6.66 ± 0.50 log (4 570 881.90)	-
45	6.10 ± 0.71 log (1 258 925.41)	6.29 ± 0.18 log (1 949 844.60)	-
60	5.79 ± 0.32 log (616 595.00)	6.39 ± 0.35 log (2 454 708.92)	-
75	5.82 ± 0.15 log (660 693.45)	6.70 ± 0.36 log (5 011 872.34)	Sí
90	6.10 ± 0.14 log (1 258 925.41)	7.25 ± 0.56 log (17 782 794.10)	Sí

D. S.: diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

La figura 13 muestra el desarrollo de las BAL en ambos grupos de carne durante los 90 días de almacenamiento. En todo momento se observa un menor desarrollo de estas bacterias en G1 en comparación con G2.

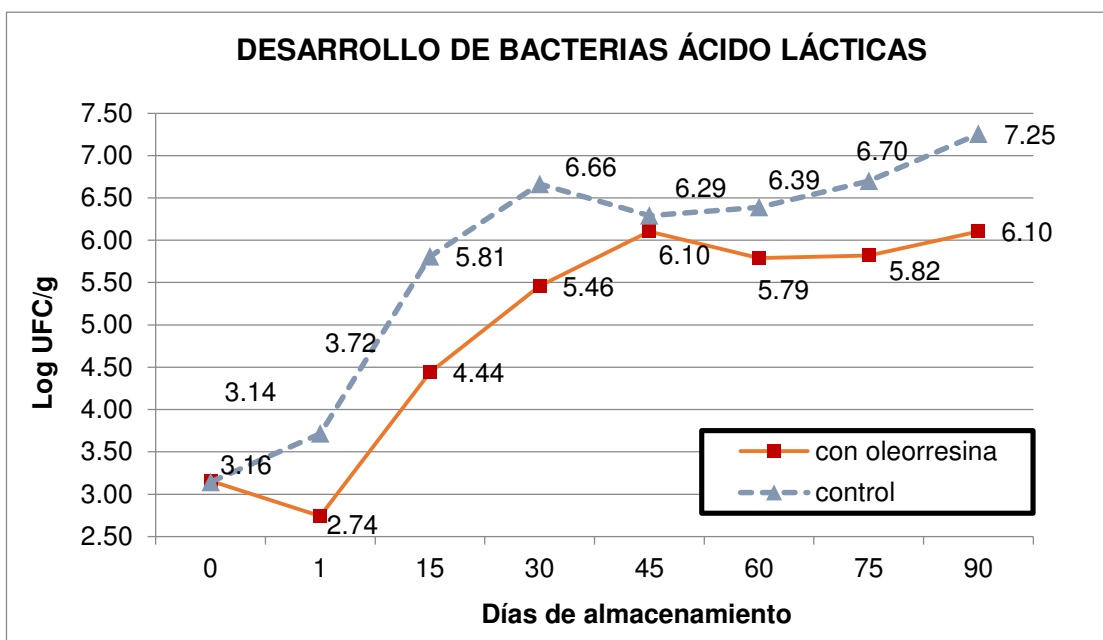


Figura 13. Curvas de desarrollo de bacterias ácido lácticas (log UFC/g)

4.3.5. Efecto sobre el desarrollo de *Brochothrix thermosphacta*

El cuadro 15 muestra los recuentos de *B. thermosphacta* en UFC/g para ambos grupos de carne hasta el día 90 de almacenamiento. Se encontraron diferencias significativas en los días 1 ($p=0.02$) 15 ($p=0.03$), 60 ($p=0.04$), 75 ($p=0.00$) y 90 ($p=0.00$).

Cuadro 15. Recuento de *Brochothrix thermosphacta* (UFC/g)

Día	Con oleoresina (G1)	Control (G2)	D. S.
0	1.36 ± 0.34 log (22.90)	1.56 ± 0.06 log (36.30)	-
1	1.09 ± 0.15 log (12.30)	1.59 ± 0.09 log (38.90)	Sí
15	2.22 ± 0.09 log (165.96)	2.91 ± 0.29 log (812.83)	Sí
30	1.84 ± 0.98 log (69.18)	3.04 ± 1.29 log (1 096.48)	-
45	0.97 ± 0.02 log (9.33)	1.50 ± 0.46 log (31.62)	-
60	1.62 ± 1.07 log (41.69)	3.53 ± 0.34 log (3 388.44)	Sí
75	1.20 ± 0.17 log (15.85)	3.97 ± 0.14 log (9 332.54)	Sí
90	1.49 ± 0.20 log (30.90)	4.09 ± 0.25 log (12 302.69)	Sí

D. S.: diferencia significativa entre G1 y G2 (p<0.05)

La figura 14 muestra las curvas de desarrollo de esta bacteria en ambos grupos de carne durante 90 días de almacenamiento. Se observan recuentos inferiores en G1 en comparación con G2.

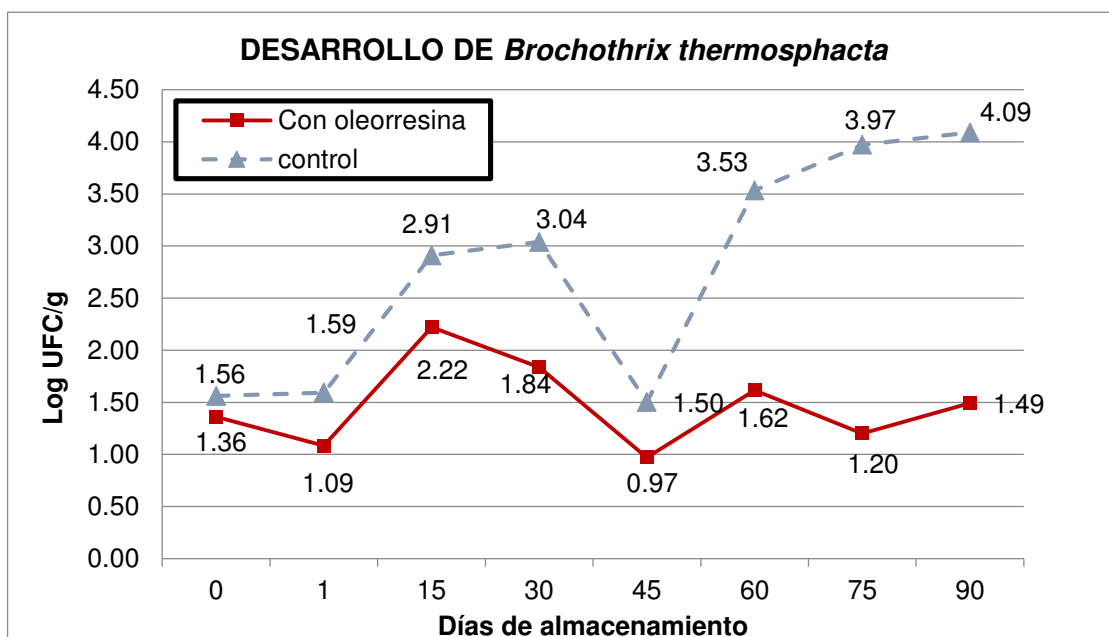


Figura 14. Curvas de desarrollo de *Brochothrix thermosphacta* (log UFC/g)

4.3.6. Interacción entre BAL y *B. thermosphacta*

En la figura 15 se observa que entre los días 15 a 45 de almacenamiento de G1, la población de BAL se incrementa desde 4.44 hasta 6.10 log UFC/g, mientras que *B. thermosphacta* decrece desde 2.22 hasta 0.97 log UFC/g.

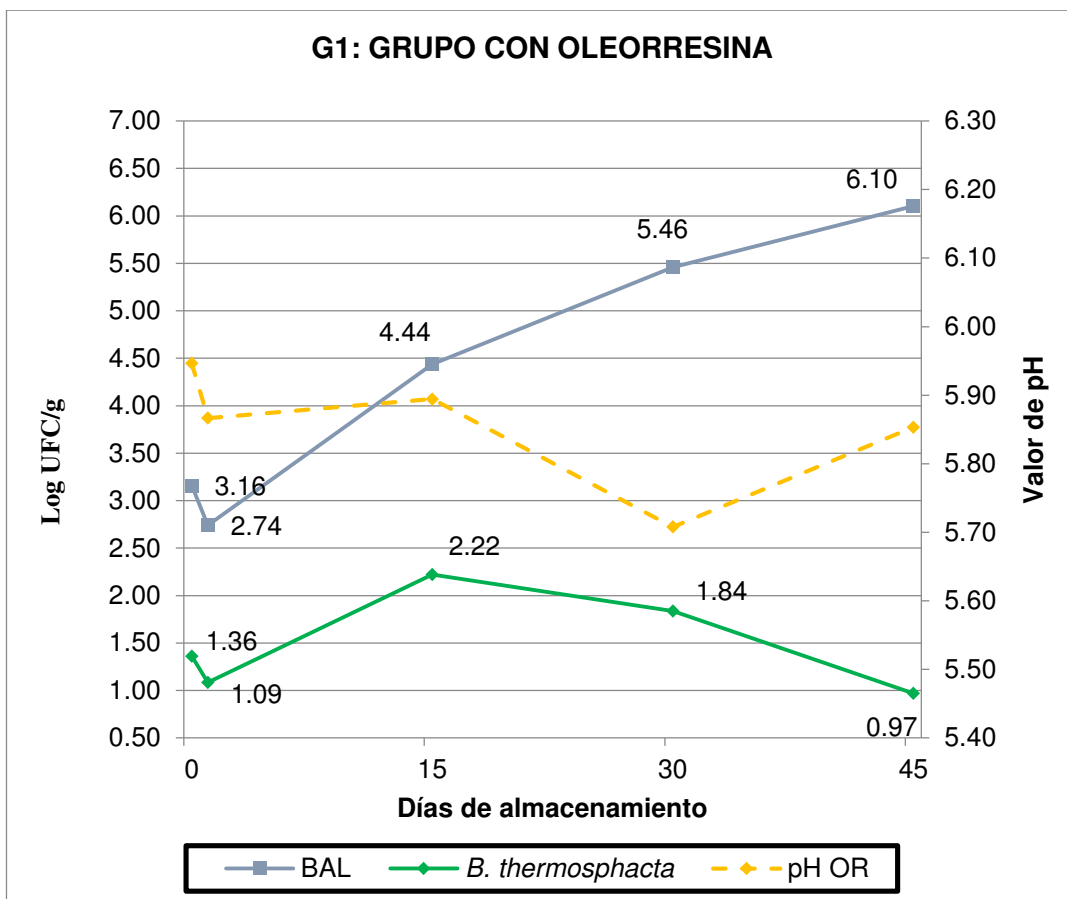


Figura 15. Interacción entre BAL y *B. thermosphacta* en G1

Este efecto no se repite en G2 (figura 16).

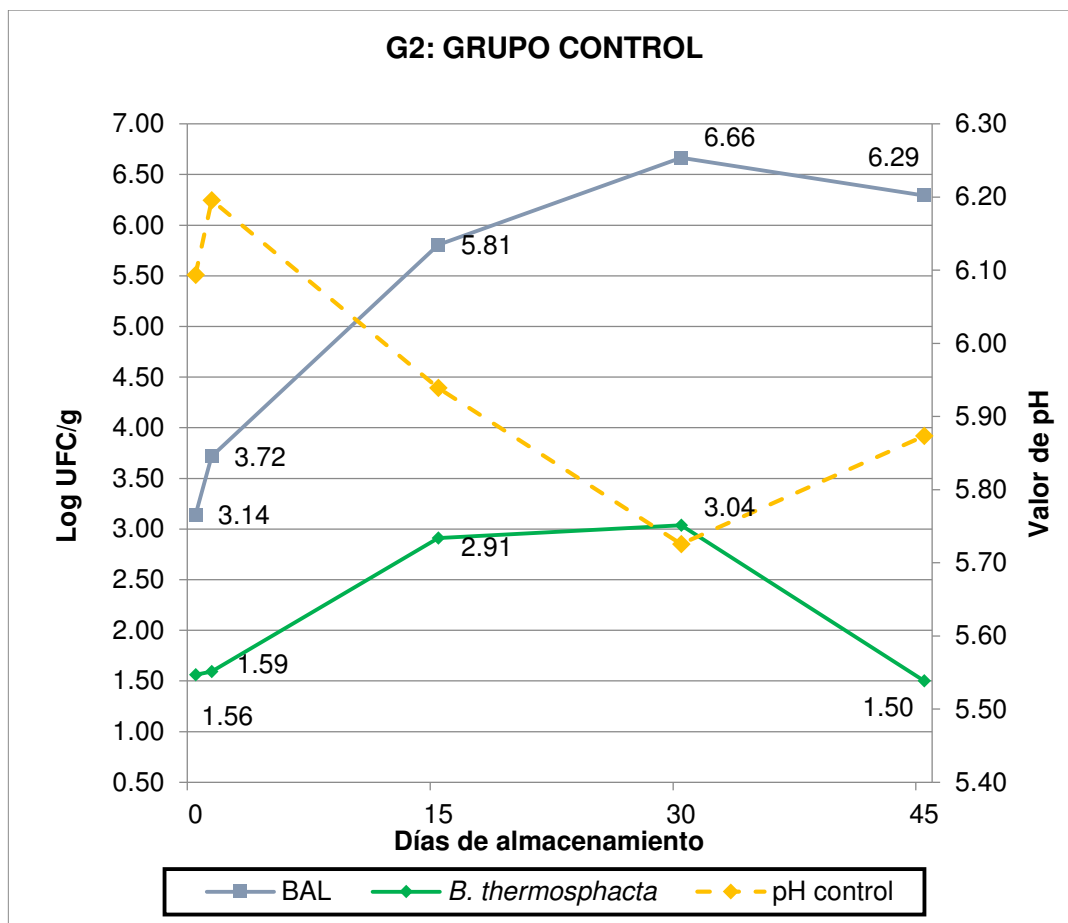


Figura 16. Interacción entre BAL y *B. thermosphacta* en G2

4.3.7. Efecto sobre el pH de la carne

El cuadro 16 muestra el valor de pH de G1 y G2 a lo largo del período de almacenamiento. Se observó diferencia significativa entre el pH de ambos grupos al día 60 de almacenamiento ($p=0.02$).

Cuadro 16. Valores de pH durante el almacenamiento

Día	Con oleorresina (G1)	Control (G2)	D. S.
0	5.95 ± 0.08	6.09 ± 0.17	-
1	5.87 ± 0.18	6.20 ± 0.11	-
15	5.89 ± 0.18	5.94 ± 0.07	-
30	5.71 ± 0.03	5.73 ± 0.15	-
45	5.85 ± 0.10	5.87 ± 0.09	-
60	5.76 ± 0.06	6.58 ± 0.40	Sí
75	6.66 ± 0.02	6.68 ± 0.03	-
90	6.96 ± 0.07	7.05 ± 0.10	-

La figura 17 muestra los valores de pH durante el almacenamiento de ambos grupos de carne durante los 90 días de almacenamiento.

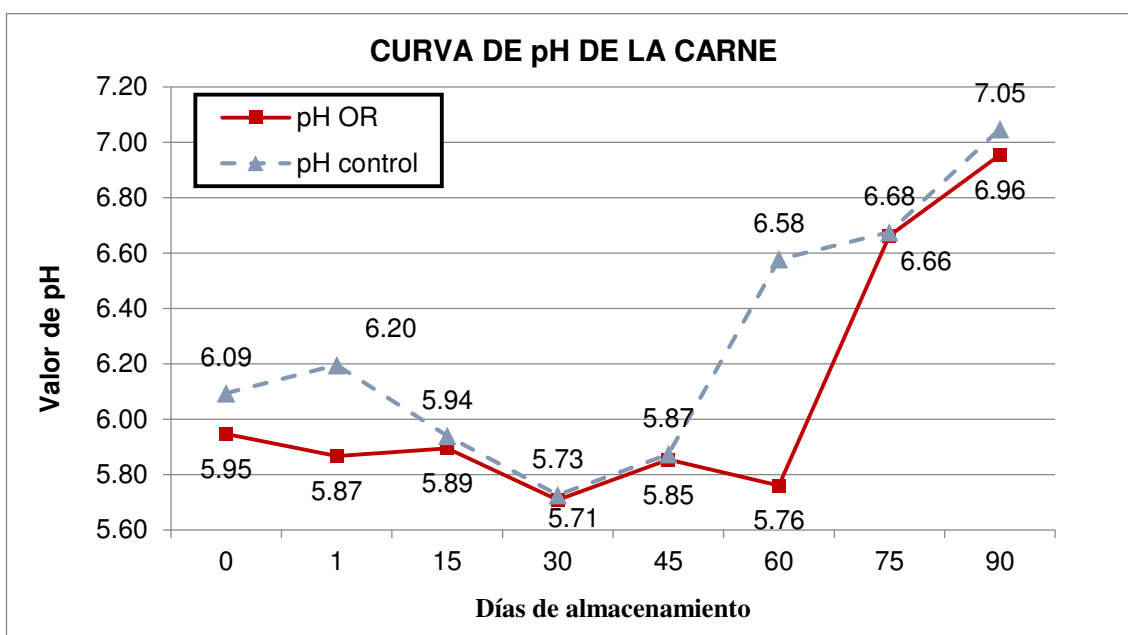


Figura 17. Valores de pH cárnico durante el almacenamiento

El análisis de regresión realizado entre los 60 a 75 días de almacenamiento de G1 ($y = 0.06x + 2.16$; $R^2 = 1$) permitió establecer que la carne mantiene a niveles adecuados hasta el día 70 de almacenamiento, momento aproximado en el que se alcanza el valor máximo de pH = 6.4.

En cambio, el pH en las muestras de G2 se mantiene a niveles aceptables hasta el día 56 de almacenamiento, valor obtenido por análisis de regresión entre los días 45 a 60 de almacenamiento ($y = 0.0473x + 3.74$; $R^2 = 1$).

CONCLUSIONES

- La aplicación de oleoresina de Ají Panca inhibe el desarrollo de AMT, AST, BAL y *B. thermosphacta* en carne de vacuno empacada al vacío y almacenada en refrigeración.
- La aplicación de oleoresina de Ají Panca mantiene el pH de la carne a niveles inferiores en comparación con el grupo control, durante todo el almacenamiento.
- La aplicación de oleoresina de Ají Panca en carne empacada al vacío y almacenada en refrigeración extiende la vida útil hasta 70 días, en comparación con el grupo control, cuya vida útil fue de 56 días.

RECOMENDACIONES

- Ampliar el estudio utilizando dosis inferiores de oleorresina con el fin de establecer la dosis mínima necesaria para obtener un efecto antimicrobiano significativo.
- Realizar la evaluación sensorial del producto para determinar el grado de aceptabilidad por parte de los consumidores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aminzare M., Hashemi M., Hassanzad H., Hejazi J. (2016). The use of herbal extracts and essential oils as a potential antimicrobial in meat and meat products: A review. *Journal of Human, Environment, and Health Promotion*, 1(2), 63-74.
- Anand P., Bley K. (2011). Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *British Journal of Anaesthesia*, 107(4), 490-502.
- Asociación de Exportadores (ADEX). (2015). Perú Exporta, 394: 1-62. 15 diciembre 2016. De ADEX, sitio web: http://www.adexperu.org.pe/images/Publicaciones/RevistaPeruExporta/RevistaPeruExporta_394.pdf
- Aspé E. R., Roeckel M. D., Marti C., Jiménez R. (2008). Envasado de carne de vacuno con hueso y grasa en atmósfera modificada con CO₂ y CO. *Información Tecnológica*, 19(6), 57-69.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1996). Official Method 995.03: Capsaicinoids in Capsicums and their extractives – liquid chromatographic method.
- Ávila H. L. (2006). Introducción a la metodología de la investigación. España. Recuperado de: <http://biblioteca.udgvirtual.udg.mx/eureka/pudgvirtual/introduccion%20a%20la%20metodologia%20de%20la%20investigacion.pdf>
- Baby K., Ranganathan T. (2016). Effect of enzyme pretreatment on yield and quality of fresh green chilli (*Capsicum annuum* L.) oleoresin and its

- major capsaicinoids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 95-191.
- Badr H. (2004). Use of irradiation to control foodborne pathogens and extend the refrigerated market life of rabbit meat. *Meat Science*, 67, 541-548.
- Barbero G. F., Palma M., Barroso C. (2006). Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction-high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 578, 227-233.
- Bautista M., Reyna L., Bravo M., Cornejo O., Huamán J., Guerrero M. (2008). Extracción de oleorresinas de la Páprika (*Capsicum annum* L.) en unidad piloto. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 11(1), 54-57.
- Bender. (1992). Chapter 2: Role of meat and meat products in human nutrition. En: *Meat and meat products in human nutrition in developing countries*. 28 de diciembre de 2016. De FAO, sitio web: <http://www.fao.org/docrep/t0562e/T0562E00.htm#Contents>
- Bleasel N., Tate B., Rademaker M. (2002). Allergic contact dermatitis following exposure to essential oils. *Australian Journal of Dermatology*, 43, 211-213.
- Boonkird S., Phisalaphong C., Phisalapong M. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from *Capsicum frutescens* on a lab- and pilot-plant scale. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 1075-1079.
- Bosland P. W. (1996). Capsicums: Innovative uses of an ancient crop (479-487). En: J Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA. Recuperado de: <https://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1996/V3-479.html>
- Bosland P. W., Votava E. J. (2000). Peppers: Vegetable and spice *Capsicums*. *Crop Production Science in Horticulture* 12 (230 p.). Reino Unido: CABI Publishing.

- Brewer M. S. (2004). Irradiation effects on meat color – a review. *Meat Science*, 68, 1-17.
- Brewer M. S. (2009). Irradiation effects on meat flavor: A review. *Meat Science*, 81, 1-14.
- Brul S., Coote P. (1999). Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1-17.
- Caldas A. P. (2012). Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido-líquido. Tesis de Ingeniería Química. Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Cárdenas F., Gianuzzi L. (2005). Influencia del envasado en la flora cárnica. *La industria Cárnica Latinoamericana*, 25(137), 40-45.
- Careaga M., Fernández E., Dorantes L., Mota L., Jaramillo M. E., Hernández-Sánchez H. (2003). Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 83(3), 331-335.
- Casanova-Ortiz J. S., Yah-Nahuat P. N., Bacab-Cocom R. R., Briceño-Domínguez D. R., Cruz-Santander I. (2015). Extracción de capsaicina asistida por ultrasonidos en chile habanero fresco. Aportaciones al estudio de las ciencias biotecnológicas y alimentarias, 1ª edición, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México, pp 298-304.
- Caterina M. J., Leffler A., Malmberg A. B., Martin W. J., Trafton J., Petersen-Zeitz K. R., Koltzenburg M., Basdaum A. I., Julius D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288, 306-313.
- Cázares-Sánchez E., Ramírez P., Castillo F., Soto R. M., Rodríguez M. T., Chávez J. L. (2005). Capsaicinoides y preferencia de uso en diferentes morfotipos de Chile (*Capsicum annum* L.) del centro-oriente de Yucatán. *Agrociencia*, 39(6), 627-638.

- Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (CENAN). (2009). Tablas peruanas de composición de alimentos. Perú.
- Cerón-Carrillo T., Munguía-Pérez R., García S., Santiesteban-López N. A. (2014). Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de chile (*Capsicum*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(2), 213-221.
- Chivandi, Dangarembizi, Nyakudya y Erlwanger. (2016). Chapter 8 – Use of Essential Oils as a Preservative of Meat. En: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (85-91). Reino Unido: Elsevier.
- Colivet J., Belloso G., Hurtado E. (2006). Comparación del efecto inhibidor de extractos de Ají dulce (*Capsicum chinense*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* *Saber*, 18(2), 168-173.
- Cooksey K. (2005). Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. *Food Additives and Contaminants*, 22(10), 980-987.
- Csiklusnádi G. A., Forgács E., Cserhádi T., Mota T., Morais H., Ramos A. (2000). Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annum* L.) powders. *Journal of Chromatography A*, 889, 41-49.
- Deepa N., Kaur C., George B., Singh B., Kapoor H. C. (2007). Antioxidant constituents in some sweet peppers (*Capsicum annum* L.) genotypes during maturity. *LWT – Food Science and Technology*, 40, 121-129.
- Delgado V. L., Quartino L. (2013). Evaluación de la calidad microbiológica de cortes bovinos envasado al vacío y mantenidos a temperatura de refrigeración. Tesis de Doctorado. Universidad de la República. Uruguay.
- DeWitt D., Bosland P. W. (2009). *The complete chile pepper book: A gardener's guide of choosing, growing, preserving and cooking* (336 p). Londres: Timber Press.
- Dorantes L., Colmenero R., Hernández H., Mota L., Jaramillo M. E., Fernández E., Solano C. (2000). Inhibition of growth of some

- foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annuum* extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 125-128.
- Eskin N., Shahidi F. (2013). Meat and Fish. En: *Biochemistry of Foods* (127-185). Reino Unido: Elsevier.
- Esquível M., Bernardo-Gil M. G. (1993). El uso de fluidos supercríticos en la industria de aceites alimentarios. *Grasas y Aceites*, 44(1), 1-5.
- Farkas J. (1998). Irradiation as a method for decontaminating food: A review. *International Journal of Microbiology*, 44, 189-204.
- Fernández G. (2007). Extracción, análisis, estabilidad y síntesis de capsaicinoides. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz. España. 288 p.
- Fernández-Trujillo J. (2008). Extracción con CO₂ supercrítico de oleorresina y otras fracciones de pimentón dulce y picante. *Grasas y Aceites*, 59(1), 7-15.
- Forrest J. (1975). *Fundamentos de ciencia de la carne*. España: Acribia. 365 p.
- Gamarra N., Bontemps I., Coronel E., Velásquez S., Granza S. (2011). Extracción por fluido supercrítico de CO₂ y cuantificación de capsaicinoides de rocoto (*Capsicum pubescens*) del valle del Mantaro. *Prospectiva Universitaria*, 8(1), 11-17.
- Gardner G. (1966). A selective medium for the enumeration of *Microbacterium thermosphactum* in meat and meat products. *Journal of Applied Microbiology*, 29(3), 455-460.
- Giraldo F. J., Gil M. A., Alzate L. M., Restrepo A. M., Millan L., Ordoñez A. F., Restrepo C. E. (2009) Comparación de métodos de extracción de oleorresina de páprika (*Capsicum annuum* L.) convencionales con una metodología amigable al medio ambiente. *Producción + Limpia*, 4(1), 17-26.
- Greene B. E., Hsin L-M., Zipser M. W. (1971). Retardation of oxidative color changes in raw ground beef. *Journal of Food Science*, 36, 940-942.

- Guevara J. C. (2010). Empacado de Alimentos. México: Trillas. 256 p.
- Gutiérrez A. A. (2014). Efecto antimicrobiano del Ají Panca (*Capsicum chinense*) en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* durante el almacenamiento de chorizo fresco. Tesis de Ingeniero Alimentario. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú. 173 p.
- Gutiérrez J.; Barry-Ryan C.; Bourke P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26, 142-150.
- Hall P., Ledenbach L., Flowers R. (2001). Acid-producing microorganisms. En: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (201-207). Estados Unidos: American Public Health Association.
- Huie C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal Bioanal Chem*, 373, 23-30.
- Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual (INDECOPI). (1977). Norma Técnica Peruana 201.001: Requisitos de las carnes rojas. Perú.
- Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN). Portal web: <http://www.ipen.gob.pe/index.php/ipen/infraestructura/planta-de-irradiacion-multiusos>
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (2000). Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológico. Volumen I. España: Acribia. 431 p.
- Juven B. J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 626-631.

- Kahl R., Kappus H. (1993). Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Z Lebensm Unters Forsch*, 196(4), 329-338.
- Kamenik J. (2013). The microbiology of meat spoilage: a review. Recuperado de: <http://www.maso-international.cz/wp-content/uploads/2013/08/maso-international-2013-1-page-003-010.pdf>
- Kampelmacher E. H. (1983). Irradiation for control of *Salmonella* and other pathogens in poultry and fresh meats. *Food Technology*, 37, 117-119, 169.
- Kerry J. P., O'Grady M. N., Hogan S. A. (2006). Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, 74, 113-130.
- León J. (2000). Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. Editorial Agroamérica. San José, Costa Rica. 525 p.
- Llenque L., Otiniano R., Otinano L. (2013). Supervivencia de *Staphylococcus aureus* em crema huancaína preparada con diferentes concentraciones de *Capsicum annum* var. Longum "Ají escabeche". *Ciencia y Tecnología*, 9(3), 9-19.
- López L. A. (2004). Actividad aminopeptidásica ligada a membrana de bacterias gram negativas: Prueba de la P-nitroanilina para la estimación de la carga bacteriana de carne picada. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España.
- López L., Braña D., Hernández I. (2013). Estimación de la vida en anaquel de la carne. Recuperado de: http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/4131/FISIO_010106304500050127.pdf;sequence=1
- Lövenklev M., Artin I, Hagberg O., Borch E., Holst E., Radström R. (2004). Quantitative interaction effects of carbon dioxide, sodium chloride, and sodium nitrite on neurotoxin gene expression in nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2928-2934.

- Mahmmoud Y. (2008). Capsaicin stimulates uncoupled ATP hydrolysis by the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21418-21426.
- Mancini R. A., Hunt M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71, 100-121.
- Mateauda J. (2013). Estudio de la microflora bacteriana y cambios fisicoquímicos en carne bovina envasada al vacío y almacenada en frío. Tesis de Licenciatura. Universidad de la República. Uruguay. 61 p.
- Matsufuji H., Nakamura H., Chino M., Takeda M. (1998). Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3468-3472.
- Ministerio de Salud (MINSA). (2008). Norma sanitaria N° 071 que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Perú.
- Mohebi E., Marquez L. (2015). Intelligent packaging in meat industry: An overview of existing solutions. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 3947-3964.
- Moreno B. (1991). Capítulo 9: Posibilidades teóricas y reales de descontaminación de la carne. En: Higiene e Inspección de carnes. Volumen I (135-155). España.
- Mossel D. A. A. (1971). Physiological and metabolic attributes of microbial groups associated with foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 34, 95-118.
- Mulder R. W. A .W. (1984). Ionising energy treatment of poultry. *Food Technology in Australia*, 36, 418-420.
- Nascimento P. L. A., Nascimento T. C. E. S., Ramos N. S. M., Silva G. R., Galindo J. E., Falcao R. E. A., Moreira K. A., Porto A. L. F., Silva T. M. S. (2014). Quantification, antioxidant and antimicrobial activity of

phenolics isolated from different extracts of *Capsicum frutescens* (Pimenta malagueta). *Molecules*, 19, 5434-5447.

Nissen H., Sorheim O., y Dainty R. (1996). Effects of vacuum, modified atmospheres and storage of packaged beef. *Food Microbiology*, 13, 183-191.

Nowak A., Czyzowska A. (2011). In vitro synthesis of biogenic amines by *Brochothrix thermosphacta* isolates from meat and meat products and the influence of other microorganisms. *Meat Science*, 88, 571-574.

International Organization for Standardization (ISO) (1999). Meat and meat products – Measurement of pH – Reference method 2917.

Nychas G. J. E., Skandamis P. N., Tassou C. C., Koutsoumanis K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78, 77-89.

Olaoye O., Onilude A., Ubbor S. (2015). Control of *Brochothrix thermosphacta* in pork meat using *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* l23 isolated from beef. *Applied Food Biotechnology*, 2(3), 49-55.

Ordóñez J., Cambero M., Fernández L., García M., García G. De la Hoz L., Selgas M. (1999). Tecnología de los Alimentos. Vol II – Alimentos de origen animal. España: Síntesis. 366 p.

Ozdemir M., Floros J. (2004). Active food packaging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 185-193.

Pacho-Carrillo J. D., Domínguez-Espinosa R. M., Cantón C. G., Ponsich A., Turner R., Manzanilla G., Poot C. (2002). Diseño conceptual de una planta de extracción de oleorresinas: *Capsicum* y capsaicina a partir de chile habanero (*Capsicum chinense*) usando CO₂ supercrítico. *Tecnología, Ciencia y Educación*, 17(2), 95-103.

Pavlovic R., Mladenovic J., Radovanovic B., Acamovic-Dokovic G., Zdravkovic J., Zdravkovic M. (2012). Phenolic compounds and biological activity of *Capsicum annuum* L. *African Journal of Biotechnology*, 11(45), 10446-10450.

- Pennacchia C., Ercolini D., Villani F. (2011). Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiology*, 28, 84-93.
- Pérez-Campos S. J., Chavarría-Hernández N., Alfaro-Rodríguez R. H., Rodríguez-Hernández A. I. (2016). Ultrasonido: Tecnología emergente en la extracción de biomoléculas de interés para la industria de alimentos y farmacéutica. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, 2(3), Recuperada de: <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/icap/article/view/998/996>
- Quesada J., Sendra E., Navarro C., Sayas-Barberá E. (2016). Antimicrobial active packaging including chitosan films with *Thymus vulgaris* L. essential oil for ready-to-eat meat. *Foods*, 5(3), 57.
- Restrepo M. (2007). Oleorresinas de *Capsicum* en la industria alimentaria. *Revista Lasallista de Investigación*, 3(2), 43-47.
- Rigon A., Leonardi B., Miron D., Schapoval E., Rodrigues J., Gosmann G. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 139, 228-233.
- Rodríguez L., Arango J., Urrego F. (2000). Obtención de oleorresinas a partir de tres especies de *Capsicum sp.* cultivadas en Colombia (*Capsicum annum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*). Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. Recuperado de: <http://avalon.utadeo.edu.co/dependencias/publicaciones/alimentica3/oleorresinas.pdf>
- Russo F., Ercolini D., Mauriello G., Villani F. (2006). Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other spoilage microbial groups. *Food Microbiology*, 23, 797-802.
- Salamanca M., Sánchez M. (2009). Extracción y caracterización de la oleorresina de orégano (*Origanum vulgare*). Tesis de grado. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 94 p.

- Salgado-Román M., Botello-Álvarez E., Rico-Martínez R., Jiménez-Islas H. (2008). Enzymatic treatment to improve extraction of capsaicinoids and carotenoids from Chili (*Capsicum annuum*) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10012-10018.
- Santamaría R. I., Reyes-Duarte M. D., Bárzana E., Fernando D, Gama F. M., Mota M., López-Munguía A. (2000). Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from Chili Guajillo Puya (*Capsicum annuum* L.) using ethanol as solvent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3063-3067.
- Scetar M., Kurek M., Galic K. (2010). Trends in meat and meat products packaging – a review. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 2(1), 32-48.
- Serrano E, Humada M., Maestro M. (2012). Manejo Pre y Post Sacrificio: Influencia sobre la calidad de la carne de vacuno. Centro de investigación y Formación Agrarias. Gobierno de Cantabria. Recuperado de: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/164-carne_con_seguridad.pdf
- Sethuraman R. (1997). Supercritical fluid extraction of capsaicinoids from peppers. Tesis de Doctorado. Texas Tech University. Estados Unidos. 128 p.
- Sharma S., Jain S., Nair G. Ramachandran S. (2013). *Capsicum annuum* enhances L-lactate production by *Lactobacillus acidophilus*: implication in curd formation. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4142-4148.
- Shayan S., Saeidi S. (2013). Antibacterial and antibiofilm activities of extract *Capsicum annuum* L on the growth and biofilm formation of common pathogenic strains. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 5(4), 513-518.
- Signorini M. (2007). Microbiología de carnes envasadas al vacío y la biopreservación como medio para prolongar la vida en anaquel. *Nacameh*, 1(1), 26-40.

- Sikkema J., De Bont J. A. M., Poolman B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59(2), 201-222.
- Skandamis P. N., Nychas G. J. E. (2002). Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 35-45.
- Sociedad Peruana de Gastronomía (APEGA), Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) y Universidad San Martín de Porres (USMP). (2009). Ajíes peruanos. Sazón para el mundo. 62 p. Perú. 19 de noviembre de 2016. De UNALM, sitio web: <http://www.lamolina.edu.pe/hortalizas/webdocs/ajiesdelPeru.pdf>
- Soetarno S., Sukrasno S., Yulinah E., Sylvia T. (1997). Antimicrobial activities of the ethanol extracts of *Capsicum* fruits with different level of pungency. *Journal Matematika dan Sains*, 2, 57-63.
- Sorheim O., Nissen H., Nesbakken T. (1999). The storage life of beef and pork packaged in a modified atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide. *Meat Science*, 52, 157-164.
- Soumya S., Nair B. (2012). Antifungal efficacy of *Capsicum frutescens* L. extracts against some prevalent fungal strains associated with groundnut storage. *Journal of Agricultural Technology*, 8(2), 739-750.
- Stoica R-M., Moscovici M., Tomulescu C., Babeanu N. (2016). Extraction and analytical methods of capsaicinoids – A review. *Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies*, XX, 93-98.
- Strasburg G., Xiong Y., Chiang W. (2008). Physiology and chemistry of edible muscle tissues. En: Fennema's Food Chemistry (923-973). Estados Unidos: Taylor & Francis Group.
- Tewksbury J. J., Mancheño C., Haak D. C., Levey D. J. (2006). Where did the chili get its spice? Biogeography of capsaicinoid production in ancestral wild chili species. *Journal of Chemical Ecology*, 32(3), 547-564.

- Thornley M. J., Ingram M & Barnes E. M. (1960). The effects of antibiotics and irradiation on the *Pseudomonas-Achromobacter* flora of chilled poultry. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 487-498.
- Vásquez-Flota F., Miranda-Ham M. L., Monforte-González M., Gutiérrez-Carbajal G., Velázquez-García C., Nieto-Pelayo Y. (2007). La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(4), 353-360.
- Veillet S., Tomao V., Chemat F. (2010). Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatization of olive oil with basil. *Food Chemistry*, 123(3), 905-911.
- Velasco R. J., Villada H. S. Carrera J. E. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1), 53-56.
- Yadav A. S.; Singh R. P. (2004). Natural preservatives in poultry meat products. *Natural Product Radiance*, 3(4), 300-303.
- Zhou G. H., Xu X. L., Liu Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science*, 86, 119 – 128.

ANEXOS

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CAPSAICINA Y DIHIDROCAPSAICINA

Los experimentos se llevan a cabo en un cromatógrafo líquido de alta presión marca Elite La Chrom, bomba Elite La Chrom L-2130 pump, detector de arreglo de diodos L-2455.

Columna utilizada fue un Purospher® STAR RP-18 endcapped (5 µm) LiChroCART® 250 x 4.6 mm.

Método isocrático de 50/50 con dos solventes: Agua acidificada (0.1 % ácido fórmico, solvente A) and Acetonitrilo (solvente B), flujo de 1.5 ml/min. Temperatura de columna se mantuvo constante a 27 °C. La longitud de onda empleada fue de 278 nm; volumen de inyección es de 20 µl.

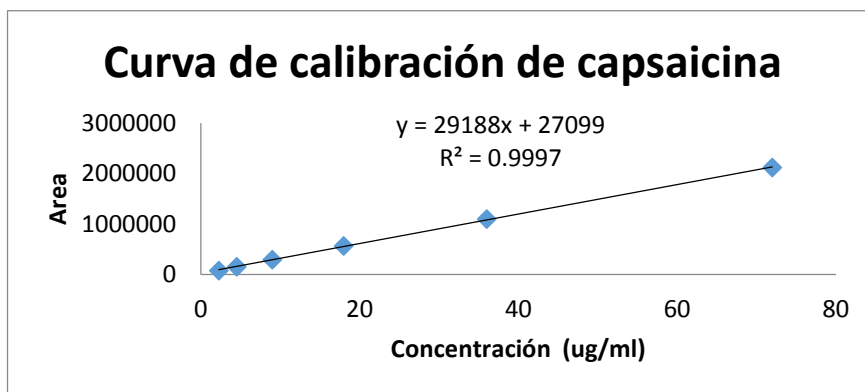
La bibliografía modificada fue Internacional **Food Research Journal**, **2012,19(3),1217-1226**.

Como patrón estándar se empleó una curva de calibración de capsaicina en rango de 2- 72 µg/mL.

Tabla de curva de calibración capsaicina

Concentración capsaicina (µg/ml)	Área			Promedio de área
2.25	77621	80162	78757	78846.67
4.5	153349	152364	153279	152997.33
9	291679	290613	291042	291111.33
18	559897	563734	565056	562895.67
36	1098352	1097700	1095418	1097156.67
72	2124294	2119617	2107164	2117025

Gráfica de curva de calibración de capsaicina

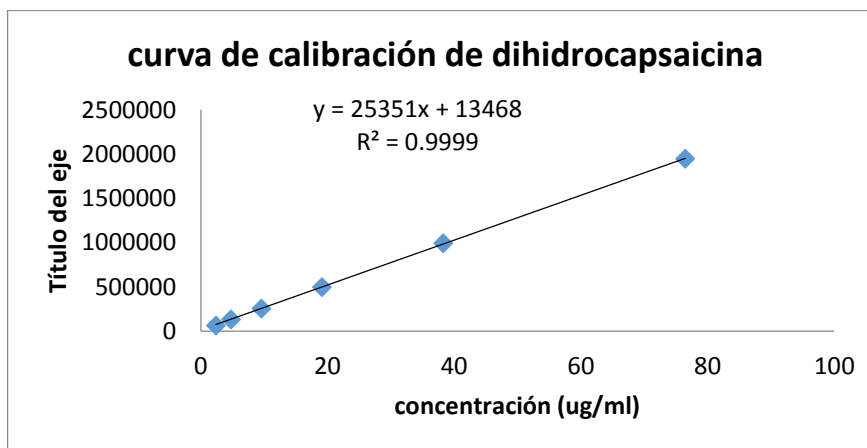


Como patrón estándar se empleó una curva de calibración de dihidrocapsaicina en rango de 2- 77 µg/mL.

Tabla de curva de calibración dihidrocapsaicina

Concentración µg/ml	Área			Promedio de área
2.39	68875	64907	65849	66543.67
4.78	135996	134369	132967	134444
9.56	257165	255135	255736	256012
19.13	500068	498065	501845	499992.67
38.25	972996	1007776	1005461	995411
76.5	1950697	1946805	1942064	1946522

Gráfica de curva de calibración de dihidrocapsaicina



104,2 mg de extracto se disolvió en 10 ml de metanol e inyectó directamente.

Resultados

- Contenido de Capsaisina fue 1.39 mg de capsaicina/g de extracto etanólico.
- Contenido de Dihidrocapsaisina fue 0.54 mg de dihidrocapsaicina/g de extracto etanólico