

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

**GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**“ALTERNATIVAS AL USO DE SULFITOS EN PRODUCTOS  
CÁRNICOS FRESCOS”**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Diciembre 2016**

Autor: Cristian Ruiz García

Tutora: M<sup>a</sup> Estrella Sayas Barberá



## **Título Trabajo Fin de Grado**

Alternativas al uso de sulfitos en productos cárnicos frescos.

Alternatives to the use of sulfites in fresh meat products.

## **Resumen Trabajo Fin de Grado**

Actualmente los consumidores demandan productos cárnicos libres de aditivos sintéticos. En el caso de ciertos preparados cárnicos (longanizas frescas y Burger meat), el uso de aditivos, como los sulfitos están autorizados, en una dosis máxima de 450 ppm expresado en SO<sub>2</sub>. Su uso lleva grandes controversias, ya que puede enmascarar la baja calidad sanitaria de los productos e incluso puede conllevar reacciones adversas a determinados grupos de población. El objetivo de este estudio fue utilizar aceites esenciales como una alternativa viable al uso de sulfitos en productos cárnicos frescos. Desde el punto de vista microbiológico, el aceite esencial de orégano puede ser utilizado como sustituto de los sulfitos, en preparados cárnicos, ya que reduce los recuentos, y puede actuar mejorando algunas características organolépticas como el color y el olor durante el tiempo de almacenamiento.

Currently consumers demand meat products without the use of synthetic additives. In the case of fresh meat products, the use of additives such as sulfites is authorized, in a maximum dose of 450 ppm as SO<sub>2</sub>. Its use carries great controversy because it can mask the low health quality of products and can even lead to adverse reactions specific population groups. The aim of this study was to use essential oils as a viable alternative to the use of sulfites on fresh meat products. The essential oil of oregano can be used as a substitute for sulphites in the meat conservation, since it reduces the counts, and can act to improve some organoleptic characteristics such as color and odor during the storage time.

## **Palabras clave**

Productos cárnicos frescos, Sulfitos, Aceites esenciales

Fresh meat products, Sulphites, Essential oils

## **Autor del Trabajo Fin de Grado**

Alumno: D. Cristian Ruiz García

## **Tutor académico**

Prof. Dña. M<sup>a</sup> Estrella Sayas Barberá

Orihuela, Diciembre de 2016

## ÍNDICE DE LA MEMORIA

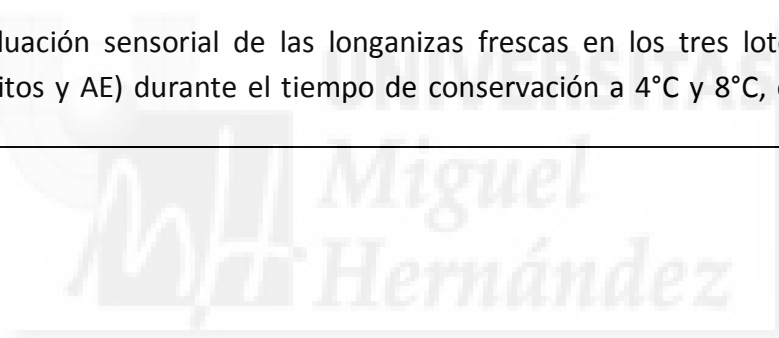
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Alteración de los productos cárnicos frescos (preparados cárnicos)	1
1.2. Conservantes en la industria alimentaria cárnica: Los sulfitos	3
1.2.1. Características de los sulfitos	4
1.2.2. Legislación	5
1.2.3. Actividad antimicrobiana y antioxidante de los sulfitos	5
1.2.4. Problemática del uso de sulfitos	9
1.3. Alternativa al uso de conservantes en la industria cárnica	11
1.3.1. Aceites esenciales	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo general	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Diseño del experimento	15
3.2. Optimización de la incorporación de AE de orégano durante el procesado y determinación de su concentración	16
3.3. Elaboración de las longanizas frescas	17
3.4. Análisis fisicoquímico	20
3.5. Análisis microbiológico	20
3.6. Análisis sensorial	20
3.7. Análisis estadístico	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Evolución del pH en longanizas en los distintos lotes durante su almacenamiento en refrigeración.	23
4.2. Evolución de los parametros del color en los distintos lotes de longanizas durante su almacenamiento en refrigeración.	25
4.3. Evolución de las poblaciones microbianas en longanizas frescas durante su almacenamiento en refrigeración.	28
4.4. Evolución de las propiedades sensoriales en las longanizas frescas elaboradas durante su almacenamiento en refrigeración.	31
5. CONCLUSIÓN	35
6. BIBLIOGRAFÍA	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Derivados cárnicos	1
Figura 2: Cambios en el estado químico de la mioglobina	9
Figura 3: Diagrama de flujo de la elaboración de las longanizas	18
Figura 4: Calendario de muestreo	19
Figura 5: Hoja de cata presentada al panel de expertos para el análisis sensorial de las muestras de longanizas frescas	21
Figura 6: Evolución de pH en los tres lotes de longanizas frescas elaborados (control, sulfitos y AE) durante su conservación a 4°C (a) y 8°C	24
Figura 7: Evolución de la Luminosidad (L*) en los tres lotes de longanizas frescas elaborados (control, sulfitos y AE) durante su conservación a 4°C (a) y 8°C (b)	26
Figura 8: Evolución de la coordenada a* en los tres lotes de longanizas frescas elaborados (control, sulfitos y AE) durante su conservación a 4°C (a) y 8°C (b)	27
Figura 9: Evolución de las bacterias aerobias mesófilas (BAM) en los tres lotes de longanizas frescas elaborados (control, sulfitos y AE) durante su conservación a 4°C (a) y 8°C (b)	28
Figura 10: Evolución de las bacterias ácido lácticas (BAL) en los tres lotes de longanizas frescas elaborados (control, sulfitos y AE) durante su conservación a 4°C (a) y 8°C (b)	29

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Sulfitos aprobados por la Unión Europea para el uso en productos alimenticios _____	4
Tabla 2: Acción de inhibición del ácido sórbico, ácido benzoico y de los sulfitos _____	6
Tabla 3: Materias primas y cantidades necesarias para la elaboración de las longanizas _____	17
Tabla 4: Resultados del análisis estadístico (ANOVA y Test Tukey) para los parámetros fisicoquímicos estudiados (pH y CIEL*a*b*) considerando los factores formulación (control, sulfitos y AE), temperatura (4 y 8°C) y tiempo de conservación (0, 48, 96 y 168 horas) _____	23
Tabla 5: Valores medios de los parámetros de color en los tres lotes de longanizas frescas elaborados (control, sulfitos y AE) durante el tiempo de conservación a 4°C y 8°C _____	25
Tabla 6: Evaluación sensorial de las longanizas frescas en los tres lotes elaborados (control, sulfitos y AE) durante el tiempo de conservación a 4°C y 8°C, en crudo y en cocinado _____	31



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Alteración de los productos cárnicos frescos (preparados cárnicos)

Según el Reglamento 853/2004, define a los preparados de carne a la carne fresca, incluida la carne que ha sido troceada, a la que se han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos, o que ha sido sometida a transformaciones que no bastan para alterar la estructura interna de la fibra muscular ni, por lo tanto, para eliminar las características de la carne fresca. Estos productos se han elaborado durante muchos años y tiene una posición bien establecida en el mercado.

Dentro de los preparados de carne podemos encontrar dos grandes grupos: los preparados cárnicos frescos (antes llamados productos cárnicos frescos) y los preparados cárnicos crudos-adobados (antes los productos cárnicos crudos-adobados).

Entre los preparados cárnicos frescos se encuentra productos como chorizo fresco, chistorra fresca, salchicha fresca, longaniza fresca, butifarra fresca, hamburguesas y burger meat (figura 1). En el etiquetado de estos productos deberá incluir las recomendaciones del fabricante en cuanto a temperatura de conservación durante la comercialización del producto, para garantizar su mantenimiento como producto fresco durante la vida útil del mismo.



**Figura 1.** Derivados cárnicos

Los preparados cárnicos son productos altamente perecederos, en donde la refrigeración, el envasado o la adición de aditivos autorizados son los únicos métodos de conservación aplicados. Por sus características, su vida útil es bastante limitada a causa de procesos de deterioro, como son las alteraciones microbianas o por fenómenos de oxidación, entre otras, en la que además son productos de fácil contaminación (Sánchez-Escalante et al., 2008), además hay que tener especial cuidado durante todas las operaciones de procesado.

Para prolongar la vida útil de los alimentos, se puede adicionar conservantes que los protegen frente al deterioro (REAL DECRETO 142/2002). Entre los aditivos más

ampliamente utilizados en derivados cárnicos frescos, se encuentran los sulfitos, autorizados exclusivamente a breakfast sausages, longaniza fresca, burger meat y butifarra fresca (Reglamento 853/2004). Sin embargo, el uso de sulfitos se encuentra muy regulado con dosis máximas permitidas, debido a que este tipo de aditivo sintético es un alérgeno para determinados consumidores, y si no se respeta la cantidad máxima recomendada pueden llegar a producir reacciones adversas en ellos. Por otro lado, durante los últimos años, se han intensificado los controles para poder garantizar la seguridad alimentaria ya que en determinadas ocasiones no es cierto todo lo que el etiquetado enuncia, ni tampoco lo que se consume cumple con los requisitos de inocuidad (Berruezo et al., 2015).

Los productos cárnicos frescos, a menudo tienen una carga de microorganismos elevada, por lo que son menos estables que los productos procesados, ya que estos últimos se someten a otras etapas que afectan a la carga microbiana inicial, como son el tratamiento térmico, secado, fermentación, ahumado y nitrificación, los cuales inhiben el desarrollo microbiano (Sánchez-Escalante et al., 2008).

La alteración microbiana de los productos cárnicos frescos es un hecho a tener en cuenta, y las medidas de higiene deben tomarse durante todo el proceso (higiene de materiales, equipos y personal). La refrigeración es el factor más importante que limita este crecimiento, por lo que la cadena de frío debe ser mantenida durante las distintas etapas de elaboración y durante su almacenamiento. Los productos cárnicos frescos se deben distribuir y almacenar a una temperatura que va desde 0-4°C, hasta el momento de su consumo para asegurar su calidad microbiológica (Gombau-Escuin y Palomares Hidalgo, 2012), lo que les aporta una vida útil entre 3-7 días, según el producto y carga microbiana inicial. Durante la venta de dichos productos pueden producirse variaciones de temperatura que pueden provocar una alteración de los productos y por tanto, una pérdida de calidad. Las variaciones de temperatura entre 1-2°C pueden ser bastante críticas en el producto y en su vida comercial. En algunos estudios, se ha encontrado que estos tipos de productos tienen unos recuentos de población microbiana más altos de lo normal. Además, estos problemas pueden derivar de un manejo inadecuado antes del procesado o de una posible contaminación durante la manipulación de la carne (Varnam y Sutherland, 1998).

La Organización de Consumidores y Usuarios (OCU), realizó un estudio sobre la calidad de la carne picada de vacuno, en la que se analizó su contenido en agua, grasa y otros componentes, además de la existencia de bacterias y la presencia de otros tipos de carnes (ave, caballo...) en niveles superiores a los permitidos por la Ley. Los resultados obtenidos mostraron que prácticamente todos los productos analizados incorporaban sulfitos en exceso, esto conseguía mejorar el aspecto de dichos productos, la presencia



de mezclas de varios tipos de carnes, resultando en productos de baja calidad (OCU, 2016).

Un problema fundamental de los productos cárnicos frescos es la estabilidad del color, el consumidor exige un producto rojo y no pardo. El pardeamiento puede deberse a una oxidación química o microbiológica. La oxidación química, dependiente de la temperatura y del oxígeno, y puede ser controlado por la presencia de sustancias reductoras (ácido ascórbico o sus sales). La estabilidad del color es uno de los atributos más importantes de calidad que indican una buena conservación de la carne y de los productos cárnicos, en especial aquellos expuestos en vitrinas expositoras iluminadas (Pérez-Álvarez, 2006).

El enranciamiento de los alimentos es otro de los factores que causa pérdida de calidad en el producto y cambios organolépticos, como sabor, olor y pérdida de valor nutricional (Frankel, 1984), y afecta especialmente a los alimentos almacenados, y en el caso de los productos cárnicos, aquellos ricos en grasa. La oxidación de los lípidos está influenciada por el contenido en ácidos grasos insaturados, presencia de oxígeno, altas temperaturas, presencia de metales o de sal, entre otros factores (Prändl, 1994). Además en las carnes y productos cárnicos, la hemoproteína y el hierro inorgánico intervienen como catalizadores de la oxidación de lípidos.

## **1.2. Conservantes en la industria alimentaria cárnica: Los sulfitos**

Para la elaboración de productos cárnicos, es necesario determinados aditivos alimentarios que consiguen garantizar la inocuidad del producto. Un grupo muy importante de aditivos son los conservantes que tienen como misión evitar el deterioro de los alimentos, principalmente las alteraciones microbiológicas, que son sin duda una de las alteraciones más importantes de los alimentos. La alteración de los alimentos implica pérdidas económicas importantes, tanto para fabricantes, distribuidores y finalmente a los consumidores, sin olvidar las implicaciones sanitarias que pueden conllevar su consumo.

Entre los conservantes más empleados en la industria cárnica se encuentran los nitritos, nitratos y los sulfitos. Estos conservantes, se encuentran perfectamente regulados en la industria cárnica, en donde la legislación recoge, a qué clase de productos cárnicos puede estar autorizado y las dosis máxima permitida (REAL DECRETO 1118/2007).

### 1.2.1. Características de los sulfitos

Los sulfitos son aditivos conservantes, por lo tanto actúan deteniendo o retrasando el crecimiento de los microorganismos evitando procesos como la acidificación, la fermentación no deseada o la descomposición, que causan pérdidas organolépticas en los productos. De este modo, los sulfitos permiten alargar la vida útil del alimento, evitan que pierda su valor nutritivo y garantizan su seguridad (Jay, 2002).

El uso de los sulfitos está autorizado en la actualidad para diversos alimentos como los vegetales, los zumos, el vino, la cerveza, los productos cárnicos, los crustáceos y moluscos o los preparados a base de cereales o frutos secos. Sin embargo, para algunos de estos productos existen ciertas restricciones en su adición (Zubeldia-Lauzurica y Gomar-Fayos, 1997; RD 142/2002). Los sulfitos son también aditivos antioxidantes que inhiben las reacciones de oscurecimiento que se producen por determinadas enzimas. Otra de las características de los sulfitos es que provocan la degradación de la tiamina, por ello, su adición debe realizarse a productos que tengan un alto contenido de esta vitamina, como pueden ser los productos cárnicos. En general, los sulfitos requieren de un medio ácido para inhibir eficazmente tanto bacterias como mohos y levaduras. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que este aditivo puede perderse durante el procesado o cocinado de los alimentos, bien por combinación con otros componentes o bien por la evaporación del mismo.

Están autorizados como uso alimentario la siguiente lista de sulfitos, los cuales se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.-** Sulfitos aprobados por la Unión Europea para el uso en productos alimenticios

Número E	Denominación
E-220	Dióxido de azufre
E-221	Sulfito de sodio
E-222	Sulfito ácido de sodio
E-223	Metabisulfito sódico
E-224	Metabisulfito potásico
E-226	Sulfito de calcio
E-227	Sulfito ácido de calcio
E-228	Sulfito ácido de potasio

*Fuente: Directivas 95/2/EC y 2006/52/EC; Ruiz-Capilla y Jimenez-Colmenero, 2009*

En el estudio realizado por Paleari-Bianchi y col. (1985), se observó que el sulfito de sodio (E-221) inhibe el crecimiento de levaduras, mohos y bacterias, además de que debido a su actividad antioxidante, produce un retraso en las reacciones de decoloración. Por otro lado, en el estudio de Bover-Cid y col. (2001), se observó que

los sulfitos degradaron la tiamina o vitamina B1 de los productos, provocando pérdidas organolépticas, siendo esto un efecto indeseable de los sulfitos.

Mischek y col. (2012) estudiaron el dióxido de azufre y sulfitos (E220-E228), el ácido benzoico (E210), el ácido sórbico (E200) y sus sales (benzoatos, sorbatos). Estos son ampliamente utilizados como conservantes en una gran variedad de alimentos debido a su actividad antibacteriana, antifúngica y a sus propiedades antioxidantes. Observaron que los sulfitos pueden inhibir reacciones de pardeamiento enzimático y no enzimáticos en los alimentos (Mischek, y Krapfenbauer-Cermak, (2012).

### 1.2.2. Legislación

La regulación del uso de sulfitos es muy importante para el consumidor, ya que en la Reglamentación de la Comunidad Europea, y en concreto en la Directiva 95/2/CE y la del 2006/52/CE que es la modificación del anterior, se establece que las dosis máximas estén en mg /kg o mg/l expresado en SO<sub>2</sub>, según corresponda, y además no debe considerarse un contenido inferior a 10 mg/kg o mg/l (Ruiz-Capillas y Jiménez-Colmenero, 2009). Estas restricciones establecen las concentraciones para algunos alimentos. Por ejemplo, los productos a base de cereales y frutos secos tienen una dosis de 50 mg/kg, los crustáceos y moluscos en un rango entre 50-150 mg/kg (en las partes comestibles), las frutas y hortalizas en un rango entre 50-2000 mg/kg, y en el caso de los preparados de carnes, como son las salchichas frescos, Burger meat (contenido mínimo de vegetales o de cereales del 4% mezclada con la carne) y breakfast sausage (salchichas de desayuno), existe un límite máximo de 450 mg/kg (REGLAMENTO (UE) 1129/2011y REAL DECRETO 1118/2007).

### 1.2.3. Actividad antimicrobiana y antioxidante de los sulfitos

Una de las propiedades más destacadas de los sulfitos es su actividad antimicrobiana. Esta actividad es más efectiva frente a bacterias Gram-negativas que frente a Gram-positivas, en concreto contra *Pseudomonas* o géneros que tengan efectos similares a los provocados por esta bacteria en los productos cárnicos frescos.

Por ejemplo, en el caso del metabisulfito, la actividad antimicrobiana se realiza mediante la disociación de la molécula de dióxido de azufre. Este grado de disociación puede depender del pH y se ve reducido en condiciones ácidas. Es por esto que el metabisulfito junto con otros sulfitos, tienen una actividad relativamente baja al pH de la carne. Además, si existe presencia de levaduras, la actividad se reduce aún más ya que producen acetaldehído, entre otros compuestos, acidificando más el medio.

Uno de los microorganismos más resistentes a los sulfitos es *Brochothrix thermosphacta*, que puede crecer a una temperatura de 4°C. Es un organismo

alterante, que cuando se encuentra presente en altas concentraciones, origina sabor ácido, decoloración de la carne y aroma a queso.

Entre las alteraciones más características que producen en los productos cárnicos frescos como las longanizas, se da en el exterior produciendo un aspecto limoso o pegajoso. También se puede producir crecimiento de las levaduras en el interior de la longaniza produciendo olores extraños frutales. Dentro de las levaduras, las que más se han aislado son *Candida* y *Debaryomyces hansenii* con sulfitos (Varnam, y Sutherland, 1998).

Cabe destacar que ningún conservante tiene un espectro completo de acción contra los microorganismos. Generalmente los ácidos orgánicos tienen una mayor amplitud de acción antimicrobiana y son bastante efectivos contra hongos, levaduras y bacterias. Por ejemplo, el ácido benzoico inhibe de forma muy alta a levaduras y mohos; el ácido propiónico inhibe altamente a mohos y bacterias, y a las levaduras apenas les hace efecto. En relación con el dióxido de azufre y los sulfitos tienen un amplio espectro como antimicrobiano en alimentos con un pH ácido, y además es más efectivo contra bacterias que contra levaduras y mohos (tabla 2).

**Tabla 2.** Acción de inhibición del ácido sórbico, ácido benzoico y de los sulfitos.

**Table 2.** Inhibitory action of sorbic acid, benzoic acid and sulphur dioxide on bacteria, yeasts and moulds

Organism	Preservatives					
	Sorbic acid		Benzoic acid		SO <sub>2</sub>	
	pH	MIC <sup>a</sup>	pH	MIC <sup>a</sup>	pH	MIC <sup>a</sup>
<b>Bacteria</b>						
<i>Escherichia coli</i>	5.2–5.6	50–100	5.2–5.6	50–120		100–200
<i>Serratia marcescens</i>	6.4	50				50
<i>Bacillus</i> sp.	5.5–6.3	50–1000				
<i>Clostridium</i> sp.	6.7–6.8	100–1000				
<i>Salmonella</i> sp.	5.0–5.3	50–1000				
<i>Lactobacillus</i> sp.	4.3–6.0	200–700	4.3–6.0	300–1800		100
<i>Pseudomonas</i> sp.			6.0	200–400		
<i>Streptococcus</i> sp.			5.5–5.6	50–100		
<i>Micrococcus</i> sp.			5.2–5.6	200–400		
<b>Yeasts</b>						
<i>Saccharomyces</i> sp.	3.2–5.7	30–100			4.0	80–160
<i>Hansenula anomala</i>	5.0	500		200–300	5.0	240
<i>Torulopsis</i> sp.	4.6	400		200–500		
<i>Candida krusei</i>	3.4	100		300–700		
<i>C. lipolytica</i>	5.0	100				
<i>Byssochlamys fulva</i>	3.5	50–250				
<b>Moulds</b>						
<i>Rhizopus</i>	3.6	120	5.0	30–120		
<i>Geotrichum candidum</i>	4.8			1000		
<i>Oospora lactis</i>	3.5–4.5	25–200		300		
<i>Penicillium</i> sp.	3.5–5.7	20–100	2.6–5.0	30–280	5.0	160–400
<i>Aspergillus</i> sp.	3.3–5.7	20–100	3.0–5.0	20–300	4.5	220
<i>Fusarium</i> sp.	3.0	100				

<sup>a</sup> MIC, minimum inhibitory concentration, expressed in p.p.m.

Fuente: Jay, 2002.

En la forma de SO<sub>2</sub> permite la fijación del color de la carne debido a su capacidad de mantener el hierro hemo. Es muy reactivo con otros componentes de los alimentos, por lo que parte del SO<sub>2</sub> puede encontrarse unido o fijo en los alimentos. Por ejemplo, su combinación con azúcares es más lenta que con cetonas y aldehídos, formándose productos inestables, y una vez combinados provoca que el conservante tenga muy

poca acción antimicrobiana. A pH bajo, la combinación del SO<sub>2</sub> con la glucosa se retrasa y por lo tanto, se asegura que haya un mayor tiempo para que actúe sobre los microorganismos (Jay, 2002).

Entre los factores que influyen en la acción antimicrobiana de los sulfitos se encuentran (Jay, 2002). Microbiología moderna de los alimentos. 4ª edición):

- El nivel inicial de contaminación microbiana que afecta a la eficacia de la conservación del SO<sub>2</sub>.
- Los tipos de microorganismos presentes en los alimentos.
- La concentración de SO<sub>2</sub>.
- Las diversas formas de equilibrio del SO<sub>2</sub>, como el ácido sulfuroso, sulfitos, y están determinadas por la temperatura, el pH, la conservación de los alimentos o la composición.
- La acción antimicrobiana del SO<sub>2</sub> es más eficaz en los alimentos con pH ácido. Con valores de pH más altos los sulfitos no tienen acción inhibitoria.
- El efecto de altas temperaturas hace que el SO<sub>2</sub> se volatilice de los alimentos y además se reduzca el efecto antimicrobiano que posee. Además en temperaturas <100°C (pasteurización), se aumenta la destrucción de los microorganismos presentes.
- La temperatura de almacenamiento es importante ya que a temperatura ambiente la preservación de los sulfitos puede competir con el almacenamiento en refrigeración de los alimentos sin aditivos.

Otra de las características destacadas de los sulfitos es su actividad antioxidante, por lo que su adición a los productos cárnicos permite protegerlos de la oxidación lipídica (Jay, 2002).

En lo que respecta a la oxidación de la carne, esto repercute negativamente en la calidad de los productos cárnicos frescos, debido a la presencia de sabores y olores desagradables, pérdida y decoloración en el color e incluso el exudado por la ruptura de membranas celulares. Para poder medir el nivel máximo aceptable de oxidación se recurre al índice del ácido tiobarbitúrico o TBA, que se expresa como mg de malonildialdehído por kg de carne. Por lo tanto, un valor inferior a 0,5 corresponde a una carne de calidad óptima para el consumo, cuando el valor se aproxima a 1 o 1,5, esto se refiere a que afecta negativamente a la calidad del producto y >1,5 se afecta negativamente a la calidad para el consumo en fresco de dichos productos (Bote et al., 2005).

Por lo tanto, los procesos de oxidación de la grasa van a depender de los ácidos grasos insaturados, ya que la presencia de un doble enlace produce un desequilibrio que facilita la formación de los radicales libres. La adición de BHT o BHA, entre otros antioxidantes logran retrasar las reacciones de oxidación, por lo que se usan en la

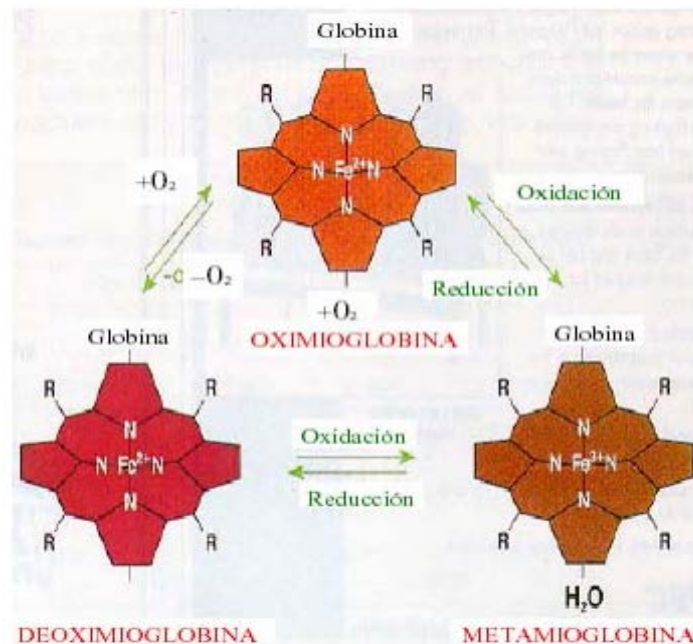
alimentación animal (Bote et al., 2005). El color de la grasa puede estar influenciado por la presencia de mioglobina, y por su composición en ácidos grasos.

El color es un parámetro importante ya que determina la aceptación de esa carne por parte del consumidor y además el valor del producto en ese momento de comercialización. Además, es lo primero que se observa en el momento de la compra y de ahí su importancia (Galián-Jiménez, 2007).

El color en el músculo puede verse influido por (Honikel, 1998):

- El procedimiento del sacrificio y posterior procesado, que afectan a la temperatura, el pH y al color.
- El tiempo de almacenamiento y sus condiciones para la comercialización que afectan al color a través de la oxidación de la mioglobina.
- El contenido en mioglobina que es el más importante y que se relaciona con la raza del animal o tipo de alimentación y especie, entre otros.

La mioglobina es el pigmento que se encuentra en mayor cantidad en la carne, además es la responsable del color rojo de la carne fresca y actúa como transportador de oxígeno en el músculo vivo. En el músculo, el hierro hemo puede tener asociado un oxígeno, formando así la oximioglobina, que presenta un color rojo brillante, que se observa en el exterior de la carne fresca. La mioglobina, en el interior no tiene ningún oxígeno unido, por lo tanto, se encuentra en forma de deoximioglobina, con un color rojo púrpura más oscuro e intenso que el de la oximioglobina (Ver figura 2). La metamioglobina (color marrón) es la forma oxidada del pigmento. La formación de este último pigmento constituye un importante problema durante la venta del producto, ya que el consumidor puede asociarlo con un periodo de almacenamiento largo, aunque puede formarse en pocos minutos. Prevenir la formación de la metamioglobina es un reto para la industria cárnica, especialmente para la venta de carnes frescas y preparadas de carne.



**Figura 2.** Cambios en el estado químico de la mioglobina (Galián Jiménez, 2007).

#### 1.2.4. Problemática del uso de sulfitos

Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority-EFSA), unos 70 mg/kg de sulfitos por peso corporal existe un nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) en los consumidores. Con ello se concluyó de que la ingesta diaria admisible (IDA) tenía que ser de 0,7 mg/kg de peso corporal (AECOSAN, 2016).

Por lo tanto es necesario el control de los sulfitos, ya que se les atribuyen efectos adversos en personas con un déficit de la enzima sulfito-oxidasa, y generalmente también en personas sensibles a los mismos, como es el caso de personas asmáticas, en las que producen síntomas como dolor de cabeza, urticarias, irritación del tracto gastrointestinal e incluso pudiendo llegar a un shock anafiláctico. Otro problema que hay que tener en cuenta es la pérdida de la calidad nutricional que se produce en los alimentos debido a los sulfitos, ya que pueden llegar a descomponer la tiamina o vitamina B1 en sus componentes (tiazol y pirimidina) (Ávila Mesa, 2016).

Esto ha generado que los consumidores estén preocupados por el consumo excesivo de conservantes químicos alimentarios y además demandan la venta de productos con nuevos aditivos naturales (Izuriaga-Escudero, 2014).

Las personas asmáticas tienen un mayor grado de hiperreactividad de las vías respiratorias y por lo tanto tienen un mayor riesgo de reaccionar a los alimentos con sulfitos. Dentro de esta población, las reacciones de sensibilidad a dichos sulfitos son variables, ya que puede haber una respuesta muy grave o ausencia de ella. Entre estas

respuestas se pueden dar dermatitis, urticaria, dolor abdominal o diarrea, aunque algunos estudios describen que la broncoconstricción es la respuesta más común en pacientes asmáticos (Lester, 1995).

Los sulfitos están presentes en muchos alimentos como son (ASCIA, 2014):

• <b>Bebidas:</b>	Algunos jugos de frutas, cerveza y vino, algunas bebidas gaseosas, té.
• <b>Otros líquidos</b>	Las preparaciones comerciales de limón y jugo de limón, vinagre, jugo de uva.
• <b>Los alimentos comerciales</b>	Patatas, algunas salsas aderezos de fruta, cebollas en vinagre, jarabe de arce, mermeladas.
• <b>Fruta</b>	Albaricoques secos y uvas.
• <b>Carne</b>	Los sulfitos se agregan a veces de manera ilegal a la carne picada o carne de salchicha.
• <b>Otras comidas</b>	Gelatina, coco.

Según el estudio Boushey (1982), hay una gran evidencia que los asmáticos son hipersensibles a este gas, mientras que la mayoría de la población no asmática puede llegar a tolerar hasta 5 ppm del SO<sub>2</sub>.

Dada la sensibilidad de los individuos y la severidad de las reacciones, es muy poco probable que solamente un mecanismo dé explicación a las reacciones de los sulfitos (Lester, 1995).

Actualmente, la sensibilidad a los sulfitos es un problema real que afecta a la salud de las personas y en concreto de los asmáticos. Se tiene que considerar la posibilidad de sensibilidad a los sulfitos cuando dichos individuos presenten reacciones adversas a una gran variedad de exposiciones, particularmente cuando estas personas experimentan un empeoramiento de los síntomas del asma después del consumo de alimentos, tales como vinos, frutas o carne, entre otros. (Vally y Misso, 2011).



### 1.3. Alternativa al uso de conservantes en la industria cárnica

Actualmente los consumidores demandan productos libres de aditivos sintéticos, y ahora mismo en el mercado hay avances importante en referido a la alimentación animal, pasando por las tecnologías de envasado y conservación o las tecnologías que permiten un mayor control de la trazabilidad, gestión y seguridad de la cadena alimentaria.

En relación con las tecnologías de envasado y conservación, han evolucionado en respuesta a las exigencias de los consumidores que reclamaban una mejora en la vida útil, en la apariencia o en la frescura. Los cambios de estilo de vida también han influido en evolución y desarrollo de la industria alimentarias, con un incremento en la producido de productos “listos para tomar” o semielaborados. Y dentro de los avances en la conservación, se encuentra el desarrollo de envases biodegradables, envases inteligentes e incluso envases que indiquen la correcta cocción del producto sin alterar sus características organolépticas.

Los consumidores también valoran que los alimentos sean más naturales y que tengan efectos beneficiosos para la salud. Por tanto, se estudian los subproductos para la obtención de ingredientes naturales, y también el desarrollo de alimentos que aporten un valor añadido en lo que se refiere a la salud (como por ejemplo, probióticos o ingredientes con bajo poder calórico, entre otros), sustitutos de la sal, azúcar y grasas (Cruz, 2015).

#### 1.3.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias obtenidas de las plantas por diversos métodos como el arrastre por vapor de agua, y que contienen los aromas de las plantas. Es por todo esto que son muy importantes para algunas industrias (Martínez, 1996).

Actualmente, se están introduciendo en el mercado como una alternativa “natural” para la conservación de los alimentos, debido a las demandas de los consumidores para eliminar los conservantes químicos como los sulfitos (Nychas, 1995). Sin embargo, debido a los cambios de sabor no deseados que se producen en el producto alimenticio, su aplicación práctica se encuentra limitada (Juven et al., 1994). También se ha observado que los aceites esenciales tienen efecto antimicrobiano, siendo en general más sensibles a estos las bacterias Gram-positivas que las Gram-negativas (Dabbah, 1970). Este efecto antimicrobiano ha sido demostrado por diversos estudios (Sokmen et al., 2004; Candan et al., 2003).

En el estudio realizado por Albado Plaus y col. (2001), se evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano, y se observó que hacía frente a bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. En otro

estudio, se encontró que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales resulta efectiva contra bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y contra bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Aligiannis et al., 2001).

También se ha observado efectos antifúngico de aceites esenciales de limón (*Citrus lemon* L.), naranja (*Citrus sinensis* L.) y mandarina (*Citrus reticulata* L) considerando especialmente al AE de cítricos como una fuente alternativa a los aditivos químicos para la industria alimentaria (Viuda-Martos et al., 2008)

Esta actividad antimicrobiana puede producir cambios en la composición del aceite esencial, siendo necesario tener en cuenta ciertos factores, como la procedencia del aceite, la técnica de aislamiento, como por ejemplo, la extracción o la destilación de vapor (Janssen, et al., 1987).

En otro estudio sobre aceites esenciales, Weiss et al. (2010) demostró que lo más efectivo a la hora de disminuir la oxidación lipídica en preparados cárnicos, era mediante extractos naturales provenientes de orégano y romero, debido a sus capacidades antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria.

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales depende de una serie de características como por ejemplo la cepa bacteriana, su carácter hidrófobo o hidrófilo y la composición química del aceite. (López-Malo et al 2006; Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 2012; Fisher y Phillips, 2008).

El mecanismo de acción por el cual los aceites esenciales ejercen la actividad antibacteriana no se conoce completamente. Además, es muy probable que su actividad antibacteriana no se deba a un único mecanismo examinado hasta ahora, sino a la acción de diferentes mecanismos que actúan en conjunto sobre distintos puntos diana de las células sobre las que ejercen su acción antimicrobiana (Carson et., al 2002).

El modo de acción de esta actividad puede explicarse mediante la hipótesis de que estos componentes tienen la capacidad de desestabilizar la pared celular actuando sobre los componentes lipídicos, provocando con ello roturas en las membranas celulares y la muerte del microorganismo (Burt, 2004).

Otra propiedad que tienen los aceites esenciales es su actividad antioxidante, por el que ha sido objeto de múltiples estudios (Alves-Silva et al., 2013; Hounda et al., 2016). Viuda-Martos et al., 2010) concluyeron que el orégano, clavo, tomillo, romero pueden considerarse como fuente natural de compuestos antioxidantes. Estos AEs también se les ha atribuido efectos antifúngicos, siendo el AE de orégano el que más efecto presentó seguido del clavo y del tomillo (Viuda Martos et al., 2007).

Los antioxidantes se tratan de sustancias que cuando se encuentran a bajas concentraciones, en comparación con otros compuestos oxidables, retrasan o inhiben los procesos oxidativos. Los compuestos antioxidantes sintéticos se añaden para prevenir la oxidación y para prolongar la vida útil de los productos. Entre los antioxidantes sintéticos que se utilizan en alimentos se encuentran, el BHA (butil hidroxianisol), el BHT (butil hidroxitolueno), el GP (galato de propilo) y el TBHQ (terbutil hidroquinona) (Shebis et al., 2013)

Otras propiedades que destacan en los aceites esenciales están relacionadas con la salud. Como por ejemplo, la actividad antiviral, antifúngica y anticancerígena.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

El objetivo de este estudio fue utilizar aceites esenciales, en este caso aceite esencial de orégano (*Oreganum compactum*), como una alternativa viable al uso de sulfitos en productos cárnicos frescos (longanizas frescas) almacenados en refrigeración a 4 y 8°C.

### 2.2. Objetivos específicos

Del objetivo general surgen los siguientes objetivos específicos:

- Optimizar la incorporación del aceite esencial (AE) de orégano durante el proceso de elaboración de la longaniza fresca.
- Determinar la concentración óptima de AE de orégano, desde el punto de vista sensorial.
- Elaborar 3 lotes de longanizas frescas correspondientes a un control, otro con sulfitos, y otro con una concentración óptima de aceite esencial de orégano.
- Estudiar el comportamiento de los productos elaborados durante su conservación a 2 temperaturas: una a 3-4°C, que es la recomendada y otra a 8°C, que sería un poco superior para ver su efecto.
- Estudiar la evolución del color y pH en los distintos lotes de productos durante 7 días de conservación a las dos temperaturas (4 y 8°C).
- Estudiar las evoluciones de las poblaciones microbianas (bacterias aerobias, bacterias lácticas y enterobacterias), en los tres lotes de longanizas frescas elaborados durante su conservación en refrigeración a 4 y 8°C.
- Evaluar las características sensoriales en las distintas formulaciones en crudo y en cocinado.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Diseño del experimento

Para la realización de este trabajo se seleccionó una formulación básica de un producto cárnico fresco, longaniza fresca, cuya formulación incluía magro y, panceta de cerdo, sal, aditivos y especias. Los productos cárnicos fueron elaborados en la planta piloto de Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO).

Se diseñó el experimento con tres lotes de productos:

- Lote 1: un control (elaborado con la formula básica).
- Lote 2: con sulfitos (elaborado con la formula básica a la cual se le incorporó sulfito sódico E-221, a una concentración de 400mg/kg (dentro del valor autorizado por la legislación).
- Lote 3: con aceite esencial (AE) de orégano (elaborado con la formula básica a la cual se incorporó una concentración de aceite esencial de orégano).

El aceite esencial de orégano (*Oreganum compactum*) fue elaborado por la empresa Herbes del Moli (Alicante) procedente de cultivo ecológico. El aceite esencial presentó la siguiente composición (componentes principales): 30,21% de carvacrol, 20,45% thymol, 12,70% de p-cymene, 10,90% de g-terpinene y 3,34% de linalool. Cabe indicar que se optó por utilizar un aceite esencial suave con la finalidad de enmascarar, en la menor medida posible, las características propias del producto cárnico empleado, pues no sólo se pretendió valorar la eficacia antimicrobiana del aceite, sino también la aceptación del producto final por parte del consumidor.

El sulfito sódico E-221, fue suministrado por RIVER S.L.U. (Orihuela, Alicante).

Una vez elaborados los lotes, se colocaron en bandejas tapadas con papel de aluminio en aerobiosis, y almacenadas durante 7 días a dos temperaturas, a 4°C (temperatura máxima recomendada por el fabricante) y 8°C (temperatura aproximada alcanzada en los frigorífico de los hogares), muestreando a diferentes tiempos, para la determinación del pH, color, recuentos microbianos y análisis sensorial.

### 3.2. Optimización de la incorporación de AE de orégano durante el procesado y determinación de su concentración

Al ser los aceites esenciales productos concentrados, la utilización de éstos son limitados por los fuertes sabores y aromas que pueden aparecer en el producto final, por tanto su concentración debe ser relativamente pequeña. Además, los aceites esenciales, son productos inmiscibles en agua, por tanto, para asegurarse que se encuentren repartidos por igual en el producto cárnico, su incorporación debe ser cuidada para afirmar su distribución homogénea por todo el producto.

Para asegurar la distribución de aceite esencial en el producto final, se adaptó y optimizó el proceso de elaboración de la siguiente manera: la panceta de cerdo junto al aceite esencial era previamente emulsionados utilizando una cutter (Tecator 1094 Homogeneizer, Tekator, Höganäs, Sweden), una vez emulsionado, se congelaba en trozos, para su posterior picado junto al magro. Esta fase de emulsionado de la panceta también fue realizada en los lotes 1: control y lote 2: sulfitos, aunque sin incorporaciones de aceite esencial, de forma que todos los lotes tuvieran un mismo tratamiento.

Para determinar la concentración más adecuada de aceite esencial en el preparado cárnico, en el estudio se realizaron sistemas modelo de una pasta cárnica, con panceta (60%) y magro (40%) de cerdo, a las mismas concentraciones que la fórmula base, con diferentes concentraciones de AE de orégano, las concentraciones de los pre-ensayos fueron 0,5% y 1%. La panceta se emulsionó con el aceite esencial y posteriormente se homogeneizó con el magro picado, obteniendo diferentes pastas cárnicas con distintas concentraciones de aceite esencial (0,5%, y 1%). Las pastas fueron embutidas en tripa de cordero de unos 10-12mm de diámetro, simulando una longaniza. Tras evaluar el olor y la textura de las longanizas, antes y después del cocinado, se concluyó que aquellas con un contenido de aceite esencial del 1% presentaban un olor a orégano excesivamente fuerte y no aceptable tras el cocinado. Por lo tanto, según los catadores se llegó a la conclusión de que el preparado cárnico más adecuado es aquel que contenía un 0,5% de aceite esencial.

### 3.3. Elaboración de las longanizas frescas

Todas las materias primas fueron suministradas por una carnicería en Orihuela, transportadas a la planta piloto de la EPSO y almacenadas en refrigeración hasta su utilización. La temperatura de trabajo fue alrededor de 12°C, y se extremaron al máximo las medias higiénicas, tanto en la maquinaria como en las superficies de trabajo para evitar contaminaciones.

Para la elaboración de los 3 lotes de longanizas, se utilizaron la misma fórmula base, variando la concentración de sulfito, solo utilizada en el lote 2 y la concentración de aceite esencial utilizado en el lote 3, según la tabla 3:

**Tabla 3.** Materias primas y porcentajes en la elaboración de los 3 lotes de longanizas.

<b>Materias primas</b>	<b>Control</b>	<b>Con sulfitos</b>	<b>Aceite esencial</b>
<b>Magro de cerdo</b>	40%	40%	40%
<b>Panceta</b>	60%	60%	60%
<b>Agua fría</b>	5%	5%	5%
<b>Sal</b>	1,5%	1,5%	1,5%
<b>Ácido ascórbico</b>	500 mg/kg	500 mg/kg	500 mg/kg
<b>Fosfatos</b>	300 mg/kg	300 mg/kg	300 mg/kg
<b>Ajo en polvo</b>	0,1%	0,1%	0,1%
<b>Pimiento negra</b>	0,3%	0,3%	0,3%
<b>Sulfitos*</b>	0	400 mg/kg	0
<b>Aceite esencial*</b>	0	0	0,5%

Para la elaboración de las longanizas se siguió el siguiente diagrama de flujo (figura 3), se comenzó con la selección de las materias primas necesarias. En primer lugar, la panceta fue dividida en tres lotes, para su pre-emulsión en una cutter (Tecator 1094 Homogeneizer, Tecator, Höganäs, Sweden) durante 3 min. Tal como se ha comentado en apartado 3.2, solo el lote 3 fue emulsionado con el aceite esencial. Tras la pre-emulsión, se llevaron a congelación hasta el momento de su utilización.

Una hora antes de la elaboración, los tres lotes de pancetas pre-emulsionadas fueron descongelados para proceder a su picado junto al magro en una picadora con placa de 4mm (Mainca, Barcelona, España) y su posterior amasado durante 3 minutos en un cutter de mesa (robot-coupe R4 V.V, Francia), junto con las especias y los aditivos. El siguiente paso, fue la embutición del producto mediante tripas naturales de cordero de unos 10-12 mm de diámetro que previamente fueron desaladas en agua, posteriormente fueron atadas para así obtener las unidades de longanizas. Un total de 2 kg de longanizas fueron elaborados por lote, obteniendo una media de 20 unidades de longanizas, cuyo peso fue de 60-80g cada una.

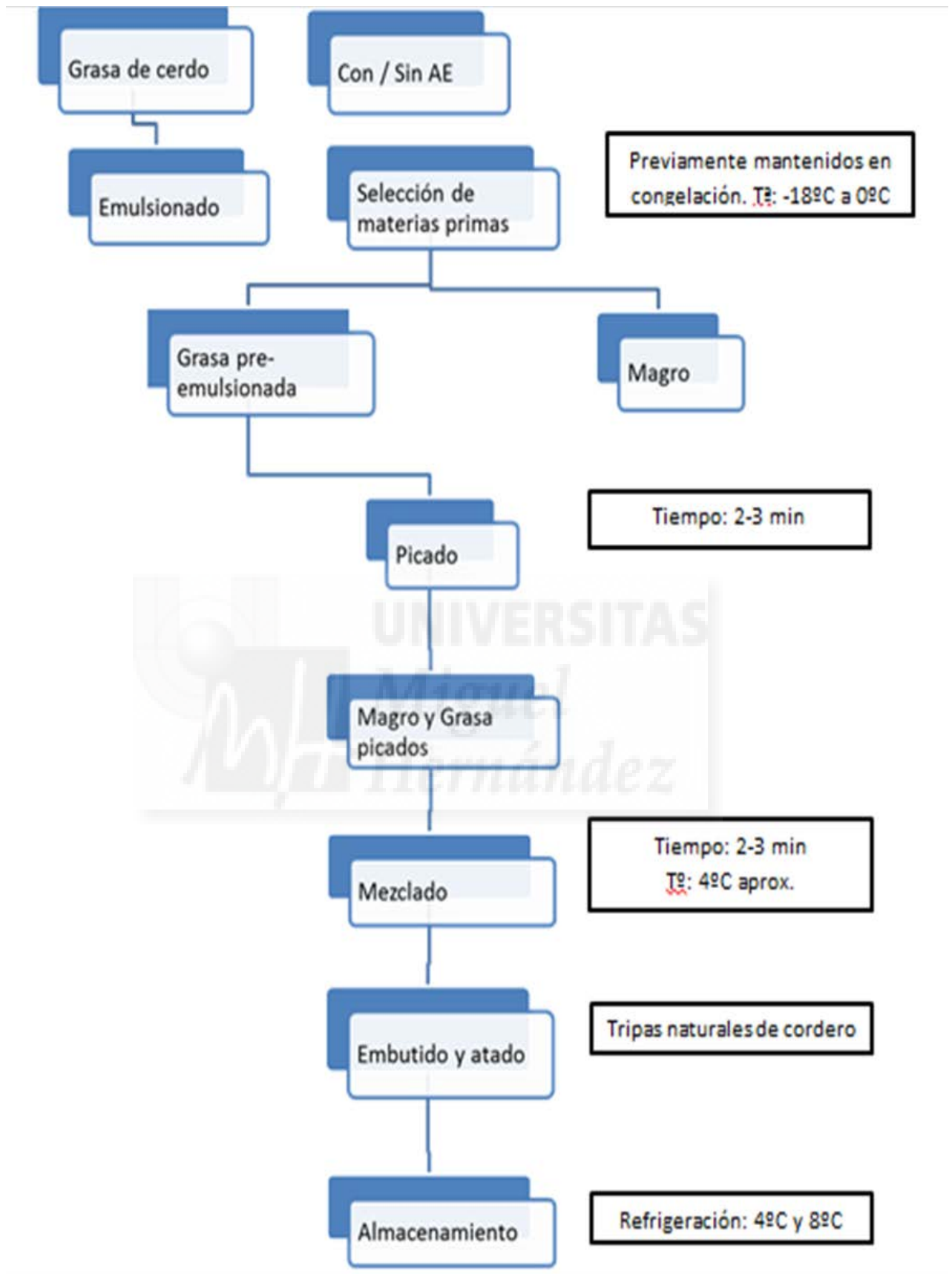
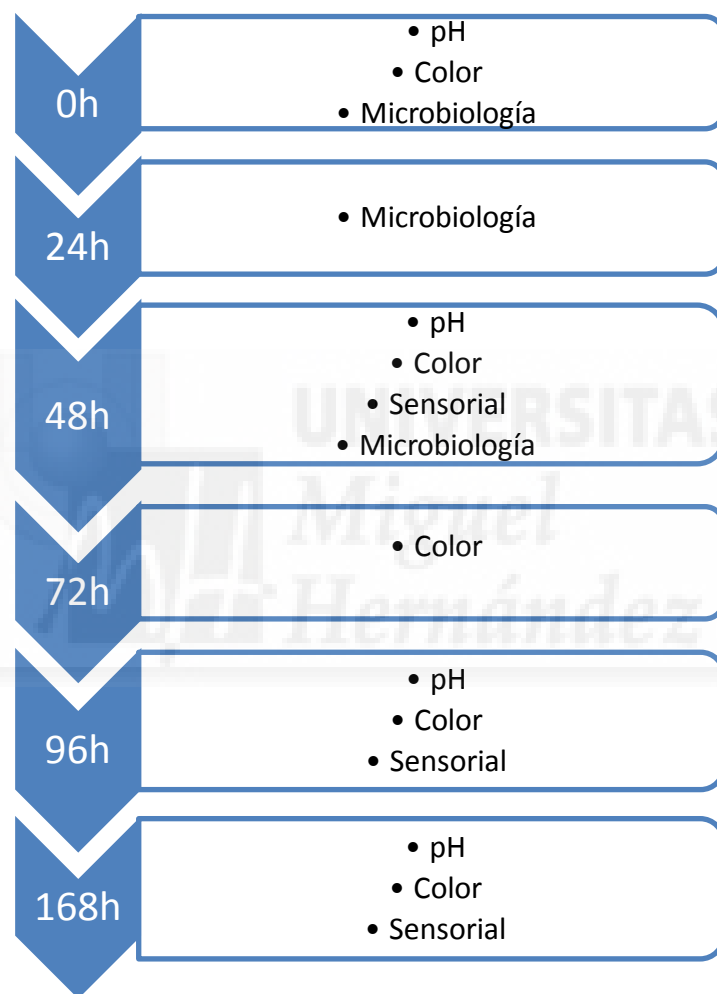


Figura 3. Diagrama de flujo de la elaboración de las longanizas



Una vez elaborados los 3 lotes, se colocaron en bandejas tapadas con papel de aluminio en aerobiosis, y almacenadas durante 7 días a dos temperaturas a 4°C y 8°C, muestreando a diferentes tiempos: 0, 2, 4 y 7 días (0, 48h, 96h, 168h). En cada muestreo se seleccionaron de cada lote 5 longanizas para la realización de análisis fisicoquímico (pH y color), recuentos microbianos (bacterias aerobias, bacterias lácticas y enterobacterias) y análisis sensoriales en crudo y en cocinado, según el calendario siguiente (figura 4)



*Figura 4. Calendario de muestreo*

### 3.4. Análisis fisicoquímico

El pH se midió con un pH-metro Crison (Modelo 507, Crison, Barcelona, España), equipado con un electrodo de punción Crison, en una mezcla que contenía 10g de la muestra de salchicha y 100 ml de agua destilada. Se agitó durante 30 segundos y se midió.

Para la determinación del color se utilizó el espacio de color CIELAB, obteniéndose las coordenadas L\*, a\* y b\*. Para ello se utilizó un espectrofotómetro CM-700d (Spectrophotometers CM-700d, Konica Minolta, Japón) con un observador 10º y un iluminante D65, según las indicaciones de la “American Meat Science Association” (AMSA, 2012). Se realizaron 7 repeticiones para cada lote de muestras.

### 3.5. Análisis microbiológico

El recuento de bacterias aerobias totales, bacterias lácticas, enterobacterias y *Escherichia coli* se realizó con placas Petrifilm™ (3M España S.A).

Se utilizó agua de peptona para hacer la dilución  $10^{-1}$  (10 gr del producto cárnico con 90 ml del agua de peptona) y a partir de ésta se procedió al resto de diluciones también con agua de peptona, excepto para las lácticas que se utilizó MRS (Man Rogosa Sharpe). Para las diluciones seleccionadas se procedió a la siembra con 1 ml de la suspensión de en el centro de la placa Petrifilm™, evitando que queden burbujas de aire atrapadas dentro de ella. Posteriormente se incubaron las enterobacterias durante 24 horas a 37°C, las bacterias aerobios totales (BAM) se incubaron durante 48 horas a 35°C y bacterias lácticas se incubaron durante 72 horas a 37°C.

### 3.6. Análisis sensorial

Para la realización del análisis sensorial de las muestras se seleccionó un panel de 5-6 expertos, formado por personal de la Universidad Miguel Hernández. A los catadores se les presentaba una hoja de cata (figura 5), mediante la cual se evaluaba externamente (color, brillo, decoloraciones de la superficie y presencia de limo) y la apreciación olfativa, antes y después del cocinado de las muestras (olores anormales y olor a orégano). Todo ello se llevó a cabo en una sala de catas normalizada.

**IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS: C (CONTROL), S (SULFITOS) Y AE (ACEITE ESENCIAL)**

**NOMBRE DEL CATADOR:**

**FECHA DE LA CATA:**

Examinar la muestra presentada y valorar los siguientes parámetros

EVALUACIÓN EXTERNA (antes del cocinado)

COLOR    
ROSA PÁLIDO MARRÓN OSCURO

BRILLO    
MATE (apagado) BRILLANTE

DECOLORACIONES    
DE LA SUPERFICIE NO EXISTEN ABUNDANTES

PRESENCIA DE LIMO    
NO EXISTEN ABUNDANTES

APRECIACIÓN OLFATIVA (antes del cocinado)

OLOR    
OLOR NORMAL OLORES ANORMALES (putrefacto)

OLOR A OREGANO    
AUSENCIA INTENSO

APRECIACIÓN OLFATIVA (después del cocinado)

OLOR    
OLOR NORMAL OLORES ANORMALES (putrefacto)

OLOR A OREGANO    
AUSENCIA INTENSO

Observaciones:

*Figura 5. Hoja de cata presentada al panel de expertos para el análisis sensorial de las muestras de longanizas frescas.*

### 3.7. Análisis estadístico

Se realizaron test estadísticos con los resultados obtenidos mediante el SPSS versión 23.0 (IBM, SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL, USA). Se realizaron test convencionales para el cálculo de las medias y desviaciones estándar. Se efectuaron análisis de la varianza (ANOVA), con tres factores (lotes: control, sulfitos y AE, temperatura: 4 y 8°C y tiempo: 0, 24, 48, 72, 96 y 168horas) y tests de Tukey para estudiar entre que niveles de los factores principales, las diferencias fueron significativas, siendo el nivel de significancia de  $P < 0,05$ .



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Evolución del pH en longanizas en los distintos lotes durante su almacenamiento en refrigeración.

En la figura 6 se representa la evolución del pH, a las dos temperaturas de estudio ( $^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$ ), para los distintos lotes de longanizas frescas elaboradas. En ellas se observa que conforme avanza el tiempo de conservación, va aumentando el pH, tal como cabría esperar en un producto cárnico fresco en refrigeración.

El tiempo y la temperatura de conservación afectó de forma muy significativa ( $p < 0,01$ ) a los valores de pH de todos los tratamientos analizados en el estudio (tabla 4). Las evoluciones del pH durante el almacenamiento a  $4^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$  se observan en la siguiente figura 6. Todos los tratamientos siguieron la misma tendencia, aunque en distinto grado de intensidad dependiendo de la temperatura de conservación. El aumento del pH, fue muy significativo a partir de las 96 horas de almacenamiento.

**Tabla 4.** Resultados del análisis estadístico (ANOVA y Test Tukey) para los parámetros fisicoquímicos estudiados (pH y CIEL\*a\*b\*) considerando los factores lote (control, sulfitos y AE), temperatura ( $4^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$ ) y tiempo de conservación (0, 48, 96 y 168 horas).

Factores	Niveles	pH	L*	a*	b*	C*	h				
Lotes	Control	**	c	*	b	**	b	**	b		
	Sulfitos		a		a		c		b		
	AE		b		ab		a		a		
Temperatura	$4^{\circ}\text{C}$	**	a	**	a	**	a	n.s.	a	**	a
	$8^{\circ}\text{C}$		b		b		b		a		b
Tiempo	0	**	a	**	d	**	a	**	a	**	a
	48		b		ab		c		c		a
	72		-		bc		a		a		a
	96		ab		cd		a		a		a
	168		c		a		b		b		a
Lotes x tiempo		**		**		**		**		**	
T <sup>2</sup> x Tiempo		**		*		*		**		**	
Lotes x T <sup>2</sup>		**				**		*		*	
Lotes x T <sup>2</sup> x Tiempo		**		**		**		**		**	

\*\* Muy significativo  $P < 0.01$ ; \* Significativo  $P < 0.05$ ; n.s. no significativo

a-d Letras distintas por filas, dentro de un factor, indican diferencias significativas según Test de Tukey ( $P < 0.05$ )

AE: Aceite esencial.

El incremento de los valores de pH a partir de las 96 horas de almacenamiento, se puede deber a los inicio de los procesos proteolíticos en la carne que originaran compuestos nitrogenados, como el amonio, que pudieran estar implicados en el incremento del pH final, e incluso por haber alcanzado la fase de meseta en la proliferación de las bacterias lácticas, ya que se traduce en una reducción de la

producción de ácido láctico. Cabe destacar que, mohos, levaduras y enterobacterias, se encuentran entre los principales microorganismos implicados en dichos procesos proteolíticos (Georgantelis, 2007).

En el almacenamiento a 4°C, se produce un aumento de pH de todos los lotes, y las diferencias entre ellos no son tan visibles como a 8°C, aunque se puede destacar que en el lote con aceite esencial presentó un menor valor de pH al final del periodo de almacenamiento. En el lote de 8°C, la subida es mucho mayor con respecto al de 4°C, debido a que el producto no está en su temperatura adecuada de conservación y por lo tanto, empeora sus características organolépticas. El que más ha aumentado el pH ha sido al lote control, con valores por encima de 7 que coincide con los olores putrefactos de un producto alterado (apartado 4.3). El que menos se le ha notado ha sido al lote de sulfitos, ya que éstos actúan como un conservante durante un determinado tiempo. La presencia de AE en las longanizas frescas permitiría un mejor control del pH en lo productos refrigerados, 4°C durante las 168h y a 8°C hasta las 96h.

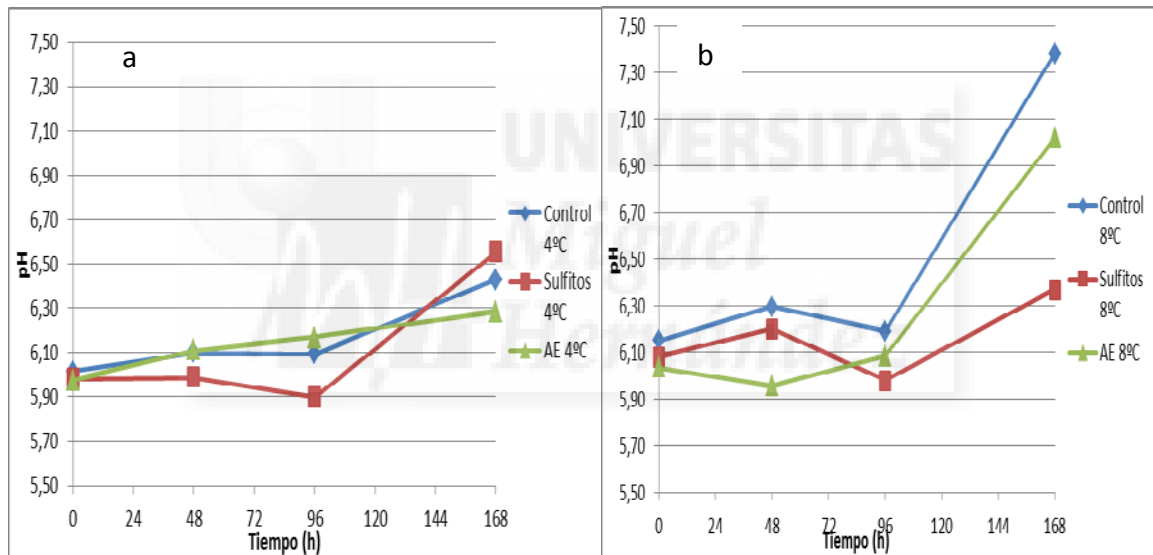


Figura 6. Evolución de pH en los tres lotes de longanizas frescas elaborados (control, sulfitos y AE) durante su conservación a 4°C (a) y 8°C (b).

#### 4.2. Evolución de los parámetros de color en los distintos lotes de longanizas durante su almacenamiento en refrigeración.

En la tabla 5, se muestran los valores medios para los parámetros de color, L\* (luminosidad), a\* (rojo-verde), b\* (amarillo-azul), C\* (croma) y h (tono), de los distintos lotes de longanizas frescas durante su conservación a 4 y 8°C.

**Tabla 5.-** Valores medios de los parámetros de color en los tres lotes de longanizas frescas elaborados (control, sulfito y AE) durante el tiempo de conservación a 4°C y 8°C.

Tiempo (h)	Tª conservación	Lote	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	C*(D65)	h(D65)
0	4	Control	58,10	4,95	14,24	15,08	70,79
		Sulfito	58,63	5,69	15,14	16,17	69,41
		AE	58,73	4,16	13,97	14,58	73,49
	8	Control	58,10	4,95	14,24	15,08	70,79
		Sulfito	58,63	5,69	15,14	16,17	69,41
		AE	58,73	4,16	13,97	14,58	73,49
48	8	Control	56,99	5,83	18,29	19,20	72,32
		Sulfito	57,07	5,88	17,98	18,92	71,92
		AE	55,51	5,99	17,90	18,88	71,52
72	4	Control	57,05	4,94	14,87	15,67	71,68
		Sulfito	56,87	5,42	14,63	15,62	69,66
		AE	55,45	5,12	13,59	14,53	69,33
	8	Control	57,10	4,87	15,77	16,51	72,81
		Sulfito	58,06	5,61	16,24	17,20	70,91
		AE	58,73	3,45	13,87	14,30	76,05
96	4	Control	58,25	4,73	15,01	15,75	72,55
		Sulfito	56,39	6,08	14,87	16,07	67,75
		AE	58,22	4,66	14,89	15,60	72,64
	8	Control	59,47	4,24	14,08	14,71	73,24
		Sulfito	57,10	4,34	15,29	15,90	74,17
		AE	57,04	4,19	13,37	14,01	72,59
168	4	Control	56,46	5,24	15,61	16,47	71,46
		Sulfito	55,35	5,84	16,44	17,45	70,42
		AE	56,15	5,68	17,15	18,07	71,70
	8	Control	57,41	5,26	17,13	17,92	72,94
		Sulfito	55,56	4,95	15,14	15,94	71,90
		AE	57,46	4,90	16,11	16,84	73,08

El tiempo de almacenamiento provocó cambios muy significativos ( $p < 0,01$ ) en todas las parámetros de color, excepto en el tono (h) que fue significativo ( $p < 0,05$ ) (Tabla 4).

Por otro lado, respecto a la temperatura de conservación, provocó cambios muy significativos en las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y en el tono (h), pero no afectó a  $b^*$  ni al  $C^*$ . Y por último, con respecto a los lotes, afectó muy significativamente ( $p < 0,01$ ) a todos los parámetros, excepto a la luminosidad ( $L^*$ ) que fue significativo ( $p < 0,05$ ).

En general, una de las principales causas de los cambios de color en los productos cárnicos frescos durante su almacenamiento, pueden ser debidas tanto a la alteración producida por los microorganismos, como por la oxidación que sufren sus lípidos y hemopigmentos.

La luminosidad disminuyó durante el almacenamiento (figura 7), a las dos temperaturas de conservación a 4 y 8°C. La luminosidad se encuentra relacionada con el agua presente en la superficie de la pieza cárnica, con las modificaciones entre los diferentes estados de los hemopigmentos (oxidaciones y oxigenaciones), con los intercambios de vapor de agua entre el ambiente y la pieza cárnica y de factores como el pH y la capacidad de retención de agua (CRA) (Sayas-Barberá et al., 2011). Las diferencias entre lotes son muy pequeñas y no tienen sentido práctico. Esta disminución en la luminosidad fue percibida por los catadores (ver apartado 4.3).

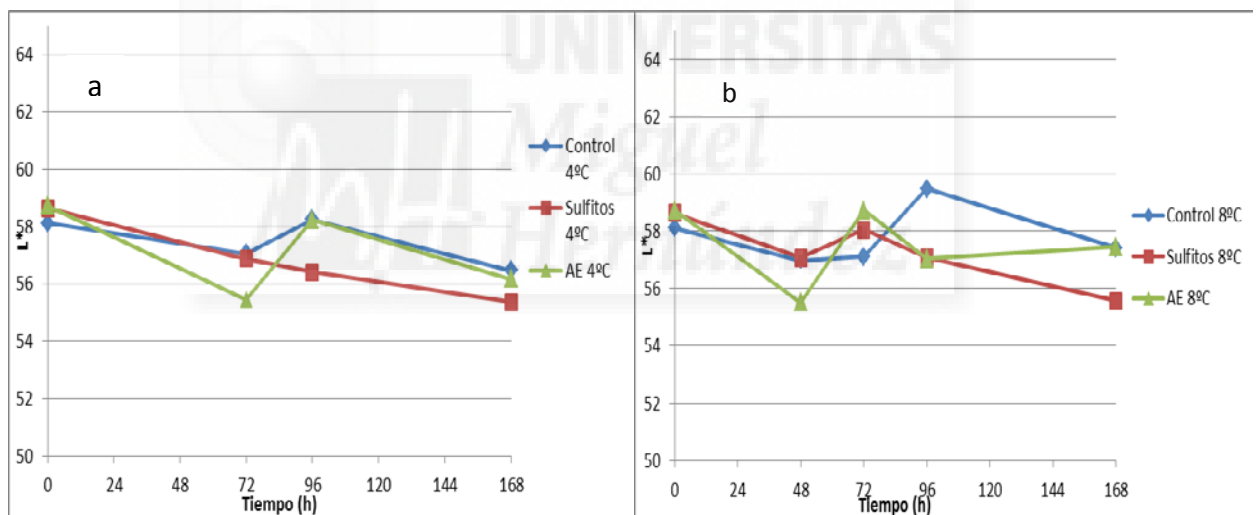


Figura 7. Evolución de la luminosidad ( $L^*$ ) en los tres lotes de longanizas frescas elaborados (control, sulfitos y AE) durante su conservación a 4°C (a) y 8°C (b).

En la figura 8-a, se puede observar que, a lo largo del tiempo de almacenamiento a 4°C, los valores de  $a^*$  para los 3 lotes aumentaron respecto a sus valores en el tiempo inicial. La coordenada  $a^*$  está más relacionada con la concentración y cambios en los estados de oxidación de los hemopigmentos, dependiendo menos de la estructura y del agua libre en superficie. A 4°C se protegería la oxidación de los hemopigmentos, favoreciendo el mantenimiento de la coordenada  $a^*$ .



En el almacenamiento a 4°C, el lote con sulfitos presentó mayores valores de  $a^*$  y conforme va avanzando el tiempo de conservación el lote con AE iguala al de sulfito, por lo que AE estaría actuando como antioxidante. Y en el lote de 8°C, los valores disminuyen hasta prácticamente las 96 horas, debido a oxidaciones de los hemopigmentos obtenidos iguales valores al final de periodo de conservación (168h).

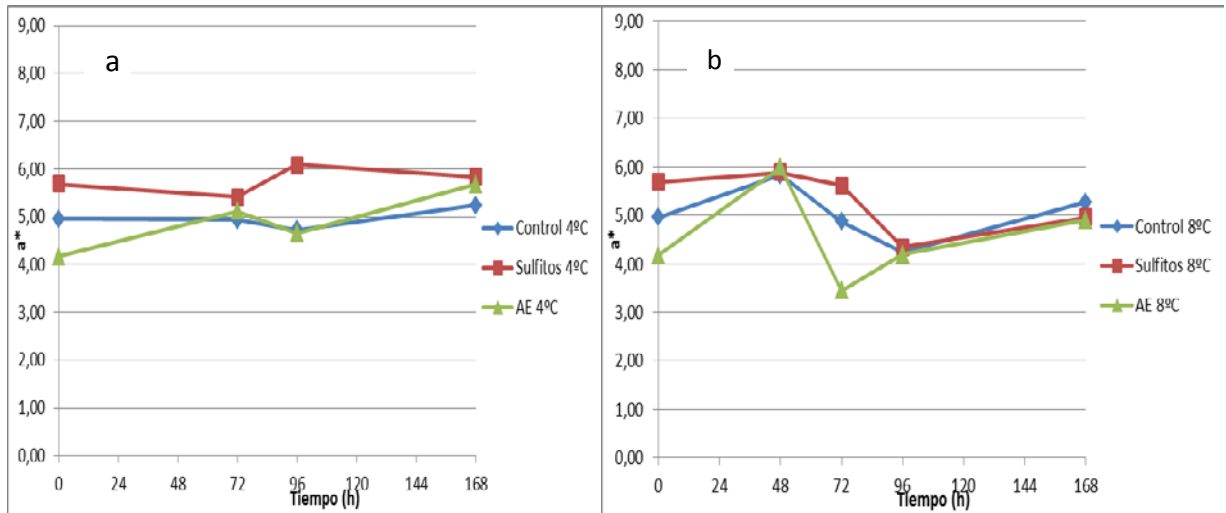


Figura 8. Evolución de la coordenada  $a^*$  en los tres lotes de longanizas frescas elaborados (control, sulfitos y AE) durante su conservación a 4°C (a) y 8°C (b).

Los valores de la coordenada  $b^*$  no se vieron afectados por la temperatura de almacenamiento ( $p > 0.05$ ), pero el lote y el tiempo sí afectó ( $p < 0.01$ ). El lote con AE fue el que menor valores de  $b^*$  obtuvo hasta tiempo final (168h), en donde sus valores se aproximaron a los otros lotes. Lo que estaría indicando que el AE se liberaría lo suficiente como para proteger a la muestra cárnica frente a modificaciones en los hemopigmentos. La forma oxigenada de los hemopigmentos aumenta los valores de  $b^*$ , mientras que las formas oxidadas o reducidas los disminuyen.

Los valores de  $C^*$  no fueron afectados por la temperatura de almacenamiento ( $p > 0.05$ ), pero el lote y el tiempo sí afectó ( $p < 0.01$ ), su comportamiento es similar a la coordenada  $b^*$ . Respecto al tono ( $h$ ) no fue afectado por el tiempo de almacenamiento ( $p > 0.05$ ) (tabla 4 y 5), pero los valores de  $h$  fueron mayores para los lotes conservados a 8°C, siendo el lote con sulfitos el que menor valor de  $h$  presentó.

### 4.3. Evolución de las poblaciones microbianas en longanizas frescas durante su almacenamiento en refrigeración.

Durante el tiempo de estudio, se observó un incremento en las poblaciones de todos los microorganismos estudiados ( $P < 0.05$ ), este aumento fue dependiente tanto de la  $T^a$  como de la adición o no de sulfitos y AE en la longanizas frescas.

La evolución de las BAM se muestra en las figuras 9a y 9b. Durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración, para los distintos lotes estudiados (control, sulfitos y AE), se produjo un aumento en los recuentos de en los dos lotes almacenados a 4 y 8°C. En el lote a 4°C, se observa que hasta las 48 horas los recuentos de las BAM para el lote con AE son menores que los obtenidos para control y sulfitos, esto podría ser debido a los componentes antimicrobianos presentes en AE de orégano, tales como, el carvacrol y el thymol (García-Gonzalez, 2013). En el lote a 8°C, los sulfitos y el AE, presentan el mismo comportamiento hasta las 48 horas de almacenamiento. Y en el caso del control se alcanzaron valores superiores a 7 log ufc/g, lo que indica que se encontraban fuera de los límites microbianos para ser considerado como un producto aceptable, ya que indicaría olores anormales y presencia de limo. Esto indica la importancia que tiene el mantener una temperatura adecuada y mantenida durante la conservación de la carne y productos cárnicos.

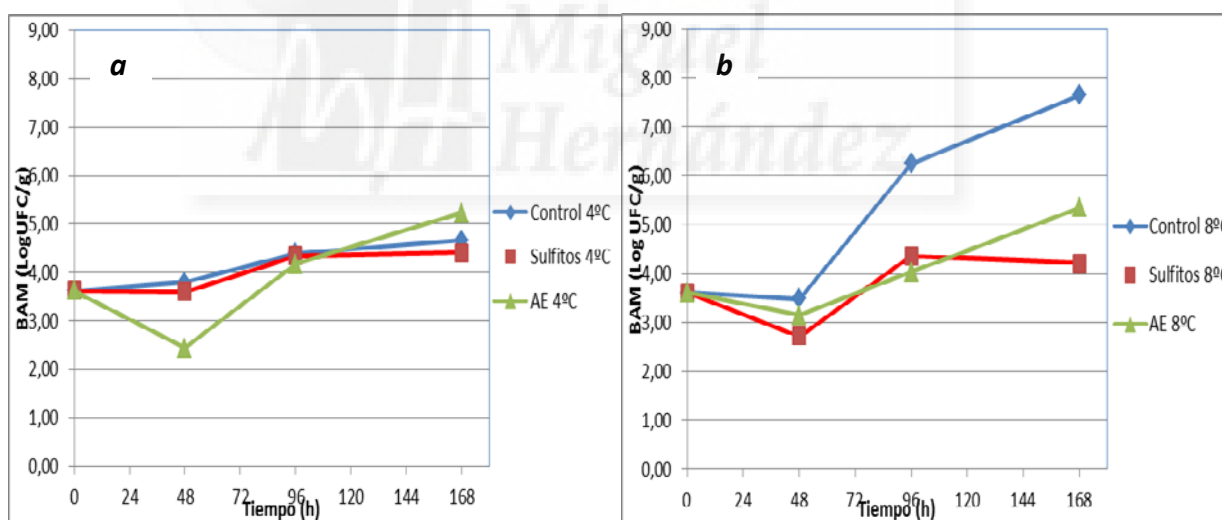


Figura 9. Evolución de las bacterias aerobias mesófilas (BAM) en los tres lotes de longanizas frescas elaborados (control, sulfitos y AE) durante su conservación a 4°C (a) y 8°C (b).

En la figura 10, se representa la evolución en los recuento de las BAL. Se observó un aumento en los recuentos a lo largo del tiempo de almacenamiento, que fue dependiente tanto de la temperatura de almacenamiento y del lote. En el almacenamiento a 4°C (figura 10-a), se observa que hasta las 96 horas los recuentos de las BAL para el lote con AE son menores que los obtenidos para control y sulfitos, esto podría ser debido a los componentes antimicrobianos del AE de orégano, como

carvacrol y thymol. A partir de las 96 horas los recuentos entre los 3 lotes no son significativos. En los lotes almacenados a 8°C, los recuentos de las longanizas frescas con adición de sulfitos y las longanizas con AE, se comportaron de forma similar, mientras que en las muestras control presentaron unos recuentos muy superiores a partir de 96 horas.

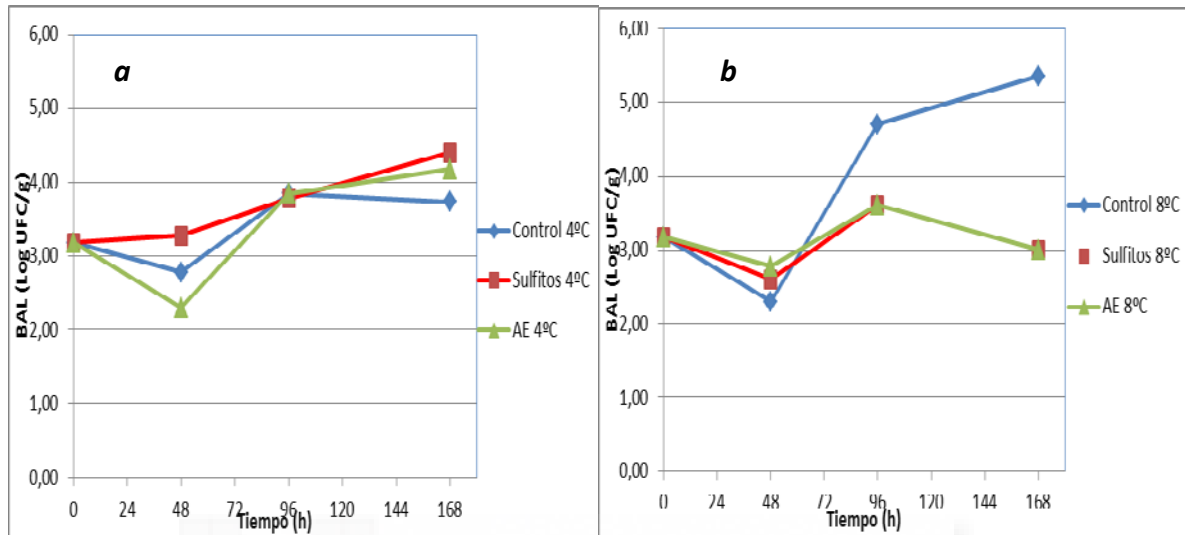


Figura 10. Evolución de las bacterias ácido lácticas (BAL) en los tres lotes de longanizas frescas elaborados (control, sulfitos y AE) durante su conservación a 4°C (a) y 8°C (b).

En este estudio puede observarse que el efecto antimicrobiano del AE del orégano, para los microorganismos estudiados, depende de la Tª y tiempo de almacenamiento. A 4°C su efecto antimicrobiano es superior al sulfito durante los primeros 4 días (96h) de almacenamiento, por los menores recuentos tanto para las BAM y BAL. A 8°C el lote conteniendo AE presentó recuentos próximos al lote con sulfitos, hasta el 4<sup>to</sup> día para BAM, y hasta el 7<sup>o</sup> día para las BAL.

Los recuentos de las enterobacterias alcanzaron unos valores de 2 log UFG/g a tiempo inicial, aumentado significativamente durante el tiempo de almacenamiento ( $p < 0,01$ ), tanto 4°C como 8°C. A 96 horas se observó cómo los lotes conservados a 4°C, presentaron menores valores para todos los lotes que los conservados a 8°C. A 168 horas los valores de los recuentos fueron entre 4-3,63 log UFG/g para 4°C, mientras que a 8°C se alcanzaron valores de 5,26 log UFG/g para el lote con AE, y 3,68 para el lote con sulfitos.

Los resultados del estudio estarían indicando que el AE de orégano podría ser utilizado como sustituto de los sulfitos para controlar la flora alterante presente en los preparados de carne, tipo longanizas fresca. Este efecto podría ser debido a los componentes antimicrobianos como carvacrol y thymol presentes en el AE de orégano.

Skandamis y Nychas (2001) concluyeron que el aceite esencial de orégano añadido a concentraciones de 0,5 y 1% a carne picada reduce el crecimiento microbiano y es capaz de evitar los microorganismos alterantes. Esto lo atribuyen a una reducción de la microbiota inicial de la carne tras la adición del AE.



#### 4.4. Evolución de las propiedades sensoriales en las longanizas frescas elaboradas durante su almacenamiento en refrigeración.

En la tabla 6 se observa la evolución de los resultados del análisis sensorial de los distintos lotes con respecto al tiempo de conservación a los 3, 5 y 7 días (72, 120 y 168 horas respectivamente).

**Tabla 6.-** Evaluación sensorial de las longanizas frescas en los tres lotes elaborados (control, sulfitos y AE) durante el tiempo de conservación a 4°C y 8°C, en crudo y en cocinado.

Tiempo (h)	Tª (°C)	Lote	ANTES DE COCINADO				DESPUES DE COCINADO			
			Color	Brillo	Dc	Limo	Olor	Olor a orégano	Olor	Olor a orégano
72	4	Control	5	4,6	0	0	0	0,6	1,4	1
		Sulfitos	5	6,2	0	0	0,2	0,6	0,8	1
		AE	5	5,8	0	0	1	8,6	1,8	9,6
120	4	Control	6,6	6,3	0,7	0	5,7	0	7,3	0
		Sulfitos	4,2	7,7	1,6	0	1,3	0	2,1	0
		AE	6,6	6,7	1	0	3,1	6,4	3,6	7
	8	Control	6,4	2,4	0,7	0	6	0	7,4	0
		Sulfitos	5	3,4	1,6	0	1	0	2,1	0
		AE	6	2,6	0,3	0	3,1	6,4	3,9	7
168	4	Control	6,2	0	2,5	9	9,3	0	9,3	0
		Sulfitos	4,3	0	0	2,5	5,5	0	6,8	0
		AE	5	0	0	6,3	6,3	5	6,8	5
	8	Control	6,8	0	2,5	10	10	0	10	0
		Sulfitos	7	0	0	2,5	6	0	7,3	0
		AE	5,3	0	0	7,5	8,5	0	8,8	0

Dc: Decoloraciones

Cada valor representa la media de 6 catadores, con respecto a las distintas características organolépticas analizadas en la hoja de catas.

En referencia al atributo color se puede apreciar que se ve afectada por el tiempo, lote y temperatura de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). A 72 horas los catadores no observaron diferencias en el color de los tres lotes, mientras que a los 120 horas, los lotes control y con AE los catadores apreciaron un color más marrón, no observando diferencias entre los dos lotes ( $p > 0.05$ ), este mismo comportamiento se observó entre los lotes conservados a 4 y 8°C. La aparición del color marrón se debe a la transformación de la mioglobina y oximioglobina en metamioglobina y otras formas oxidadas de los pigmentos. Respecto al lote con sulfitos a las 120 horas, tanto conservados a 4 y 8°C, los catadores no observaron amarronamiento en la superficie, este efecto es debido la

actividad conservadora del sulfito, que evita la pérdida del color rojo de los productos cárnicos.

Para 168 horas, los catadores apreciaron diferencias entre los lotes conservados a 4 y 8°C, mientras que a 4°C el control fue el que más valor obtuvo para el color (6,2), por tanto fue valorado con un tono más marrón, a diferencia de los lotes con sulfitos y con AE, que fueron considerados con colores más intermedios. Es interesante destacar que a 8°C, los lotes control y con sulfitos presentaron valores más elevados (6,8 y 7 respectivamente), lo que está indicando que los catadores apreciaron un color pardo, a diferencia del el lote con AE, que tuvo una valoración de 5, 3, aproximamos a los valores de iniciales.

En relación al brillo del producto también se puede apreciar que es una propiedad que se ve afectada por el tiempo, lote y temperatura de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). A las 72 horas, los catadores no apreciaron diferencias de brillo en los lotes con sulfitos y con AE (6,2 y 5,8 respectivamente), mientras que en el lote control se apreció un brillo apagado. A las 120 horas, en el lote conservado a 4°C, tanto en el lote control como en el con AE, los catadores apenas apreciaron una diferencia de brillo entre ellos, mientras que en lote con sulfitos fue el que más valor obtuvo (7,7), por tanto fue valorado con un aspecto más brillante, pero mantenían valores de brillo próximo a de las 72 horas. En el caso del lote a 8°C a 120 horas, los catadores no observaron diferencias en el brillo en los tres lotes, dando una puntuación mucho menor, que se acercaba a un brillo mate (apagado), y por lo tanto se puede decir que se observó una pérdida de luminosidad (apartado 4.1). Respecto a las 168 horas, los catadores observaron que todos los lotes conservados a 4 y 8°C, presentaban un color mate (0).

En relación a las decoloraciones de la superficie, a las 72 horas, los catadores no apreciaron en los distintos lotes (control, sulfitos y AE) ninguna decoloración en la carne. Para las 120 horas, en los lotes conservados a 4 y 8°C, tampoco hubo diferencias para los catadores y podemos decir que apenas hubo decoloraciones de la superficie en los distintos lotes elaborados. Respecto a las 168 horas, tanto conservados a 4 y 8°C, los catadores solo apreciaron decoloraciones en la superficie en el lote control, mientras que en los lotes con sulfitos y AE, tanto a 4 como a 8°C, no observaron decoloraciones en su superficie.

En relación al limo que se pueden producir en la carne, los catadores solamente detectaron variaciones en el producto en el último día de conservación y sobretodo en el lote de 8°C, en control debido a su estado de putrefacción que presentaba se observaba claramente. Y el que menos presencia de limo presentaba eran los sulfitos, tanto, a 4 como a 8°C. La aparición de limo se debe a la proliferación de microorganismos aerobios en la superficie del producto.

También en este estudio se comparó el producto antes y después del cocinado, para los atributos olor (desde normal a anormal/putrefacto) y olor a orégano (desde ausencia hasta intenso). Para los resultados antes del cocinado, en el lote de 4°C, se puede observar que el control va aumentando considerablemente su olor hacia olores anormales ya desde las 120 horas, hasta llegar a ser un olor putrefacto a 168 horas, con un valor máximo de 10 para el control a 8°C. En relación a los lotes con sulfitos y AE, a 120 horas todavía conservaban valores dentro de lo normal, aunque fueron valorados con 1,3 y 3,1 para sulfitos y AE respectivamente. A 168 horas, los catadores apreciaron un aumento hacia valores putrefactos, pero fueron inferiores a los lotes control. En este estudio se deduce que los catadores detectaron olores anormales mucho más tarde en lote sulfitos seguido con AE respecto al control.

Los olores anormales (putrefactos) durante el almacenamiento están relacionados con la alteración aerobia de bacterias y levaduras o por la degradación de ciertos compuestos en la carne (putrescina o cadaverina), que se traduce con la presencia de limo y olores y aromas repugnantes, así como cambios de color.

Con respecto al olor a orégano, a las 72 horas los catadores apreciaron un olor intenso (8,6), mientras que en los lotes con sulfitos y control no presentaban. Respecto al lote con AE a las 120 horas, tanto conservados a 4 y 8°C, los catadores observaron la misma intensidad de olor a orégano para ambos (6,4). Y para las 168 horas, para el lote con AE a 4°C, se apreció un olor intermedio (5), lo que podría estar relacionado con la aparición de compuestos volátiles procedentes de la alteración del producto o con la formación de compuestos de degradación y el aceite esencial lo enmascaraba lo suficiente.

Después del cocinado, los parámetros olor y olor a orégano se intensificaron debido a esos compuestos que se van degradando y por lo tanto producen ese olor anormal (putrefacto), como así detectaron los catadores en los distintos tiempos. A las 72 horas, prácticamente no hubo diferencias en el olor en ninguno de los tres lotes elaborados (control, sulfitos y AE). Respecto al lote control a las 120 horas, tanto conservados a 4 y 8°C, los catadores apreciaron que ya existía un olor anormal (7,3), mientras que los lotes con sulfitos y con AE, a ambas temperaturas conseguían mantener un olor normal después del cocinado. A las 168 horas, en el lote a 4°C, los catadores no apreciaron diferencias de olor en los lotes con sulfitos y AE (6,8 ambos), pero que ya presentaban un olor a putrefacto, mientras que el lote control ya estaba en estado de putrefacción. En el lote a 8°C, los catadores apreciaron la misma tendencia que para el de 4°C.

Con respecto al olor a orégano después del cocinado, a las 72 horas los catadores apreciaron un olor intenso (9,6), mientras que en los lotes con sulfitos y control no presentaban. Respecto al lote con AE a las 120 horas, tanto conservados a 4 y 8°C, los catadores observaron la misma intensidad de olor a orégano para ambos (7). Y para las

168 horas, para el lote con AE a 4°C, se apreció un olor intermedio (5), lo que podría estar relacionado con la aparición de compuestos volátiles procedentes de la alteración del producto o con la formación de compuestos de degradación y el aceite esencial lo enmascaraba lo suficiente. Este efecto también fue observado por Skandamis y Nychas (2001) en donde la carne picada con AE de orégano mantuvo el olor normal hasta los 7 días.

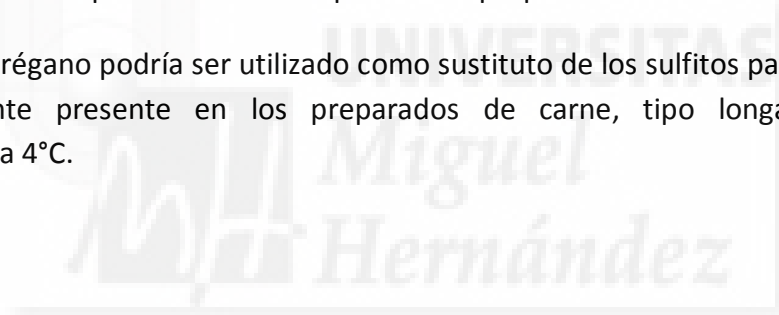
Se puede concluir que la presencia de AE en el producto antes y después del cocinado hasta las 120 horas, estaría evitando la aparición del olor a putrefacto, resultado de la alteración del producto, aunque su efecto es inferior al de los sulfitos.





## 5. CONCLUSIÓN

- 1.- Durante la conservación de los preparados cárnicos debes evitarse temperaturas superiores a 4°C si queremos conservar la calidad de los productos cárnicos durante más de 4 días.
- 2.- El almacenamiento de estos productos a temperaturas superiores a la recomendada (8°C) necesita el uso de conservantes, para controlar la flora microbiana.
- 3.- Desde el punto de vista microbiológico, el aceite esencial de orégano puede ser utilizado como sustituto de los sulfito, en preparados cárnicos. Hasta el 4<sup>to</sup> día (96h) de almacenamiento a 4°C, el efecto antimicrobiano del AE de orégano es superior al del sulfito. A 8°C su efecto antimicrobiano puede ser considerado próximo al del sulfito.
- 4.- El AE de orégano puede actuar mejorando algunas características organolépticas como el color y el olor, en el que se mantiene durante el tiempo de almacenamiento.
- 5.- La presencia de AE en el producto antes y después del cocinado hasta las 120 horas, estaría evitando la aparición del olor a putrefacto propio de la alteración del producto.
- 6.- El AE de orégano podría ser utilizado como sustituto de los sulfitos para controlar la flora alterante presente en los preparados de carne, tipo longanizas fresca, conservados a 4°C.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

AECOSAN (Agencia española de Consumo, Seguridad alimentaria y Nutrición) (2016) [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/Re-evaluacion\\_EFSA\\_sulfitos.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Re-evaluacion_EFSA_sulfitos.pdf)

ASCIA (Sociedad Australiana de inmunología clínica y alergias). (2014). Pacientes y consumidores. Otras alergias. Sulfitos. <http://www.allergy.org.au/patients/product-allergy/sulfite>

Albado Plaus, E., Saez Flores, G., y Grabiél Ataucusi, S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Médica Herediana*, 12(1), 16-19

Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., y Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9), 4168-4170.

Alves-Silva, J. M., dos Santos, S. M. D., Pintado, M. E., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., y Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control*, 32(2), 371-378.

Ávila-Mesa, I. (2016). Los sulfitos como conservantes y su control en los alimentos: ¿Beneficio o riesgo para la salud? Madrid+Salud. Aditivos Alimentarios. <http://www.madridsalud.es/temas/aditivos.php>

Bote, C. L., Olivares, A., Fernández, E., Ramírez, P., y Rey, A. I. (2005). Estrategias genéticas y nutricionales en la modificación de la composición de la carne. *DERIVADOS CÁRNICOS FUNCIONALES: ESTRATEGIAS Y PERSPECTIVAS*, 55).

Boushey, H. A. (1982). Bronchial hyperreactivity to sulfur dioxide: physiologic and political implications. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 69(4), 335-338.

Bover-Cid, S., Miguélez-Arrizado, M. J., y Vidal-Carou, M. C. (2001). Biogenic amine accumulation in ripened sausages affected by the addition of sodium sulphite. *Meat Science*, 59(4), 391-396.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., y Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan.(Asteraceae). *Journal of ethnopharmacology*, 87(2), 215-220.

Carson, C. F., Mee, B. J., y Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.

Cruz, J. (2015). El sector español de tecnología para la industria cárnica sobrevive al estancamiento de la demanda nacional merced a las exportaciones. *Eurocarne: La revista internacional del sector cárnico*, (235), 95-104

Dabbah, R., Edwards, V. M., y Moats, W. A. (1970). Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Applied microbiology*, 19(1), 27-31.

Escalante, A. S., Urrutia, G. R. T., Arriola, J. P. C., Méndez, N. F. G., y Watanabe, G. H. (2008). Sistemas combinados de conservación para prolongar la vida útil de la carne y los productos cárnicos. *Nacameh*, 2(2), 124-159

Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in food science & technology*, 19(3), 156-164.

Frankel, E. N. (1984). Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(12), 1908-1917.

Galián Jiménez, M. (2008). Características de la canal y calidad de la carne, composición mineral y lipídica del cerdo Chato Murciano y su cruce con Ibérico. Efecto del sistema de manejo. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

García-González, B. (2013). Actividad antimicrobiana de films de quitosano con aceite esencial de *Oreganum compactum*. Trabajo Fin de Máster, (Máster Universitario de Investigación en Ciencia, Tecnología y Control de los Alimentos). UMH.

Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., y Georgakis, S. A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 C. *Meat science*, 76(1), 172-181.

Gombau-Escuin, J. y Palomares Hidalgo, S. (2012) Guía de prácticas correctas de higiene el sector cárnico. Editado por FEDACOVA. Generalitat Valenciana.

Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat science*, 49(4), 447-457.

Hzounda, J. B. F., Jazet, P. M. D., Lazar, G., Răducanu, D., Caraman, I., Bassene, E., Boyoma, F.F. y Lazar, I. M. (2016). Spectral and chemometric analyses reveal antioxidant properties of essential oils from four Cameroonian *Ocimum*. *Industrial Crops and Products*, 80, 101-108.

Izuriaga Escudero, V. (2014). Verificación de un equipo de análisis rápido de determinación de dióxido de azufre en alimentos.

James M. Jay (2002). *Microbiología moderna de los alimentos*. 4ª edición.

Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C., y Svendsen, A. B. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta médica*, 53(05), 395-398.

Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., y Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of applied bacteriology*, 76(6), 626-631.

Lester, M. R. (1995). Sulfite sensitivity: significance in human health. *Journal of the American College of Nutrition*, 14(3), 229-232.

López-Malo, A., Palou, E., León-Cruz, R., y Alzamora, S. M. (2006). Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. In *Advances in food mycology* (pp. 261-286). Springer US.

Martínez, A. (1996). Aceites esenciales. *J. Nat. Prod*, 59(1), 77-79.

Martínez, L., Berruezo, G. F. R., y Martínez, G. N. (2015). Situación actual del empleo de aditivos sintéticos en preparados cárnicos y nuevas tendencias para la sustitución de los mismos. *Eurocarne: La revista internacional del sector cárnico*, (241), 49-55

Mischek, D., y Krapfenbauer-Cermak, C. (2012). Exposure assessment of food preservatives (sulphites, benzoic and sorbic acid) in Austria. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(3), 371-382.

Nychas, G. J. E. (1995). Natural antimicrobials from plants. In *New methods of food preservation* (pp. 58-89). Springer US.

OCU. (2015). OCU detecta altas dosis de aditivos y otros tipos de carne en preparados de carne de vacuno. *Notas de Prensa. Alimentación*. <https://www.ocu.org/organizacion/prensa/notas-de-prensa/2015/carnepicada>

Paleari-Bianchi, M., Beretta, G., Cattaneo, P., & Balzaretto, C. (1985). Solfito e maturazione degli insaccati crudi stagionati. *Industrie Alimentarie*, 24(4), 371-376.

Pérez-Álvarez, J.A. (2006) Capítulo 6.- El color. En: Y.H. Hui, I.Guerro y M.R. Rosmini. *Ciencia y Tecnología de carnes*. Editorial: LIMUSA, S.A. de C.V. y GRUPO NORIEGA EDITORES (México), 161-198.

Prandl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T., y Sinell, H. J. (1994). *Tecnología e higiene de la carne* (No. TS1975. T42 1994.). Acribia.

REAL DECRETO 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.

REAL DECRETO 1118/2007, de 24 de agosto, por el que se modifica el Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.

REGLAMENTO (UE) Nº 1129/2011 DE LA COMISIÓN de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión.

Ruiz-Capillas, C., y Jiménez-Colmenero, F. (2009). Application of flow injection analysis for determining sulphites in food and beverages: A review. *Food Chemistry*, 112(2), 487-493.

Sayas-Barberá, E., Quesada, J., Sánchez-Zapata, E., Viuda-Martos, M., Fernández-López, F., Pérez-Alvarez, J. A., & Sendra, E. (2011). Effect of the molecular weight and concentration of chitosan in pork model burgers. *Meat science*, 88(4), 740-749.

Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky, Z., y Yehoshua, Y. (2013). Natural antioxidants: function and sources. *Food and Nutrition Sciences*, 4(6), 643.

Skandamis, P. N., y Nychas, G. J. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1011-1022.

Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, H. A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., ... & Sahin, F. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food control*, 15(8), 627-634

Solórzano-Santos, F., y Miranda-Navales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 136-141.

Vally, H. y Misso, N. L. (2011). Adverse reactions to the sulphite additives. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 5(1).

Varnam, A. H. y Sutherland, J. P. (1998). *Carne y productos cárnicos, tecnología, química y microbiología*.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2007). Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of Food Safety*, 27(1), 91-101.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., y Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food control*, 19(12), 1130-1138.

Viuda-Martos, M., Ruiz Navajas, Y., Sánchez Zapata, E., Fernández-López, J., y Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(1), 13-19.

Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V. y Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat science*, 86(1), 196-213.

Zubeldia Lauzurica, L., y Gomar Fayos, J. (1997). Presencia de sulfitos en carne picada y preparados de carne elaborados en industrias de la Comunidad Valenciana. *Revista Española de Salud Pública*, 71(4), 401-407.

