



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Polifenoles del Romero en la Dieta del Cordero:
Efecto sobre la Calidad y Capacidad de
Conservación de la Carne

D. Jordi Ortuño Casanova
2016



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Polifenoles del romero en la dieta del cordero: efecto sobre la calidad y capacidad de conservación de la carne

Rosemary polyphenols in the diet of lambs: effect on meat quality and preservative capacity

D. Jordi Ortuño Casanova

2016

Agradecimientos

Siempre que termina una etapa del viaje es bueno acordarse de toda la gente que te ha hecho compañía a lo largo de ese tiempo: desde los que te permitieron coger este tren, el Profesor Sancho Bañón, hasta los que te permitieron realizar paradas exóticas, como Damian y María; o incluso el que pagó el billete, como es la Universidad de Murcia. Aunque sin duda en este trayecto son tus compañeros de vagón (y los del vagón vecino) con los que verdaderamente compartes las peripecias del viaje. Paola, Adriana y Rafa, gracias por reírme las innumerables gracias y ser conejillos de indias de mi humor, aunque generalmente fueran risas verdaderas. Víctor, Rocío, Piter, Macarena, Miriam... no habría sido lo mismo sin vosotrxs. Gracias por colaborar con mis controles de temperatura y demás quimeras. Por último, agradecer a aquellos que te despiden al inicio del viaje y te reciben cuando regresas, y están ahí en todas y cada una de las paradas: a mi familia, incluida Úrsula (y Juseín), gracias.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Calidad de la carne de cordero	6
1.1.1 Definiciones	6
1.1.2 Factores que afectan a la calidad	11
1.1.3 Mecanismos de deterioro de la calidad	14
1.1.3.1 Deterioro oxidativo	14
1.1.3.2 Deterioro microbiológico	20
1.1.3.3 Exudación	22
1.2 Estrategias para extender la vida comercial de la carne de cordero	22
1.2.1 Aplicación de frío	23
1.2.2 Envasado y atmósferas protectoras	23
1.2.3 Iluminación	26
1.2.4 Aditivos conservantes	27
1.2.5 Tecnología de obstáculos	31
1.2.6 Empleo de fitoquímicos en alimentación animal	31
1.3 Uso de romero y derivados en alimentación animal	37
1.3.1 Productos derivados del romero y sus propiedades	37
1.3.2 Carnes reforzadas con romero	45
1.3.3 Factores que determinan la eficiencia de los extractos dietéticos de romero para conservar la carne	50
2. Justificación y objetivos	57
2.1 Justificación	59
2.2 Objetivos	63
3. Metodología	65
4. Resultados y discusión	71
4.1 Trabajo 1: <i>Relationship between antioxidant status and oxidative stability in lamb meat reinforced with dietary rosemary diterpenes</i>	73
4.2 Trabajo 2: <i>Antioxidant and antimicrobial effects of dietary supplementation with rosemary diterpenes (carnosic acid and carnosol) vs vitamin E on lamb meat packed under protective atmosphere.</i>	81
4.3 Trabajo 3: <i>Use of dietary rosemary diterpenes to extend the preservation of sulphited-lamb products.</i>	89
5. Conclusiones	99
6. Difusión de resultados	105
7. Resumen	109
8. Bibliografía	117

Índice de Tablas y Figuras

Introducción

Tabla 1. Contenido en lípidos de las distintas piezas de carne ovina (por 100 g)	8
Tabla 2. Principales compuestos volátiles identificados en carne de cordero	19
Tabla 3. Cuadro resumen de los estudios orientados a reducir sulfitos, nitritos y nitratos en la carne mediante el uso de compuestos naturales	30
Tabla 4. Cuadro resumen de los estudios sobre suplementación dietética con α -tocoferol realizados en ovino	34
Tabla 5. Composición porcentual del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	39
Tabla 6. Concentración de los principales compuestos polifenólicos presentes en diferentes extractos de hoja de romero (CA 1-CA 5 y RO) (% contenido absoluto)	42
Tabla 7. Cuadro resumen de los estudios sobre suplementación dietética con romero realizados en ovino	49
Figura 1. Medallones de lomo crudo de cordero con distintas formas de mioglobina	16
Figura 2. Interconversiones de la mioglobina según el estado de oxidación del hierro y el ligando del grupo hemo	17
Figura 3. Estructura química del tocoferol	33
Figura 4. Procesado industrial del romero	38
Figura 5. Esquema de extracción de seis extractos de romero diferentes (CA 1- CA 5 y RO)	41
Figura 6. Estructura molecular de los principales compuestos antioxidantes aislados en romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	44
Figura 7. Rutas de polifenoles dietéticos y sus metabolitos	52
Figura 8. Resumen proceso de optimización del extracto dietético de romero	56
Trabajo 1	
Tabla 1. Ewe and Lamb feed composition	74
Tabla 2. Dietary effects on the antioxidant status assessed in fresh lamb	77
Tabla 3. Dietary effects on the increased values of colour and oxidation parameters assessed in fresh lamb throughout storage time	77
Tabla 4. Pearson's correlations between C ₁₉ H ₂₂ O ₃ diterpenic metabolite, antioxidant status and meat oxidation values determined in fresh and/or chilled-packed lamb	78
Figura 1. Concentration of C ₁₉ H ₂₂ O ₃ diterpenic metabolite in fresh lamb loin	77

Trabajo 2

Tabla 1. Ingredients and chemical composition of the experimental basal diet used in fattening lambs	82
Tabla 2. Proximate composition of lamb loin from the different dietary trials	84
Tabla 3. Effects of diet and storage time on the microbial counts of lamb loin kept in retailing conditions for up to 18 days	84
Tabla 4. Effects of diet and storage time on the physical-chemical parameters measured in lamb loin kept in retailing conditions for up to 18 days	85
Tabla 5. Effects of diet and storage time on the appearance and odor of lamb loin kept in retailing conditions for up to 18 days	85
Tabla 6. Polynomial regression equations used to calculate the shelf-life of lamb loin	86

Trabajo 3

Tabla 1. Target ions, linear retention indexes and secondary ions used to determine Volatile Oxidation Compounds (VOCs)	91
Tabla 2. Effects of diet and SO ₂ addition level on CIELab colour and pH of lamb patties kept in retail conditions for up to 12 days	92
Tabla 3. Effects of diet and SO ₂ addition level on the total carbonyls (POx), water holding capacity (WHC) and volatile oxidation compounds (VOCs) of lamb patties kept in retail conditions for up to 12 days	93
Tabla 4. Effects of diet and SO ₂ addition level on the spoilage bacteria counts of lamb patties kept in retail conditions for up to 12 days	94
Tabla 5. Effects of diet and SO ₂ addition level on the appearance and odor of lamb patties kept in retail conditions for up to 12 days	94
Tabla 6. Polynomial regression equations used to calculate the shelf-life of raw lamb patties	95
Figura 1. Estimated time of raw lamb patties according to their loss of freshness	95

Abreviaturas

°C	Grados Centígrados
ΔDC	Cambio en la descoloración
ΔE	Cambio en el color CIEL*a*b*
ΔHex	Cambio en concentración de Hexanal
ΔOR	Cambio en el Olor Rancio
μg	Microgramo
μm	Micrometro
a*	Coordenada rojo verde a*
AAS	<i>Amino adipic semialdehyde</i>
Abs	Absorbancia
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AGI	Ácidos Grasos Insaturados
AGPI	Ác. Grasos Poliinsaturados
AGS	Ác. Grasos Saturados
ANOVA	Análisis de Varianza
b*	Coordenada azul amarillo b*
BAL/LAB	Bacterias ácido-lácticas
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CAT	Catalasa
CE	Comunidad Europea
CFU/UFC	<i>Colony-forming unit</i> / Unidad Formadora de Colonia
C*	Índice de saturación o <i>Chroma</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CRA / WHC	Capacidad de Retención de Agua
DFD	<i>Dry Firm Dark</i>

DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DRE/EDR	<i>Dietary Rosemary Extract</i>
EEUU	Estados Unidos de América
ENB	Enterobacterias
eV	Electronvoltio
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FRAP	<i>Ferric Reducing Ability Power</i>
gr	Gramo
<i>g</i>	Medida de aceleración (centrífuga)
GGs	<i>Gamma-glutamic semialdehyde</i>
GPx	Glutathion Peroxidasa
GRAS	<i>Generally Recognised As Safe</i>
GSH	Glutathión
GSSG	Glutathión disulfido
h	Hora
H*	Tono o ángulo Hue
HDLAE	Hoja Destilada Libre de Aceite Esencial
IC ₅₀	Concentración inhibitoria máxima media
IDR	Ingesta Diaria Recomendada
IGP	Indicación Geográfica Protegida
ISO	<i>International Standard Organization</i>
IU	<i>International Unit</i>
kg	Kilogramo
lx	Lux
m	Metro
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura , Alimentación y Medio Ambiente
MAP	Atmósfera modificada (70% O ₂ / 30% O ₂)
MDA	Malondialdehído
min	Minuto
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MS	Detector de Espectrometro de Masas
O ₂	Oxígeno molecular

OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMs	Plantas Aromático Medicinales
POx	Oxidación de Proteínas (carbonilos totales)
ROS	<i>Reactive Oxidative Species</i>
SO ₂	Sulfitos / Dióxido de Azufre
SOD	Superóxido Dismutasa
TBARS	Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TVC	Mesófilos totales (<i>Total Viable Counts</i>)
UE	Unión Europea
UV-vis	Detector Ultravioleta – Visible
VOC / CVMO	<i>Volatile Oxidation Compound</i> / Compuesto Volátil Marcador de la Oxidación

1. Introducción

Introduction

La carne es un alimento perecedero cuya vida útil va a estar limitada por fenómenos de oxidación y por la actividad de microorganismos que encuentran en la carne un substrato idóneo para su desarrollo. La oxidación lipídica y de la mioglobina darán lugar a la aparición de rancidez y a la pérdida del color rojo característico, respectivamente, mientras que el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes puede a su vez comprometer la salubridad y calidad sensorial de la carne. La capacidad de conservación de la carne fresca es muy limitada – un filete en contacto con el aire puede alterarse en horas o pocos días - y va a estar influida, tanto por factores intrínsecos (genética, alimentación, edad, estrés, etc.), como por factores extrínsecos asociados a su procesado y distribución (fileteado, enfriamiento, envasado, etc.). Por su parte, los sistemas actuales de comercialización requieren de métodos de conservación cada vez más eficaces que aseguren la calidad de la carne sometida a una manipulación previa (fileteado, envasado, platos listos para comer, etc.) y mantenida en refrigeración, todo ello, pese a que la Legislación Alimentaria es cada vez más restrictiva con el uso de aditivos conservantes. En cuanto a los productos cárnicos, el binomio Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura – Organización Mundial de la Salud (FAO-OMS) viene instando a limitar y/o reducir el uso de sulfitos y nitrosos-nitritos, los aditivos conservantes más extendidos en este tipo de productos, debido a los riesgos que entrañan para la salud (FAO-OMS, 2009).

Así pues, las limitaciones legales, las recomendaciones sanitarias, la presión por parte de una sociedad cada día más consciente y responsable ética y ecológicamente, junto con algunos escándalos alimentarios asociados a la producción cárnica, han creado un caldo de cultivo que, a falta en muchas ocasiones de sentido común y responsabilidad cívica, está obligando cada vez más a la industria cárnica a orientar sus esfuerzos, en primer lugar, para conseguir una producción cárnica más sostenible, y, en segundo lugar, para conservar la carne de manera más natural. En referencia a la primera premisa, la ganadería de pequeños rumiantes, como la oveja Segureña utilizada en el presente trabajo, es una actividad asociada a zonas rurales, a menudo vinculada a sistemas de producción tradicionales, que impide una mayor despoblación de las mismas. Este tipo de ganadería permite aprovechar tanto recursos pastables como subproductos vegetales, en muchos casos infravalorados, que pueden proporcionar

Introducción

propiedades beneficiosas al animal y la carne, lo cual permitiría enlazar la primera con la segunda premisa.

Diferentes estudios han confirmado la posibilidad de aumentar la capacidad endógena de conservación de la carne mediante la ingestión de productos secundarios de plantas ricas en compuestos conservantes activos (Vasta y Luciano, 2011). Las técnicas de suplementación dietética con conservantes naturales incorporados al pienso han demostrado ser altamente efectivas, ya que muchos principios activos se metabolizan y depositan en las membranas celulares del tejido muscular y adiposo, donde llevan a cabo su acción de forma más efectiva (Kerry, Buckley, Morrissey, O'Sullivan, y Lynch, 1998; Govaris, Botsoglou, Papageorgiou, Botsoglou, y Ambrosiadis, 2004). Entre las plantas estudiadas, las plantas aromático-medicinales (PAMs), ricas en compuestos fenólicos, suscitan un especial interés debido a que su asimilación a través de la dieta de los corderos da lugar a una óptima actividad antioxidante y/o antimicrobiana.

En este contexto, el uso dietético de romero y sus derivados ha demostrado ser eficaz para incrementar la capacidad de conservación de la carne ovina (Bañón, Méndez, y Almela, 2012; Morán, Andrés, Bodas, Prieto, y Giráldez, 2012a; Morán *et al. et al.*, 2012b; Morán *et al. et al.*, 2013; Nieto, Díaz, Bañón, y Garrido, 2010a; Nieto, Bañón, y Garrido, 2012; Ortuño, Serrano, Jordán, y Bañón, 2014; Serrano, Jordán y Bañón, 2014a; Serrano, Ortuño, y Bañón, 2014b) por encima de otras plantas aromáticas similares como el tomillo (Moñino, Martínez, Sotomayor, Lafuente, y Jordán, 2008; Nieto, Bañón, y Garrido, 2012; Gema Nieto, Díaz, Bañón, y Garrido, 2010b).

Los trabajos conjuntos desarrollados en los últimos años por el grupo de Tecnología Alimentaria de la Universidad de Murcia y el Departamento de Plantas Aromáticas y Medicinales del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (IMIDA), que van desde el testaje de la hoja destilada libre de aceite esencial hasta la optimización del ratio y la dosis de diterpenos en un extracto tipificado de la misma (Moñino *et al. et al.*, 2008; Jordán, Moñino, Martínez, Lafuente, y Sotomayor, 2010; Nieto *et al. et al.*, 2010a, 2012; Bañón *et al. et al.*, 2012; Jordán *et al. et al.*, 2014; Ortuño *et al. et al.*, 2014; Serrano *et al. et al.*, 2014ab) han permitido obtener y registrar la

patente Nacional número 201230114 “Extracto de romero y su uso en alimentación animal”. Dicha patente se refiere a la composición del extracto vegetal procedente de hoja de romero compuesto por los diterpenos ácido carnósico y carnosol, al empleo de dicho extracto en la fabricación de pienso para alimentación animal, al propio pienso suplementado con dicho extracto y también al método de obtención del extracto vegetal de la invención.

Cualquier estrategia que contribuya a mejorar la calidad de la carne ovina de forma natural y a revalorizar la producción agropecuaria será bienvenida en el sector. El sector ovino en España representa el 6,7% de la producción ganadera y el 1,9% de la producción final agraria nacional, siendo España el segundo país productor de cordero de la Unión Europea (UE), con un 20% de la cuota de mercado, por detrás del Reino Unido. A pesar de estos datos, el sector vive actualmente una crisis sin precedentes, con un descenso en la producción del 10% y con una caída en el consumo que supera el 40%, pasando de los 2,8 kg *per capita* en 2009 a los 1,7 kg *per capita* en 2014. Como dato positivo, la exportación de corderos y carne ovina a otros países se ha incrementado fuertemente en los últimos años (MAGRAMA, 2015). Vista la evolución del mercado, el éxito de la producción sostenible de cordero podría pasar por producir carne de calidad diferenciada, con un mayor valor comercial.

1.1 Calidad de la carne de cordero

1.1.1. Definiciones

Becker (2005) define como **atributos de calidad** aquellos rasgos del producto percibidos por el consumidor y los distingue de las **características de calidad** que pueden ser medidas por métodos científicos. De esta forma podemos establecer un criterio a la hora de discernir entre los atributos considerados relevantes que se nos vienen a la cabeza cuando hablamos de calidad de la carne; y las características que podrán ser medidas y, por tanto, modificadas mediante diversas técnicas. El éxito en la mejora de la calidad cárnica dependerá de la capacidad de los productores y científicos para interpretar los atributos y encontrar el medio de modificar ciertas características que repercutan sobre los mismos. Desde el punto de vista del consumidor, la carne, como cualquier otro alimento, debe ser segura, conveniente para su consumo, saludable, sabrosa y producida en concordancia con valores éticos y personales (Kerth, 2013).

Calidad sensorial: la **carne cruda** de cordero se caracteriza por presentar un color rojo brillante e intenso, un nivel moderado de grasa infiltrada y una escasa exudación gracias a su elevada capacidad de retención de agua (Onega, Miguel, Blázquez, y Ruiz de Huidobro, 2001). Presenta un ligero olor metálico o a suero debido a la presencia de hierro de la sangre y un escaso contenido en componentes aromáticos, aunque sí contiene los precursores de éstos. Por este motivo, el **color es el principal atributo de calidad en la carne fresca** mediante el cual el consumidor juzga su frescura y calidad antes de comprar. El color de la carne (y su posterior degradación) depende de factores como (i) el pH del músculo; (ii) la capacidad antioxidante; (iii) el estado de oxidación de los pigmentos musculares; y (iv) la oxidación de los lípidos. Las proteínas musculares se desnaturalizan gradualmente a medida que el pH muscular cae del nivel homeostático tras el sacrificio, lo que conlleva una mayor reflectancia y una consecuente pérdida de intensidad del color. Por su parte, el nivel de mioglobina, el estado de oxidación del núcleo de hematina de la mioglobina y el compuesto unido al ligando de la misma definirán el color de la carne. El nivel de mioglobina del músculo es muy alto en los rumiantes en comparación con otras especies de abasto, aumentando conforme mayor es la cantidad de fibras rojas y la edad del animal,

mientras que el estado del hierro (ferroso o férrico) del anillo de porfirina y el compuesto unido al ligando estará influido principalmente por las condiciones de almacenamiento. En el caso del cordero, el contenido muscular en mioglobina se encuentra en torno a 2,5 mg/g, frente a los 4,6 mg/g de un ternero de 3 años o los escasos 0,3 mg/g de la carne de cerdo (Miller, 1994), lo que permite clasificar esta carne como **carne roja**.

Calidad nutricional: existe una amplia discusión sobre los beneficios y prejuicios del consumo de carne en general, y de carne roja en particular. La carne, para lo bueno y para lo malo, es un alimento con una elevada densidad de nutrientes. Es una de las principales fuentes de proteína de una dieta omnívora, tratándose además de **proteína de gran calidad** dado que aporta todos los aminoácidos esenciales. Igualmente supone una **fuerza importante de hierro** tanto hemo, el más fácilmente biodisponible, como no-hemo; respecto a este último, se ha comprobado que el “factor carne”, junto con la vitamina C, son los únicos factores dietéticos que potencian la absorción de hierro no-hemo, menos biodisponible para el organismo (Cook y Monsen, 1999). Otros micronutrientes destacados aportados por la carne son el zinc, el selenio, fósforo y vitaminas del grupo B.

En contraposición, la carne roja presenta un perfil lipídico considerado menos saludable en comparación con otros tipos de carne (tabla 1). La composición en ácidos grasos de la carne se debe en gran medida a los ácidos grasos presentes en la dieta. En el caso de los rumiantes, los microorganismos del rumen hidrogenan una proporción sustancial de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) ingeridos, lo cual resulta en una mayor deposición muscular de ácidos grasos saturados (AGS) (Sinclair *et al.*, 2005). El ratio AGI/AGS en una dieta equilibrada sería de 0,4, mientras que la carne de cordero posee un ratio AGI/AGS de 0,1 (Enser, Hallett, Hewitt, Fursey, y Wood, 1996), por lo que su consumo estaría asociado a un mayor riesgo de padecer problemas cardiovasculares. El ratio n-6 /n-3 de AGPI es otro índice nutricional que afecta al riesgo cardiovascular y de otras enfermedades; en este caso, un ratio por encima de 4 es considerado óptimo para la salud, presentando la carne de cordero un ratio entre 1-2 (Enser *et al.*, 1996). La biohidrogenación de los ácidos grasos por las bacterias

Introducción

ruminales también da lugar a la formación de ácidos grasos trans, de gran importancia nutricional, ya que el consumo de carne supone un 18% de la ingesta total de este tipo de ácidos grasos perjudiciales para la salud (Higgs, 2005). Como consecuencia de todo ello, la modificación el perfil de ácidos grasos de carnes rojas como la de cordero es un hito perseguido por la investigación en producción animal.

Tabla 1. Contenido en lípidos de las distintas piezas de carne ovina (por 100 g)

Pieza cárnica	AGMI (g)	AGS (g)	AGPI (g)	AGtrans (g)
Pierna	4,95	7,06	0,59	0,33
Paletilla	7,26	7,14	0,90	0,89
Chuleta palo	6,49	9,57	0,84	0,37
Chuleta riñonada	6,85	9,42	0,83	0,39

Fuente: FEN-FEDECARNE, 2009

Aparte de por su perfil lipídico, el consumo de carne roja se ha visto asociado a un incremento en la incidencia de distintos tipos cáncer, con especial énfasis en el de cáncer colorrectal (Higgs, 2005). Una dieta excesivamente rica en proteína, la presencia de hierro y compuestos producidos durante la cocción (aminas heterocíclicas) junto con el contenido en grasas saturadas parecen ser las principales razones nutricionales que apuntan al consumo de carne como causa promotora del desarrollo de cáncer. Las empresas productoras de carne se encargan de promulgar insistentemente que el desarrollo de cáncer y de enfermedades cardiovasculares es un proceso multifactorial, que es importante llevar una dieta variada (“No hay alimentos buenos o malos. Hay buenas o malas dietas”). Si bien este hecho es cierto, igualmente lo es que debería recomendarse un consumo moderado de carne y productos cárnicos debido a los grandes indicios que lo vinculan con enfermedades no transmisibles. Las recomendaciones sobre el método de preparación/cocción para reducir la formación de compuestos tóxicos o para fomentar el concepto de la “carne magra” como potencial alimento funcional, hacen sospechar de ciertos intereses lejanamente relacionados con la salud del consumidor. Afortunadamente, la OMS parece haber dado un golpe sobre de la mesa en este sentido con su reciente informe considerando la carne roja y los productos cárnicos elaborados con agentes nitrificantes como posibles y potenciales agentes cancerígenos, respectivamente.

Calidad higiénica/toxicológica: a pesar de su mejor o peor perfil nutricional la carne no se puede considerar *per se* como una fuente de sustancias perjudiciales para la salud. Las bacterias y compuestos tóxicos presentes en la carne pueden proceder de la crianza del animal (residuos antibióticos, promotores del crecimiento, residuos de metales pesados, etc.), contaminantes (*Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, etc.) o aditivos (sulfitos, nitritos, etc.). El riesgo de **zoonosis animales** es probablemente la cuestión relacionada con la carne que despierta mayor preocupación en la opinión pública. A raíz de la “crisis de las vacas locas” el sistema de producción cárnica se vio obligado a efectuar una serie de cambios importantes, aunque más de forma que de contenido. El paquete de medidas higiénicas desarrollado por la UE en la pasada década ha supuesto un antes y un después en el sistema de control e inspección alimentario. Si bien es cierto que la introducción del concepto de trazabilidad “del campo a la mesa” ha supuesto una mejora en el control alimentario, otras crisis en el sistema cárnico como el de las dioxinas en pollos, la gripe aviar, la gripe porcina o la infección de brotes de soja por estiércol contaminado con la cepa de *E. coli* O104:H4 hacen pensar en un problema de fondo en el sistema de producción de alimentos que pone en riesgo la seguridad alimentaria. De cara a obtener carne con una buena calidad higiénica será necesario implementar y establecer controles que aseguren unas buenas prácticas durante toda la fase de producción, sacrificio y conservación de los alimentos.

Respecto a los **aditivos alimentarios**, su uso se basa en un balance donde el beneficio para la salud y/o el deterioro del alimento sea superior al perjuicio ocasionado. Con excepción de los compuestos *GRAS* (*Generally Recognised As Safes*), los límites máximos permitidos de aditivos se basan sobre todo en estudios de toxicidad aguda. Sin embargo, debido a la presión por parte del consumidor, las nuevas legislaciones y recientes estudios de toxicidad a largo plazo, se aboga por reducir lo máximo posible sus dosis para rebajar el posible impacto sobre la salud. En este sentido, las propiedades de las PAMs y sus derivados, junto con otros productos naturales (quitosano, té verde, semilla de uva, etc.) están emergiendo como potenciales alternativas, si no para eliminar totalmente la necesidad de aditivos, sí al menos para

Introducción

reducir su dosis (Bañón, Díaz, Rodríguez, Garrido, y Price, 2007; Roller *et al.*, 2002; Serrano y Bañón, 2012).

Calidad ética/ambiental: actualmente existen una preocupación e interés crecientes en torno a la sostenibilidad de la intensificación de las industrias animales y su potencial impacto negativo sobre el medio ambiente, la salud humana y el bienestar animal (Montossi *et al.*, 2013). En algunos sectores de consumidores, factores tales como el origen del producto, las prácticas generales de producción, el bienestar animal, los valores sociales y religiosos, el cambio climático, la contaminación del aire y del agua, y la salud humana, parecen ser decisivos en la decisión de compra (Font i Furnols *et al.*, 2009; Grunert, 2006; Troy y Kerry, 2010). Por ejemplo, cabe esperar que la carne procedente de una explotación ultraintensiva basada en razas con una elevada selección genética y piensos elaborados con materias primas transgénicas que provienen de cultivos en zonas selváticas deforestadas puede generar rechazo en ciertos consumidores, sobre todo en países desarrollados. El fomento de la biodiversidad (uso de razas autóctonas), sistemas de cría más extensivos y respetuosos con el medio ambiente y una alimentación más sostenible y natural se orientan hacia la producción de carne con calidad diferenciada. En este sentido, los sistemas de calidad garantizada, como los protocolos de pertenencia a Indicaciones Geográficas Protegidas (IGPs), pueden significar una herramienta útil para orientar la producción cárnica.

Calidad tecnológica: las carnes con una buena calidad tecnológica son aquellas que presentan ciertas características dentro de unos rangos que favorecen su procesado y conservación. Algunos de los atributos de la carne con un mayor impacto tecnológico son el color y nivel de pigmentos hemáticos, el pH, la capacidad de retención de agua, el contenido en tejido conectivo, junto con el contenido en grasa intramuscular y su grado de saturación. Se podría incluir también en este apartado la carga de bacterias alterantes (*Pseudomonas spp.*, enterobacterias, *Brochrotrix thermosphacta*, bacterias ácido-lácticas -BAL-), que no suponen a priori un riesgo de zoonosis, pero que sí pueden dar lugar a la pérdida de las características propias de la carne. La mejora de la calidad tecnológica de la carne podrá, por tanto, incrementar la capacidad de

adaptación de la misma a los nuevos métodos de procesado, distribución y comercialización (exposición en lineales de supermercado, formatos convenientes, iluminación infrarroja, atmósferas modificadas, etc.), y en consecuencia, alargar su vida útil.

1.1.2 Factores que afectan a la calidad de la carne

La calidad de los alimentos a base de músculo está a expensas del proceso de conversión del músculo en carne. Los cambios *ante-* y *postmortem* afectan a muchos de los atributos de calidad comentados anteriormente como la terneza, el sabor, la jugosidad y el color.

Se sabe que un elevado número de propiedades sensoriales de la carne están relacionadas con **factores de tipo genético**, como el individuo, la raza, el cruce o el sexo. Las características de la carne de animales pertenecientes a una misma comunidad genética puede variar debido a la variación de intensidad en los fenómenos digestivos y metabólicos de cada individuo, aunque las diferencias suelen ser más acentuadas entre individuos de diferentes razas y cruces ovinos, por ejemplo, en características tales como el nivel de pigmentos hemáticos, tejido conectivo y grasa intramuscular.

Con independencia de los factores genéticos, la calidad de la carne depende de las especificaciones de producción durante la cría de los animales. La **edad al sacrificio** afecta a la composición de la carne ovina y, por ende, a su calidad. Los principales tipos de corderos comerciales en España son el cordero lechal, sacrificado con menos de un mes y medio de edad y hasta 8 kg en canal, el cordero ternasco (menos de 3 meses y 8-13 kg en canal) y el cordero pascual (4-8 meses y más de 12 kg en canal) (MAGRAMA, 2015). La reglamentación de la UE considera corderos a los ovinos con menos de 12 meses de edad y hace una clasificación diferente, más adaptada al tipo de canales pesadas que se producen en el centro y norte de Europa, que básicamente distingue entre corderos ligeros (menos de 13 kg en canal) y pesados (desde 13 kg en canal en adelante). El cordero lechal, como su propio nombre indica, se alimenta con leche

Introducción

materna o con lacto-reemplazante, y se sacrifica con menos de 40 días de edad y menos de 6 kg en canal. Su producción es típica de algunos países mediterráneos de Europa, proporcionando una carne tierna y jugosa, poco pigmentada, relativamente magra, que presenta un débil aroma y sabor propio a cordero. El cordero rumiante en sus diversas denominaciones es el tipo comercial más extendido en el mundo. Por ejemplo, **el cordero ternasco**, objeto del presente estudio, es criado primero con leche y/o lacto-reemplazantes, destetado a los 45 días aproximadamente, y alimentado después con pienso de cebo hasta su sacrificio, a los 90 días. En comparación con el cordero lechal, el cordero ternasco proporciona una carne más roja y fibrosa, con más pigmentos hemáticos y colágeno, así como con más grasa infiltrada y de cobertura que le confiere un aroma y sabor propio a cordero más intenso. Conforme mayor es la edad, la carne contiene menos agua, más proteínas y hay mayor deposición de grasa, y por tanto, mayor cantidad de ácidos grasos ramificados y de otros compuestos implicados en el aroma y sabor procedentes de la ingesta de vegetales. Además posee más hierro, que actúa como catalizador de la oxidación de lípidos durante el cocinado de la carne (Suherland y Ames, 1996; Young, Berdagué, Viallon, Rousset-Akrim, y Theriez, 1997). La práctica de **ejercicio** en sistemas extensivos o semiextensivos también contribuye a incrementar los niveles de pigmentación y tejido conectivo de la carne.

La **dieta** es crucial para la calidad de la carne, ya que incide en su jugosidad, terneza, aroma y sabor y el color. La dieta puede mejorar la terneza de la carne como consecuencia del incremento de la grasa infiltrada y del descenso de colágeno. Importantes atributos, como el aroma y sabor de la carne cocinada, también puede ser modificado por las condiciones nutricionales en las que se crían los ovinos. Estas diferencias generalmente son percibidas por los consumidores, si bien, la preferencia se ve influenciada por la experiencia previa y por cuestiones culturales. Vasta y Priolo (2006) realizaron una completa revisión sobre los compuestos potencialmente implicados en el aroma y sabor que proporcionan las dietas herbales, a base de grano y enriquecidas con grasa, empleadas en rumiantes. A su vez, dieta y sistema de producción son factores interrelacionados entre sí, ya que la dieta varía según se críe en régimen intensivo, extensivo o mixto. Los aldehídos y cetonas estarán en mayor

proporción en la carne proveniente de sistemas intensivos ya que derivan de la oxidación de los ácidos linoleico y oleico presentes en mayor porcentaje en los animales que consumen grano. En cambio, una mayor proporción de aldehídos insaturados, ácidos grasos volátiles y metil-cetonas derivan de la oxidación del ácido linolénico presente en altas cantidades en la carne proveniente de animales en pastoreo. Una porción de estos compuestos pueden depositarse en el tejido adiposo y en el músculo, dando lugar al conocido como “flavor pastoral” (Schreurs, Lane, Tavendale, Barry, y McNabb, 2008).

Las condiciones de conversión del músculo en carne van a tener una gran incidencia sobre la **calidad tecnológica** de la misma. En el caso de los bóvidos, el pH inicial del músculo *Longissimus dorsi* es de 7,08, alcanzando valores de 5,5-5,7 a las 48 horas *postmortem* (*pm*). Un descenso similar se aprecia en el músculo *Pectoralis profundus* ovino, cuyo pH es de 7,18 (Pearson y Young, 1989). La caída de pH muscular dependerá a su vez del tipo de fibras predominantes y de la actividad muscular antes del sacrificio. Temperaturas elevadas (alrededor de 40°C) aceleran la glucólisis *pm* y el descenso del pH, siendo necesarias menos horas para alcanzar el pH final (Pearson y Young, 1989). El estrés previo al sacrificio por un inadecuado manejo de los animales reduce las reservas de glucógeno muscular y conduce a la aparición de carnes DFD (oscuras “Dark”, firmes “Firm” y secas “Dry”) en los rumiantes. Las carnes DFD se caracterizan por una glucólisis *pm* poco intensa, un menor contenido en ácido láctico y un pH final elevado (>6). La carne aparece firme, sin exudar agua y refleja menos luz, con el consiguiente oscurecimiento. Debido a la mayor integridad de las proteínas musculares, estas carnes tienen una elevada capacidad de retención de agua y un mejor rendimiento tecnológico, si bien su elevado pH incrementa el riesgo de sufrir alteraciones por microorganismos. La incidencia de canales DFD en España se estima en un 5% en bovino y sería mínima en pequeños rumiantes (Sañudo y Alfonso, 1999).

El tiempo de almacenamiento de la canal posterior al *rigor mortis*, conocida como fase de **maduración**, también juega un papel importante en el aroma y sabor, y especialmente, en el desarrollo de la textura de la carne. Durante la maduración se desarrollan los precursores del aroma y sabor de la carne cocinada, como péptidos y

aminoácidos libres, debido a la actividad de las proteasas y peptidasas endógenas, así como otros compuestos precursores del aroma y sabor procedentes de la hidrólisis y oxidación de lípidos. En general, a medida que aumenta el tiempo de maduración se produce una mejora de sus atributos sensoriales. A diferencia de la carne de ternera, las canales de cordero maduras en frío (2°C) necesitan un periodo de tiempo inferior a 72 h para completar su maduración, en función del tamaño y edad del animal.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, es lógico pensar que uno de los aspectos que despierta un gran interés a nivel científico y productivo es la capacidad de modificar la dieta de los animales para mejorar las características y atributos de calidad de la carne, incluyendo su capacidad de conservación.

1.1.3 Mecanismos de deterioro de la calidad

Cronológicamente, la carne fresca se deteriora, en primer lugar, debido a la decoloración; en segundo lugar, por la rancidez oxidativa de la grasa; y, en tercer lugar, a causa del crecimiento microbiológico (Pearson and Tauber, 1984). Además, se producen otros fenómenos de deterioro como la exudación de líquidos debido a la oxidación de las proteínas musculares.

1.1.3.1 Deterioro oxidativo.

Los fenómenos oxidativos constituyen el principal mecanismo de deterioro físico-químico de la carne fresca y van a afectar negativamente a buena parte de sus atributos sensoriales. La estabilidad oxidativa de la carne depende del balance y la interacción entre las sustancias endógenas pro- y antioxidantes, y de la composición de los sustratos susceptibles de ser oxidados, entre los que se encuentran los AGPI, el colesterol, las proteínas y ciertos pigmentos (Serpen, Gökmen, y Fogliano, 2012). Los sistemas antioxidantes endógenos están formados, tanto por compuestos no enzimáticos hidrofílicos y lipofílicos (vitamina E, vitamina C, carotenoides, ubiquinoles, polifenoles, tioles celulares), como por enzimas (superóxido dismutasa -SOD, catalasa -CAT y glutatión peroxidasa -GPX). Ambos sistemas, enzimático y no enzimático, operan conjuntamente para contrarrestar la acción de los pro-oxidantes en el tejido muscular (Decker, Livisay y Zhou, 2000), tanto en el animal vivo, como tras el sacrificio.

La SOD y la CAT son enzimas acopladas: la SOD inactiva los aniones superóxido dando lugar a la formación de peróxido de hidrógeno; la CAT recoge el H₂O₂ y lo descompone en dos moléculas de agua y una de oxígeno. La forma reducida del glutati6n (GSH) puede ser oxidada por el H₂O₂ u otros per6xidos org6nicos a su forma oxidada (GSSG), bien espont6neamente o bien via la cat6lisis de la GPX. La reducci6n compensatoria de la GSSG ser6 catalizada por la glutati6n reductasa a trav6s de la siguiente reacci6n: $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP$.

En cuanto a los sistemas no enzim6ticos, el tocoferol es considerado el antioxidante m6s potente presente en las c6lulas animales. La acci6n antioxidante directa del alfa-tocoferol en las membranas lip6dicas ser6 en torno a 10⁴ veces m6s r6pida que la propagaci6n de la peroxidaci6n lip6dica. Al mismo tiempo, el alfa-tocoferol puede preservar la integridad de la membrana celular mediante la prevenci6n de la oxidaci6n de los fosfol6pidos durante el almacenamiento de la carne, lo cual inhibir6 el paso de fluido sarcopl6smico a trav6s de la membrana muscular y la consiguiente exudaci6n de la carne (Gray, Goma y Buckley, 1996).

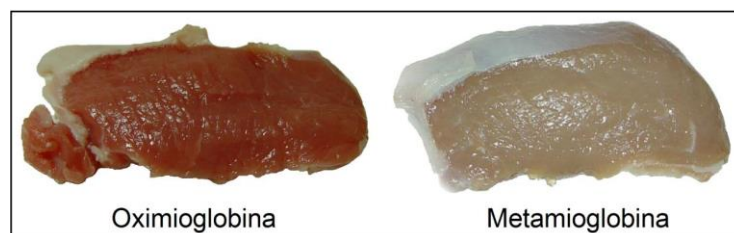
Oxidaci6n de la mioglobina

El color sigue siendo sin6nimo de calidad y frescura de la carne roja a pesar de que su valor no est6 bien correlacionado con la calidad comestible (*eating-quality*). El color de la carne roja depende principalmente de la cantidad y estado qu6mico de la mioglobina (Figura 2). Durante el almacenamiento, la forma qu6mica de la mioglobina va a ser determinante en el color de la carne. La **deoximioglobina** (o mioglobina reducida) da a la carne un color rojo p6rpura y es la forma predominante en ausencia de ox6geno. Cuando la carne es expuesta al aire, la oxigenaci6n de la deoximioglobina da lugar a la conversi6n en **oximioglobina**, responsable del color rojo intenso deseado por los consumidores. Este proceso es reversible, por lo que la retirada del ox6geno (i.e. envasado al vaci6) devolver6 a la mioglobina al estado de deoximioglobina. El contacto con el ox6geno puede oxidar la mioglobina en cualquiera de sus dos estados hasta **metamioglobina**, de color marr6n pardo, pigmento asociado a la carne envejecida (Kerry, Sullivan, Buckley, Lynch, y Morrissey, 2000). Greene (1971)

Introducción

determinó que valores por encima del 40% de metamioglobina causaban rechazo de la carne por parte de los consumidores (Figura 1). La deoxi- y la oximioglobina son proteínas tipo hemo en las cuales el hierro se encuentra en forma ferrosa (Fe^{2+}), mientras que la metamioglobina posee la forma férrica (Fe^{3+}). La formación de metamioglobina puede ser inhibida mediante la adición de sulfitos (SO_2) a la carne. El grupo SO_2 reduce el grupo hemo de la mioglobina, lo que favorece la formación de oximioglobina y deoximioglobina en detrimento de la metamioglobina, proporcionando a la carne roja una apariencia fresca (Wedzicha y Mountfort, 1991). La **carboximioglobina** es otro pigmento de color rojo brillante que se produce cuando la carne es envasada con bajos niveles de monóxido de carbono. Su formación es también reversible y el monóxido de carbono se disociará lentamente de la molécula de mioglobina cuando ésta sea expuesta a atmósferas libres de monóxido de carbono, recuperándose la forma deoximioglobina (Figura 2).

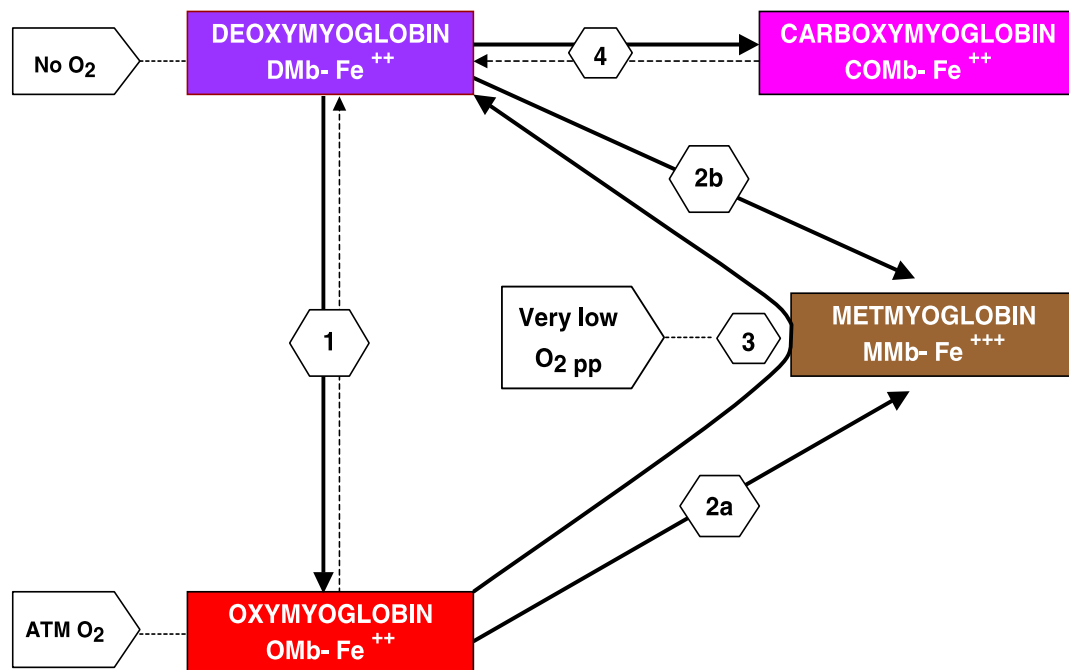
Fig 1. Medallones de lomo crudo de cordero con distintas formas de mioglobina (Fuente propia)



Oxidación de lípidos

La oxidación lipídica es una de las principales causas de deterioro de la carne ya que da lugar a la aparición de rancidez, que, por un lado, produce olores y sabores anómalos, decoloración y pérdida de textura y, por otro, reduce el valor nutritivo por la acumulación de productos secundarios de la oxidación lipídica (peróxidos, malondialdehído y óxidos del colesterol) que pueden inducir efectos biológicos adversos como citotoxicidad, mutagénesis, carcinogénesis (Guardiola, Cabony, Addis, Rafecas, y Boatella, 1996) y enfermedades cardiovasculares (Paniang-Vait, King, Jones, y German, 1995).

Fig 2. Interconversiones de la mioglobina según el estado de oxidación del hierro y el ligando del grupo hemo. (Fuente: Mancini y Hunt, 2005)



Rx 1 (Oxygenation): $\text{DMb} + \text{O}_2 \rightarrow \text{OMb}$

Rx 2a (Oxidation): $\text{OMb} + [\text{oxygen consumption or low O}_2 \text{ partial pressure}] - e^- \rightarrow \text{MMb}$

Rx 2b (Oxidation): $[\text{DMb} - \text{hydroxyl ion} - \text{Hydrogen ion complex}] + \text{O}_2 \rightarrow \text{MMb} + \text{O}_2^-$

Rx 3 (Reduction): $\text{MMb} + \text{Oxygen consumption} + \text{metmyoglobin reducing activity} \rightarrow \text{DMb}$

Rx 4 (CarboxyMb): $\text{DMb} + \text{carbon monoxide} \rightarrow \text{COMb}$

La oxidación de los lípidos se inicia en los fosfolípidos poliinsaturados que forman parte de las membranas celulares, tanto en el animal vivo, como en la carne (Morrissey, Sheehy, Galvin, Kerry, y Buckley, 1998). Tras el sacrificio, los mecanismos antioxidantes intrínsecos del músculo comienzan a fallar y dejan de ser capaces de controlar la oxidación de esta fracción lipídica altamente inestable. El posterior procesamiento de la carne (deshuesado, picado, cocinado) supone una importante disrupción de la compartimentalización celular que facilita la interacción entre los promotores de la oxidación y los ácidos grasos insaturados, desencadenando la conocida como **autooxidación** lipídica, iniciada por la generación de radicales libres y la propagación de reacción oxidativas (Asghar, Gray, Buckley, Pearson, y Boren, 1988). Los principales productos de la oxidación de los AGPI son los hidroperóxidos, sustancias altamente inestables e inodoras, cuyas reacciones y descomposición dará

Introducción

lugar a productos secundarios. Los principales compuestos aromáticos derivados de la oxidación de los lípidos de la carne comprenden alcanales, alcanonas, ácidos alcanóicos, alcoholes, gamma y delta lactonas y alquil-furanos (Ross y Smith, 2006). Estos compuestos volátiles van a tener un especial impacto en el olor de la carne fresca, ya que son los responsables de los olores rancios generados durante el almacenamiento (St. Angelo y Spanier, 1993). A continuación se muestran los principales compuestos volátiles identificados en la carne cruda de cordero expuesta en condiciones prooxidantes (tabla 2).

La oxidación de los lípidos no suele limitar la vida comercial de la carne envasada en películas permeables al aire que permiten la salida de sustancias odoríferas volátiles, sin embargo, estas sustancias son retenidas por los plásticos empleados para envasar la carne en atmósferas modificadas, pudiendo ser fácilmente detectables por el consumidor una vez abierto (Zhao, Wells, y McMillin, 1994). Además, el almacenamiento de la carne en atmósferas ricas en oxígeno potencia la rancidez y da lugar a un rápido deterioro de la calidad aromática de la carne cruda, limitando seriamente su vida útil. La iluminación, la concentración de oxígeno, las altas temperaturas, la actividad de agua o la presencia de catalistas son factores que afectan directamente a la velocidad de ocurrencia y el desarrollo de la oxidación lipídica. El control de estos factores puede reducir significativamente el grado de oxidación, o como mínimo, la velocidad de las reacciones oxidativas que deterioran la carne. Las reacciones de oxidación están particularmente favorecidas en la carne roja, ya que contiene elevados niveles de mioglobina, que a su vez contiene iones de hierro en su grupo hemo que pueden actuar como agentes catalizadores de las reacciones de oxidación (St. Angelo *et al.*, 1993).

Tabla 2. Principales compuestos volátiles identificados en carne de cordero (Gravador *et al.*, 2014; Vasta *et al.*, 2013; Vasta, Ratel, y Engel, 2007)

<u>Alcoholes</u>	<u>Aldehídos</u>	<u>Ácidos orgánicos</u>
3-metil-1-butanol	3-metil-butanal	Ác. acético
1-penten-3-ol	Pentanal	Ác. hexanoico
1-pentanol	Hexanal	Ác. nonanoico
2-penten-1ol	2-hexenal	Ác. decanoico
2,3-butanediol	Heptanal	
1-hexanol	2-heptenal	<u>Hidrocarburos</u>
1-heptanol	Octanal	Benzeno
1-octen-3-ol	2-octenal	Tolueno
2-octen-1-ol	Nonanal	Xyleno
	2-nonenal	
	2-decenal	<u>Furanos</u>
<u>Cetonas</u>	2,4-nonadienal	2-etil-furano
2-butanona	2,4-decadienal	2-butil-furano
3-hidroxi-2-butanona	Benzaldehído	2-pentil-furano
2,3-butanediona		
2-pentanona		
2-heptanona	<u>Compuestos azufrados</u>	
2-octanona	Dimetil disulfuro	
2,3-octanediona	Carbon disulfuro	

Oxidación de proteínas miofibrilares

Diversas investigaciones han puesto de manifiesto que las proteínas miofibrilares son igualmente susceptibles a la oxidación (Martinaud, Mercier, Marinova, Tassy, Gatellier, y Renerre, 1997). El mecanismo de oxidación proteica es similar a la oxidación de los lípidos, iniciándose mediante la formación de un radical libre. Los radicales libres suelen atacar las cadenas laterales de aminoácidos, formándose diversos productos de oxidación en función del residuo de la proteína afectado por este ataque. A diferencia de la oxidación lipídica, la oxidación proteica implica la formación de gran variedad de moléculas susceptibles, mecanismos y productos finales de oxidación. Cada aminoácido presenta una ruta específica de oxidación y da lugar a productos de oxidación específicos. La oxidación proteica provoca cambios irreversibles en los grupos funcionales de los aminoácidos originales para formar productos de oxidación de naturaleza diversa. Las consecuencias más habituales de la oxidación proteica son la

Introducción

formación de puentes cruzados, modificaciones de las cadenas laterales de aminoácidos (carbonilación, pérdida o modificación de los grupos sulfidrilo) y/o fragmentación proteica. La formación de compuestos carbonílicos deriva principalmente de la oxidación de algunos aminoácidos concretos (treonina, prolina, arginina y lisina) y está considerado como el resultado más relevante de la oxidación catalizada por ión metálico, la más habitual en las proteínas miofibrilares (Stadtman y Levine, 2003). Concretamente, la oxidación de la treonina da lugar al ácido alfa-amino-3-keto butírico; la lisina se convierte en semialdehído alfa-amino adípico (AAS por sus siglas en inglés); y la arginina y la prolina en el semialdehído gamma-glutámico (GGS). El AAS y el GGS fueron propuestos inicialmente como biomarcadores del daño oxidativo de las proteínas musculares (Daneshvar, Frandsen, Autrup y Dragsted, 1997).

A nivel proteico, la oxidación puede tener lugar sobre la proteína íntegra sin necesidad de proteólisis previa, pudiendo provocar diversas modificaciones físico-químicas como fenómenos de agregación, desnaturalización, fragmentación y pérdida de la funcionalidad (Xiong, 2000). Así, la oxidación de proteínas es responsable de texturas y colores anómalos en carne fresca y en productos cárnicos procesados. Las proteínas oxidadas ven mermadas sus propiedades funcionales (capacidad de retención de agua, de formación de geles, de formación de emulsiones, etc.), lo cual afecta a la calidad tecnológica de la carne fresca e incrementa la exudación de líquidos. Además la oxidación proteica implica la pérdida irreversible de aminoácidos esenciales y la alteración de la digestibilidad de las proteínas oxidadas, lo que conduce a una merma considerable del valor nutritivo de la carne (Estévez, 2011).

1.1.3.2 Deterioro microbiológico

La carne también se puede deteriorar por fenómenos microbiológicos. Los microorganismos psicrótrofos presentes en la carne refrigerada pertenecen con frecuencia a los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Brochothrix*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Hafnia* y *Alteromonas*. También se encuentran, aunque son menos frecuentes, especies de los géneros *Yersinia*, *Campylobacter*, *Alcaligenes*, *Vibrio* y *Aeromonas* (Bejarano, 2001). De todos ellos, solo el 10% es capaz de crecer en la carne refrigerada y la proporción causante de su

deterioro es todavía menor (Borch, Kant-Muermans, y Blixt, 1996). Por su parte, la proliferación de microorganismos patógenos (*E. coli*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, etc.) puede suponer un riesgo para la salud pero no suele producir cambios apreciables en la carne.

Los principales microorganismos que suelen asociarse al deterioro de la carne refrigerada son: *Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Brochrothrix thermosphacta* y las bacterias ácido-lácticas. Su capacidad de proliferación va a depender de las condiciones de envasado de la carne. La microflora gram negativa, sobre todo, *Pseudomonas spp.* y, en menor grado, *Enterobacteriaceae*, son las bacterias predominantes en la carne envasada en aerobiosis. Bajo estas condiciones, el crecimiento de *Pseudomonas* da lugar al deterioro pútrido de la carne muy rápidamente. El envasado al vacío y el empleo de atmósferas modificadas con niveles de dióxido de carbono por encima del 20% va a favorecer el desarrollo de bacterias anaerobias facultativas, en particular, de BAL y de *B. thermosphacta* (Nychas y Skandamis, 2005). *B.thermosphacta* es la principal bacteria asociada al deterioro microbiológico de la carne envasada en atmósfera protectora rica en O₂ y CO₂, y su crecimiento da lugar a la formación de un olor reconocido por los panelistas como a “queso” (Nowak, Kalemba, Krala, Piotrowska, y Czyzowska, 2012). Por su parte, las BAL van predominar en la carne envasada a vacío dando lugar a típicos olores ácidos, agrios o a yogurt (Mills, Donnison y Brightwell, 2014). Aparte de las bacterias, la presencia de **mohos y levaduras** puede suponer un problema durante el almacenamiento de ciertos productos cárnicos. Las levaduras más comunes presentes en productos cárnicos pertenecen a especies de *Candida* y *Rhodotorula*. Mientras que las bacterias necesitan recuentos superiores a 10⁷-10⁸ ufc/g de carne para causar alteraciones evidentes, las levaduras pueden deteriorar la carne cruda a partir de 10⁵ ufc/g de carne (Sun y Holley, 2012).

Con independencia del tipo de microflora alterante, el grado de deterioro microbiológico de la carne va a depender de la carga inicial de microorganismos. Los recuentos microbiológicos iniciales de la carne están afectado por múltiples factores como la especie animal, la edad de sacrificio, el manejo durante el sacrificio y la

Introducción

evisceración, el control de la temperatura, los ciclos de congelación/descongelación, el procesado (picado, cocinado) y la distribución (Dave y Ghaly, 2011). Los signos habituales de deterioro microbiológico de la carne son los cambios de pH, la aparición de limo superficial o incluso de colonias, la degradación de compuestos estructurales con pérdida de la textura, y, sobre todo, el desarrollo de malos olores, pútridos, agrios, o a queso, entre otros, dependiendo de las especies alterantes.

1.1.3.3 Exudación

La capacidad de retención de agua también influye en la decisión de compra y el peso final del producto. La pérdida de exudados por parte del tejido muscular es inevitable. Los exudados son originados en los espacios existentes entre el conjunto de fibras musculares y el perimisio, y entre las fibras y el tejido del endomisio, producidos durante el desarrollo del rigor. Todos los factores que afectan a la calidad tecnológica de la carne pueden a su vez provocar que ésta sea más o menos exudativa. La temperatura durante el rigor, el estrés previo al sacrificio, el procesado y el envasado pueden afectar a la desnaturalización de las proteínas musculares y, por ende, a la producción de exudados (Honikel, 1998). Otros factores implicados serán el grosor de la pieza cárnica, la relación área/superficie, la orientación del corte respecto al eje de la fibra muscular y la presencia de grandes acúmulos de sangre.

1.2 Estrategias para extender la vida comercial de la carne de cordero

La Legislación Alimentaria es muy estricta con respecto al uso de aditivos en la carne, no estando permitido su uso para conservar la carne íntegra fresca (Reglamento CE 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo), de ahí que se barajen otras estrategias para controlar su deterioro. La carne de cordero en sus principales formatos (chuletas, filetes) se suele comercializar envasada en atmósfera protectora bajo iluminación fluorescente en vitrinas refrigeradas. En estas condiciones, los filetes de cordero pueden permanecer aceptables entre 8-9 días (McMillin, 2008; Soldatou, Nerantzaki, Kontominas, y Savvaidis, 2009; Nieto *et al.*, 2010b; Karabagias, Badeka, y Kontominas, 2011; Bañón *et al.*, 2012).

1.2.1 Aplicación de frío

Como sucede en otros alimentos perecederos, el enfriamiento resulta indispensable para conservar la carne y prolongar su vida útil. Las temperaturas habituales de conservación empleadas son básicamente 0-4°C (refrigeración) y -18°C (congelación). La aplicación de aire frío por convección no sólo reduce la temperatura, sino que también produce cierta deshidratación superficial en la carne que contribuye a limitar el crecimiento bacteriano. Se recomienda refrigerar la carne a temperaturas próximas a 0°C con el objeto de controlar mejor la proliferación de bacterias patógenas psicrófilas, como *Listeria monocitogenes*.

La congelación minimiza los cambios químicos y microbiológicos y reduce las pérdidas de peso por goteo y evaporación, permitiendo conservar la carne durante meses e incluso años. Se considera que, para carne congelada, una temperatura de almacenamiento de -55°C es la ideal de cara a la prevención completa de cualquier cambio en sus parámetros de calidad (Hansen, Juncher, Henckel, Karlsson, Bertelsen, y Skibsted, 2004).

La “super refrigeración” o “congelación parcial” consiste en almacenar la carne justo por debajo de su punto de congelación, uno o dos grados, manteniéndose una pequeña parte del contenido de agua del producto congelado, lo cual inhibe en gran medida la actividad microbiana, aunque los cambios físicos y químicos pueden seguir produciéndose, e incluso acelerarse. Esta tecnología ha sido empleada con éxito en productos de la pesca (Olafsdottir, Lauzon, Martinsdóttir, Oehlenschläuger, y Kristbergsson, 2006; Beaufort, Cardinal, Le-Bail, y Midelet-Bourdin, 2009) y presenta un gran interés para el almacenamiento de la carne, ámbito sobre el cual existen diversos estudios donde se detalla su empleo con éxito (Beaufort *et al.*, 2009; Schubring, 2009).

1.2.2 Envasado y atmósferas protectoras

Con independencia de la temperatura de almacenamiento, el envasado en atmósfera protectora resulta necesario para extender la vida útil de la carne, ya que ésta apenas se conserva unos pocos días en refrigeración y aerobiosis. Las variables que influyen en la vida útil de la carne envasada son el tipo de carne a envasar, la mezcla de gases, el

Introducción

ratio carne/gas, el tipo de envase, el equipo de envasado, la temperatura de almacenamiento y el empleo de aditivos (Zhou, Xu, y Liu, 2010). Básicamente podemos hablar de tres tipos principales de envasado: a vacío, en atmósfera modificada y activo.

El envasado a vacío consiste en extraer el aire que hay en torno al producto para mantenerlo en ausencia de gases. La falta de oxígeno en el interior de los envases minimiza las reacciones oxidativas y el crecimiento de bacterias aerobias (Zhou *et al.*, 2010). Para mantener las condiciones de anaerobiosis en el tiempo es fundamental usar materiales impermeables a los gases, generalmente mediante la combinación de varias capas. El envasado a vacío de la carne roja es problemático debido a que provoca una reducción de oxígeno y un cambio reversible de color de rojo (oximioglobina) a púrpura (deoximioglobina). La pérdida del color rojo brillante de la carne fresca no puede considerarse una alteración como tal, aunque el consumidor podría rechazarla por presentar un aspecto poco atractivo. Un inconveniente adicional es la acumulación de exudado ya que el envase se ajusta a la superficie de la carne. Por el contrario, este tipo de envasado tiene la gran ventaja de inhibir el crecimiento de bacterias aerobias, promoviendo el crecimiento de bacterias anaerobias (principalmente microflora ácido-láctica) que presentan una velocidad de crecimiento menor y dan lugar a olores ácidos menos desagradables que los típicos olores pútridos generados por las bacterias aerobias.

El envasado en atmósfera modificada (en inglés, MAP) consiste en sustituir la atmósfera del envase para favorecer la conservación de la carne. Las carnes rojas refrigeradas se envasan habitualmente en atmósferas modificadas ricas en oxígeno y dióxido de carbono, que, por un lado, favorecen la preservación del color rojo brillante gracias a la hiperoxigenación de la superficie cárnica y el consecuente acumulo de oximioglobina, y, por otro lado, inhiben el crecimiento microbiano debido a la elevada concentración de dióxido de carbono, el cual alarga de la fase de latencia y reduce el crecimiento en la fase logarítmica de las bacterias Gram-negativas aerobias responsables de la descomposición, tales como *Pseudomonas* (Vergara, Gallego, García, y Landete-Castillejos, 2003; Kennedy, Buckley, y Kerry, 2004).

Los niveles de estos gases empleados van entre un 20-30% de dióxido de carbono y un 70-80% de oxígeno (McMillin, 2008). Niveles de dióxido de carbono inferiores al 15% no producen una inhibición satisfactoria del crecimiento de microorganismos, mientras que algunos autores señalan que, cuando la concentración de dióxido de carbono es superior al 30%, puede acelerarse la decoloración en carnes rojas. Además hay que añadir el riesgo de que se produzca un colapso en el envase cuando el nivel de dióxido de carbono empleado supera el 40%, a consecuencia de la absorción del dióxido de carbono por parte del tejido animal (McMillin, Huang, Ho, y Smith, 1999). Por su parte, el empleo de una alta concentración de oxígeno potencia la formación de productos secundarios de la oxidación de lípidos que pueden limitar la vida útil de la carne por enranciamiento. Sin embargo, el envasado con bajos niveles de oxígeno implicaría una importante decoloración del producto debido a la susceptibilidad de oxidación de la mioglobina con respecto a la oximioglobina. Este hecho determina que el uso de bajas proporciones de oxígeno no resulte adecuado para el envasado de carnes rojas, como la de cordero.

El empleo de plásticos capaces de retener los gases modificados va a ser crucial para conseguir una adecuada conservación de la carne (McMillin, 2008). Los plásticos de cobertura pueden elaborarse con diferentes materiales, como cloruro de polivinilideno recubierto con polipropileno-polietileno, cloruro de polivinilideno recubierto con polietileno tereftalato de polietileno, o poliamida-polietileno. Los plásticos de envoltura pueden fabricarse con poliamida-polietileno, poliamida-ionómero, o poliamida de etileno-acetato de vinilo-etileno (Mullan y McDowell, 2003). En general, una capa simple o tipo de plástico no posee todas las propiedades requeridas por lo que se recurre a la laminación, recubrimiento o co-extrusión (Jenkins y Harrington, 1991). Una estructura multicapa común tiene un material estructural externo (tereftalato de polietileno, poliamida o polipropileno), un material intermedio con propiedades de barrera de gas (cloruro de polivinilo, cloruro de polivinilideno, copolímeros de etileno acetato de vinilo u otros) y un material interior que proporciona el sello (polietileno, copolímeros de etileno acetato de vinilo, ionómero u otros). Además, se pueden utilizar agentes antiempañamiento (ésteres de glicerol y poliglicerol, ésteres de sorbitán y sus etoxilatos, etoxilatos de alcohol y nonilfenol) en

Introducción

superficie o mezclados con el propio polímero para que migren hasta la superficie (Osswald, Baur, Brinkmann, Oberbach, y Schmachtenberg, 2006). También es posible incorporar sustancias antimicrobianas al plástico de envasado, como por ejemplo, extractos de romero, para controlar el deterioro microbiológico de la carne (Djenane, Montañés, y Roncalés, 2005).

El envasado activo incorpora componentes específicos que interactúan con el alimento o con el ambiente para mantener la calidad del producto y prolongar su vida útil. Un paso más allá en este tipo de tecnología es el envasado inteligente, donde el propio envase está provisto de un sensor para controlar las propiedades del producto del ambiente e informar al procesador, comerciante o consumidor sobre el estado de éstos (Kerry, O'Grady, y Hogan, 2006). El envasado activo presenta características de envasado en atmósfera modificada, ya que proporciona al producto las condiciones necesarias para evitar o ralentizar los procesos que provocan su alteración, pero además presenta la ventaja de no necesitar un seguimiento y control continuos. Las funciones y tecnologías del envasado activo incluyen control de la humedad, films permeables al oxígeno, captadores de oxígeno, generadores de oxígeno, controladores de dióxido de carbono, controladores del olor, mejoradores del sabor, extractores de etileno y agentes antimicrobianos (Brody, 2009) junto con indicadores de componentes específicos (Vermeiren, Devlieghere, Beest, Kruif, y Debevere, 1999) y control de la temperatura de envasado.

1.2.3 Iluminación

Los establecimientos de venta al por menor utilizan sistemas de iluminación con luces brillantes para realzar la frescura y mejorar el aspecto de la carne (Van Oeckel, Warnants, y Boucqué, 1999). Sin embargo, la utilización de lámparas fluorescentes en vitrinas de exposición puede desencadenar reacciones foto-químicas y procesos de oxidación, además de aumentar la temperatura de la superficie de la carne, favoreciendo el crecimiento de microorganismos y afectando a la estabilidad del color (Sánchez-Escalante, Torrescano, Camou, González, y Hernández, 2008). Las fuentes de iluminación empleadas pueden variar desde aquellas que se colocan en techos, que pueden ser luces fluorescentes, incandescentes y de haluro metal, hasta luces

colocadas dentro de la vitrina de exposición. Los consumidores suelen preferir las carnes presentadas bajo iluminación incandescente frente a aquellas presentadas bajo iluminación fluorescente, probablemente debido a la ausencia de componente rojo en esta última; sin embargo, se suelen utilizar lámparas de tipo fluorescente, ya que son más eficaces y generan menos calor dentro de las vitrinas expositoras (Barbut, 2002). La velocidad a la que se producen las reacciones de oxidación depende principalmente de factores como la longitud de onda, la intensidad de la iluminación y las propiedades de permeabilidad a la luz del film que se utilice en el envasado. La luz con longitudes de onda corta tiene un efecto muy marcado sobre la oxidación de la grasa y sobre la degradación del color de la carne. La intensidad de la luz utilizada en los expositores de carne y productos cárnicos suele oscilar entre los 500 y 1000 lux (lx). La luz fluorescente blanca generalmente no decolora la carne, pero la exposición a la luz ultravioleta causa bastante desecación en la carne envasada aeróbicamente, así como oxidación de mioglobina y cambios de color a tonalidades marrón durante una corta exposición (Renerre, Poncet, Mercier, Gatellier, y Métro, 1999). La estabilidad del color de la carne refrigerada puede mejorar cuando se utiliza un material de envasado impermeable a las radiaciones ultravioletas, pero por razones de marketing se suele utilizar material transparente, menos efectivo frente a dichas radiaciones.

1.2.4 Aditivos conservantes

El Reglamento (CE) 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, no autoriza el uso de aditivos conservante en la carne entera fresca definida en el Reglamento (CE) 853/2004 como: “la carne que no ha sido sometida a procesos de conservación distintos de la refrigeración, la congelación o la ultracongelación, incluida la carne envasada al vacío o envasada en atmósfera controlada”. Por el contrario, dicho reglamento autoriza el empleo de aditivos químicos en preparados de carne, definidos como: “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”. Los aditivos usados habitualmente para inhibir el crecimiento microbiano en los derivados cárnicos son la sal común, los nitritos, los sulfitos los ácidos orgánicos y los sorbatos. Dada su

relevancia en el tercer trabajo de la presente tesis doctoral, desarrollaremos más en profundidad el papel de los sulfitos como aditivo cárnico.

Sulfitos

El término “sulfitos” hace referencia al dióxido de azufre y a diferentes formas de agentes azufrados inorgánicos que liberan SO₂ en las condiciones de uso. Los sulfitos son generalmente añadidos a los productos cárnicos en forma de bisulfito sódico o potásico para inhibir el crecimiento microbiano, retrasar la decoloración (fijador de la oximioglobina) y como agente antioxidante. Los sulfitos son especialmente efectivos contra bacterias aeróbicas Gram-negativas, mohos y levaduras (Ray, 2004). Su eficacia antimicrobiana es el resultado de la forma disociada del SO₂ que atraviesa la membrana celular y reacciona con los grupos tiol de las proteínas, así como con enzimas y cofactores.

Los sulfitos son considerados en cierta manera como aditivos únicos, por lo que no es fácil encontrar alternativas su uso. Los productos alternativos suelen presentar menos propiedades, son menos efectivos y son casi siempre más caros. Sin embargo, de un tiempo a esta parte, se viene cuestionando su uso en base, por un lado, a su potencial efecto iniciador de reacciones asmáticas en individuos sensibles, y, por otro lado, porque la ingestión de elevadas concentraciones de sulfitos puede dar lugar a deficiencias de tiamina o vitamina B1. Por este motivo el uso de sulfitos en muchos alimentos considerados fuentes importantes de tiamina, como es el caso de la carne y los productos cárnicos, no está permitido en algunos países, como Brasil, Canadá o EEUU, o su uso está limitado a ciertas aplicaciones concretas: en la Unión Europea sólo se permite en salchichas frescas y en preparados cárnicos con vegetales y/o cereales con un límite máximo de 450 mg/kg; en Australia y Nueva Zelanda su uso está más extendido, permitiéndose niveles de hasta 500 mg/kg en un mayor número de productos. Aunque en menor medida, también se ha observado la potencial capacidad de los sulfitos para destruir el beta-caroteno, precursor de la vitamina A (Wedzicha *et al.*, 1991) y cierto efecto disruptor del metabolismo de los carbohidratos (Peroni y Poner, 1995). Últimamente, existe una creciente preocupación en torno a la posibilidad de que muchos consumidores puedan estar excediendo la ingesta diaria

recomendada (IDR), estimada en 0-0.7 mg/kg por persona y día.

En un reciente informe de la FAO/OMS sobre aditivos alimentarios (*Safety evaluation of food additives*, 2009) se observó que, en muchos de los países analizados, una de las principales fuentes dietéticas de exposición a sulfitos causantes de ese exceso, tanto en niños como en adultos, era el consumo de salchichas frescas y otros productos cárnicos. Se observó que la ingesta de una porción de 100 gramos de un alimento con unos niveles por encima de 400 mg/kg podía dar lugar a una ingesta similar a la IDR. Entre las **recomendaciones de la OMS** se alentaba vehementemente a investigar métodos alternativos de conservación y a reducir las concentraciones de SO₂ en la medida en que haya alternativas más saludables. En este sentido, estudios previos han demostrado la posibilidad de reducir la cantidad de SO₂ necesaria para conservar la carne cruda mediante el uso de aditivos naturales como el té verde, la semilla de uva, el ascorbato o el quitosano (Bañón *et al.*, 2007; Roller *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 2012). Así mismo, otros estudios han demostrado la posibilidad de extender la vida útil de productos cárnicos cocinados con dosis reducidas de nitritos en su formulación mediante la suplementación dietética de antioxidantes (α -tocoferol) (Dineen *et al.*, 2001).

Tabla 3. Cuadro resumen de los estudios orientados a reducir sulfitos, nitritos y nitratos en la carne mediante el uso de compuestos naturales

Referencia	Producto cárnico	Compuesto testado	Resultados
Roller <i>et al.</i> , 2002	Salchicha fresca cerdo	Quitosano (0,6%) + 170 mg/kg SO ₂	Mayor inhibición microbiana que altas dosis (340 mg/kg) de SO ₂ Reducida degradación SO ₂
Bañón <i>et al.</i> , 2007	Hamburguesas frescas de ternera	400 mg/kg: - Extracto té verde - Ext. semilla uva + 100 mg/kg SO ₂	Retraso de la oxidación lipídica y descoloración y modesta reducción del crecimiento microbiano frente a la misma dosis de SO ₂
Serrano <i>et al.</i> , 2012	Hamburguesas frescas de cerdo	0,02-0,05% Quitosano + 150 mg/kg SO ₂	Similares efectos conservantes (oxidación lipídica, estabilización color y crecimiento microbiano) que altas dosis de SO ₂
Dineen <i>et al.</i> , 2001	Jamón cocido y hamburguesa cocinada de cerdo	1000 mg/kg vitamina E + 25/100 mg/kg de nitritos	Similar o mejor estabilidad lipídica y del color de los productos suplementados con baja dosis frente a las altas dosis de nitritos.

Ingredientes naturales con propiedades conservantes

El empleo de ingredientes naturales como alternativa a los aditivos conservantes es un campo de estudio que en las últimas décadas ha adquirido gran relevancia a nivel científico e industrial. Como se ha comentado, las restricciones legales al uso de aditivos conservantes hacen fundamental la búsqueda de alternativas naturales y más sanas a su uso que permitan su eliminación o, al menos, reducir su dosis en los alimentos (Serrano *et al.*, 2012).

Se ha testado una gran cantidad de compuestos naturales como conservantes de la carne y sus derivados. Además del romero (ver sección 1.3.2), se han realizado estudios con aloe vera, gengeng, mostaza, salvia (McCarthy, Kerry, Kerry, Lynch, y Buckley, 2001), rábano (Delaquis, Ward, Holley, Cliff, y Mazza, 1999), orégano (Fernández-López, Sevilla, Sayas-Barberá, Navarro, Marín, y Pérez- Alvarez, 2003), albahaca, clavo, hierbabuena, nuez moscada, curry, canela (Abdalla y Roozen, 1999), miel (Johnston, Sepe, Miano, Brannan, y Aderton, 2005), catequinas de té, vitamina C (Mitsumoto, O'Grady, Kerry, y Buckley, 2005), naranja, limón (Fernández-López, Zhi, Aleson-Carbonell, Pérez-Álvarez, y Kuri, 2005), pimienta negra (Martínez, Cilla, Beltrán, y Roncalés, 2007), té verde, café, piel de uva (Nissen, Byrne, Bertelsen, y Skibsted, 2004), uva y extractos de corteza de pino (Ahn, Grün, y Fernando, 2002; Gruen, Fernando, y Ahn, 2005). Muchos de estos vegetales contienen moléculas activas con actividad antimicrobiana y antioxidante, como compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y polisacáridos, que podrían desarrollar un papel tecnológico en los productos cárnicos. Sin embargo, también es cierto que al tratarse de sustancias naturales con una composición heterogénea, no existe un completo control o conocimiento de lo que realmente se está añadiendo al alimento, ni de los posibles efectos colaterales de otros componentes presentes. A pesar de ello, la adición directa de conservantes naturales a la carne, además de realizar un papel tecnológico, puede modificar el valor nutritivo de los productos cárnicos, pasando a desempeñar una función de ingrediente. Sus principales inconvenientes suelen ser su reducido espectro de actividad y sus limitaciones sensoriales, ya que, en algunos casos, los ingredientes naturales pueden modificar las propiedades organolépticas del alimento, aportando

características de aspecto, olor y/o sabor anómalos e indeseables a la carne (Zhou *et al.*, 2010). Por lo tanto, es fundamental que la mínima dosis conservante efectiva del ingrediente natural sea inferior a su dosis límite de detección sensorial.

1.2.5 Tecnología de obstáculos

Una tendencia actual es utilizar **métodos combinados** de conservación basados en diferentes técnicas de “obstáculos” (*hurdles*). Las principales “barreras” utilizadas para conservar alimentos son la temperatura (alta o baja), la actividad de agua, la acidez, el potencial redox, los conservantes (sulfitos, ascorbato, nitritos, etc.) y los microorganismos competitivos (BAL) (Leistner, 2000; Leistner y Gorris, 1995) *et al.*. Los sistemas combinados de conservación son más efectivos que las mismas técnicas aplicadas de manera individual, al aprovechar las potenciales sinergias existentes entre tratamientos, lo que contribuye a reducir los requerimientos de aditivos (Zhou *et al.*, 2010).

1.2.6 Empleo de fitoquímicos en alimentación animal

Una alternativa a la adición directa de conservantes a la carne es la suplementación dietética de los animales con fitoquímicos contenidos en diferentes matrices vegetales (extractos, especias, frutos, plantas íntegras, etc.) capaces de depositarse en el tejido muscular y de hacer un papel tecnológico similar a los conservantes adicionados. Si bien este tipo de productos podrían suponer un coste económico mayor que la adición directa de aditivos, presentan la gran ventaja de no ser percibidos como aditivos alimentarios.

La mayoría de los estudios dietéticos con fitoquímicos han sido realizados en animales monogástricos (pollo y cerdo), cuya carne se consume en mayor porcentaje que la carne de animales poligástricos (vacuno, ovino y caprino) (76% vs 24%) (MAGRAMA, 2013). Sin embargo, a pesar de las peculiaridades del sistema digestivo de los rumiantes y de su actividad metabólica, se ha demostrado igualmente la biodisponibilidad de determinados compuestos activos testados con éxito en animales monogástricos que ofrecen un incremento de la capacidad de conservación también

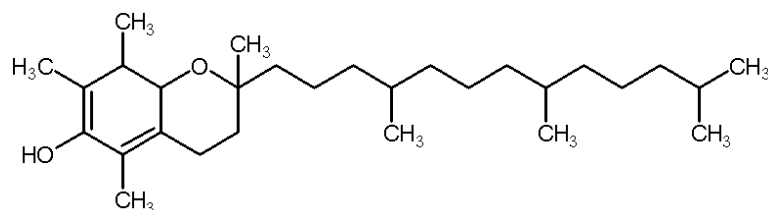
Introducción

en rumiantes. Ejemplos de estos estudios muestran como la inclusión dietética de alga parda (Galipalli, Gadiyaram, Kouakou, Terrill, y Kannan, 2004; Braden, Blanton, Montgomery, Santen, Allen, y Miller, 2007) y ácido eláxico (Hayes *et al.*, 2009) en terneros, o de cúrcuma (Karami, Alimon, Sazili, Goh, y Ivan, 2011) y catequinas del té (Zhong *et al.*, 2009) en cabras, mejoró la capacidad de conservación y la estabilidad oxidativa de la carne. Así mismo, la ingesta de plantas del género *Atriplex spp.* durante el pastoreo derivó en una mayor estabilidad del color de la carne ovina a lo largo de su almacenamiento (Pearce, Masters, Smith, Jacob, y Pethick, 2005).

La suplementación dietética con α -tocoferol acetato o vitamina E es probablemente la más extendida para reducir los procesos oxidativos de la carne y es la que cuenta con una mayor aceptación por parte de los consumidores (Burton y Traber, 1990). La suplementación de la dieta con cantidades superiores a las requeridas para un correcto crecimiento y desarrollo del animal provoca un aumento significativo de las concentraciones plasmáticas y tisulares de α -tocoferol, suponiendo un procedimiento eficaz para retrasar y prevenir el enranciamiento de la carne y los productos cárnicos, tanto frescos (Faustman, Cassens, Schaefer, Buege, y Scheller, 1989; Arnold, Scheller, Arp, Williams, y Schaefer, 1993), como cocinados (Kerry *et al.*, 2000).

La acción antioxidante de los tocoferoles se debe a su radical fenólico (figura 3). Los tocoferoles son moléculas conformadas por diferentes fenoles metilados que se sitúan en las membranas fosfolipídicas de las células animales donde ejercen su actividad antioxidante, contribuyendo a mantener la integridad de las mismas. Además, los tocoferoles también contribuyen a estabilizar otros compuestos celulares, incluyendo la mioglobina, y por tanto, también ralentizan los procesos oxidativos que conducen al pardeamiento y el enranciamiento de la carne.

Fig. 3 Estructura química del tocoferol



En cuanto su uso dietético en el ganado ovino (tabla 4), la suplementación con alrededor de 500 mg de vitamina E por kg de pienso durante la fase de cebo de los corderos permitiría alcanzar una deposición muscular entre 1,8 y 5,9 mg de vitamina E por kg carne (Álvarez *et al.*, 2008; González-Calvo, Ripoll, Molino, Calvo, y Joy, 2015; Kasapidou *et al.*, 2012; Kerry *et al.*, 2000; Lauzurica *et al.*, 2005; López-Bote, Daza, Soares, y Berges, 2001; Turner, McClure, Weiss, Borton, y Foster, 2002; Wulf *et al.*, 1995). De los anteriores estudios también se desprende que es necesario alcanzar niveles musculares de vitamina E entre 2 y 5 mg/kg para proteger a la carne de cordero frente a la oxidación (Álvarez *et al.*, 2008; López-Bote *et al.*, 2001).

La adición de tocoferoles a la carne retrasa su oxidación pero su efectividad disminuye considerablemente con respecto a la suplementación dietética, ya que no asegura que la vitamina E llegue a integrarse en las membranas musculares, las cuales tienen un papel fundamental en la estabilidad de lípidos y pigmentos, limitándose su aplicación como aditivo conservante en la industria cárnica (Mitsumoto, 2000).

Tabla 4. Cuadro resumen de los estudios sobre suplementación dietética con α -tocoferol realizados en ovino.

Referencia	Dosificación	Nivel muscular (mg/kg)	Producto /Músculo	Almacenamiento	Resultados
Wulf <i>et al.</i> , 1995	500 – 1000 UI/aal y día por 56 días	5,90 - 5,67	Carne fresca de lomo y pierna	Refrigeración iluminación (28 d)	Mejora estabilidad oxidativa y color y mayor aceptación sensorial Incremento vida útil \approx 4 días
Guidera <i>et al.</i> , 1997	1000 mg/kg pienso por 70 días (madres: 12 semanas)	5,1 – 5,3	Carne fresca y congelada (<i>Longissimus dorsi</i> ; <i>Psoas major</i> ; <i>Gluteus medius</i>)	Refrigeración + iluminación (7 d)	Mejora estabilidad oxidativa Reducción de la descoloración y acúmulo de metamioglobina
López-Bote <i>et al.</i> , 2001	270, 520 y 1020 mg/kg por 6 sem	1,5 - 5,4	<i>Longissimus dorsi</i>	Refrigeración (9d)	Mejora estabilidad oxidativa
Turner <i>et al.</i> , 2002	300 IU/aal por 7 ó 21 días	1,91 - 2,89	<i>Longissimus dorsi</i>	Refrigeración (6 d)	Sin diferencias a nivel de color y aceptación sensorial
Macit <i>et al.</i> , 2003	45 mg/aal/d por 75 días	-	<i>Longissimus dorsi</i>	Refrigeración (12 d) Iluminación	Mejora estabilidad oxidativa y reducción de la descoloración
Lauzurica <i>et al.</i> , 2005	250 – 1000 mg/kg por 37 días	2,17 - 3,57	<i>Longissimus dorsi</i>	Refrigeración (28 d) MAP (70/30 O ₂ /CO ₂)	Mejora estabilidad oxidativa y reducción de la descoloración hasta 14d (250) o 28d (1000)
Ripoll <i>et al.</i> , 2011	500 mg/kg por 33 días	-	<i>Longissimus thoracicus et lumborum</i>	Refrigeración (13 d) MAP (40/30/30 O ₂ /CO ₂ /Ar)	Mejora estabilidad oxidativa y reducción de la descoloración. Incremento vida útil \approx 4 días
Kasapidou <i>et al.</i> , 2012	30 – 500 mg/kg por 63 días	0,73 - 3,73	<i>Semimembranosus</i>	Refrigeración (6 d) MAP (75/25 O ₂ /CO ₂)	Prevención de la oxidación lipídica a partir de una suplementación con 250 mg/kg (2,55 mg/kg vitamina E en músculo)
Rivas-Cañedo., 2013	300 mg/kg entre 14 y 26 kg peso vivo	-	Chuletas	Refrigeración (6 d) MAP (70/30 O ₂ /CO ₂)	Mejora del perfil de compuestos volátiles marcadores de la oxidación lipídica
González-Calvo <i>et al.</i> , 2015	500 mg/kg por 4-28 días	0,5 – 3,22	<i>Longissimus thoracicus</i> y <i>Semitendinosus</i>	Refrigeración (7 d)	Mejora estabilidad oxidativa y reducción de la formación de metamioglobina

Entre todas las opciones posibles, el empleo de **PAMs** presenta un indudable interés en alimentación animal, dado su elevado contenido en compuestos fenólicos biodisponibles con potencial actividad conservante sobre la carne. Dentro de este grupo de plantas existen especies muy conocidas como son el romero (*Rosmarinus Officinalis*), el orégano (*Origanum vulgare* L.), la mejorana (*Origanum majorana* L.), la albahaca (*Ocimum basilicum* L.), la menta (*Mentha piperita* L.), la hierbabuena (*Mentha spicata* L.), el tomillo (*Thymus vulgaris* L.) y la salvia (*Salvia officinalis* L.). De todas ellas, el romero, junto con el tomillo y la salvia, se encuentran entre las más estudiadas en virtud de sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Álvarez, García García, Jordán, Martínez-Conesa, y Hernández, 2012; Farhat, Landoulsi, Chaouch-Hamada, Sotomayor, y Jordán, 2013; Nieto *et al.*, 2010b).

En los últimos años está aumentando la industrialización de PAMs para producir condimentos, aromatizantes, infusiones o cosméticos, entre otros productos, lo que, por un lado, ha aumentado las necesidades de cultivo, y, por otro, está generando una mayor cantidad de subproductos industriales. Actualmente se dedican en España unas 7.000 hectáreas al cultivo de PAMs, siendo Andalucía, con unas 1.700 hectáreas, la región que posee una mayor extensión dedicada a los mismos. Sin embargo, pese a las actuales normas establecidas para su protección, los volúmenes actuales de comercialización de PAMs comienzan a no ser sostenibles, ni por las propias especies salvajes ni por el medio donde crecen, poniendo en riesgo la supervivencia de las mismas.. La búsqueda de nuevas aplicaciones y la creciente tendencia a consumir productos naturales podría dar como resultado el desarrollo del cultivo sostenible de PAMs que permita preservar las poblaciones salvajes, y contribuya al desarrollo económico de zonas rurales desfavorecidas.

Hasta la fecha se han realizado diversos estudios dietéticos en animales con **aceites esenciales** de este tipo de plantas. Por ejemplo, la incorporación de aceite esencial de orégano al pienso de los pollos, en dosis de 50 y 100 mg/kg (Botsoglou, Florou-Paneri, Christaki, Fletouris, y Spais, 2002), y al pienso de los pavos, en dosis de 100 y 200 mg/kg (Botsoglou, Grigoropoulou, Botsoglou, Govaris, y Papageorgiou, 2003), permitió reducir la oxidación lipídica en la carne cruda y cocinada, almacenada hasta 9 días en

Introducción

refrigeración (4 °C). En un estudio similar, Simitzis *et al.* (2008) observaron que la suplementación dietética de corderos con aceite esencial de orégano, en dosis de 1000 mg/kg en el pienso, redujo la oxidación lipídica en la carne cruda durante el almacenamiento, tanto en refrigeración (4°C) hasta 9 días, como en congelación (-20 °C) hasta 4 meses. Por el contrario, la suplementación dietética de cerdos con aceite esencial de orégano, en dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg en el pienso, no logró reducir la oxidación lipídica en la carne cruda almacenada en refrigeración hasta 9 días (Simitzis, Symeon, Charismiadou, Bizelis, y Deligeorgis, 2010). En otro estudio realizado con cerdos, Janz *et al.* (2007) determinaron que la incorporación de aceite esencial de orégano en una dosis del 0,05% al pienso no redujo los niveles de oxidación lipídica, ni mejoró las características sensoriales de la carne cocinada y almacenada en refrigeración hasta 4 días.

Una posibilidad con buenas perspectivas económicas es el aprovechamiento de extractos y **subproductos vegetales** ricos en compuestos activos (Balasundram, Sundram, y Samman, 2006; Vasta *et al.*, 2011). Diversos estudios han empleado con éxito un subproducto del aceite de oliva, rico en hidroxicortisol, obteniendo mejoras en la capacidad antioxidante (Luciano *et al.*, 2013), el perfil lipídico (Mele *et al.*, 2014) y el perfil de compuestos volátiles derivados de la oxidación lipídica (Gravador *et al.*, 2014) en la carne de cordero. La suplementación del pienso de los corderos con extracto de quebracho colorado (*Schinopsis lorentzii*) (8,9%) rico en taninos, también mejoró la estabilidad del color en la carne (Luciano *et al.*, 2009). La suplementación dietética de corderos con hesperidina, uno de los principales flavonoides presentes en los cítricos, en dosificaciones de 1500 y 3000 mg/kg en el pienso, permitió reducir los valores de oxidación lipídica de la carne durante su almacenamiento en refrigeración (Simitzis, Ilias-Dimopoulos, Charismiadou, Biniari, y Deligeorgis, 2013). La suplementación dietética de ovejas lactantes y gestantes con hoja de tomillo libre de aceite esencial, en una dosis del 7,5%, permitió mejorar la estabilidad del color y reducir el deterioro microbiológico y la oxidación de lípidos en la carne de sus corderos, almacenada en refrigeración y MAP (70/30 O₂/CO₂) hasta 21 días (Nieto *et al.*, 2010b). La incorporación de aceite esencial de tomillo en la dieta de conejos, en una dosificación del 3%, permitió mejorar la estabilidad del color en la carne,

almacenada en refrigeración y bajo intensa iluminación (2300 lx) hasta 9 días (Dal Bosco, Gerencsér, Szendrő, Mugnai, Cullere, Kovács, y Dalle Zotte, 2014). Igualmente, López-Bote *et al.* (1998) observaron que la suplementación dietética de pollos con extracto de salvia, en una dosificación de 500 mg/kg en el pienso, permitía reducir la oxidación lipídica en la carne cruda almacenada en refrigeración y aerobiosis. En definitiva, todo parece indicar que la capacidad de conservación de la carne puede ser mejorada mediante el uso alimentario de fitoquímicos biodisponibles de carácter fenólico. Por su relevancia para la presente tesis, comentaremos en profundidad los aspectos agronómicos e industriales más relevantes de la producción de romero y sus derivados, para luego exponer sus propiedades como aditivo cárnico y/o del pienso de animales de abasto.

1.3 Uso de romero y derivados en alimentación animal

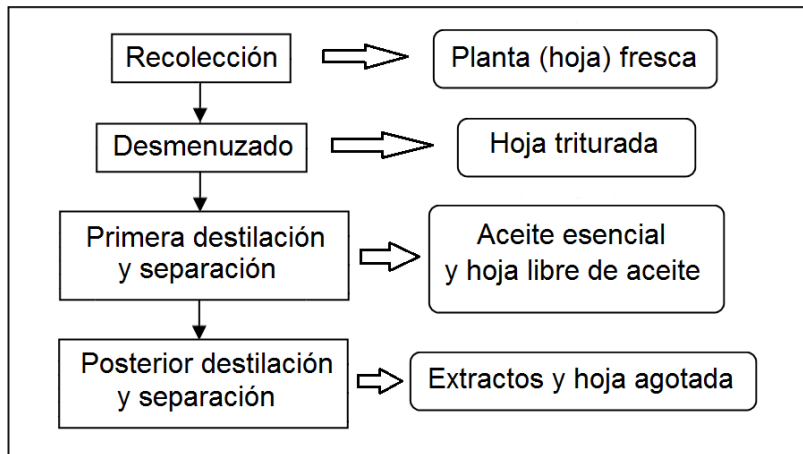
1.3.1 Productos derivados del romero y sus propiedades

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) es una planta que pertenece a la familia *Labiatae* o *Lamiaceae*. Es una planta perenne, leñosa y de porte arbustivo, con una vida media que varía entre 5 y 15 años. Puede alcanzar un tamaño de hasta 2 metros. Es una planta originaria de la región mediterránea, sobre todo de las áreas donde el suelo es especialmente seco, arenoso y rocoso, aunque tiene preferencia por los suelos calcáreos. Es una especie termófila tolerante a la sequía, que crece en zonas soleadas, protegidas de vientos gélidos. Sus hojas son firmes, de color verde oscuro por el haz y blanquecinas por el envés, provistas de abundantes glándulas de esencia. Sus flores son de color azul o violáceo pálido con los estambres más largos que los pétalos y el labio superior de la corola curvado y sus semillas son de tamaño reducido. En la región mediterránea viven unas 1000 especies silvestres de esta familia correspondientes a unos 48 géneros, aproximadamente la cuarta parte de los 220 géneros y 4000 especies del total mundial.

Como cualquier otro material vegetal, la hoja fresca de romero presenta una composición compleja que incluye diversas familias de compuestos. El grupo de compuestos más importante, tanto por su proporción como por su potencialidad, es el de los compuestos fenólicos y polifenólicos, lo que permite obtener diferentes aceites

y extractos mediante el uso de disolventes (Schwarz, *et al.*, 2001). Se consideran productos obtenidos del romero la hoja, los aceites esenciales, la hoja libre de aceite y los extractos obtenidos a partir de una segunda destilación de la hoja libre de aceite con diferentes solventes (Figura 4).

Figura 4. Procesado industrial del romero.



Aceite esencial

El aceite esencial de romero se obtiene por destilación de la hoja triturada con agua. Los aceites esenciales son volátiles, de ahí su poder aromático, y líquidos a temperatura ambiente. Recién destilados son incoloros o ligeramente amarillos. Su densidad es inferior a la del agua y poseen un índice de refracción elevado. Son liposolubles y muy poco solubles en agua, pero son arrastrables por el vapor de agua. Son igualmente solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, como éter o cloroformo, y alcohol de alta graduación. El contenido en **compuestos activos** del aceite esencial determinará su calidad, y en última instancia, su precio final. Con independencia de las condiciones de extracción, la materia prima empleada para elaborar el aceite esencial de romero puede presentar una gran variabilidad, debido a factores intrínsecos (genética y edad) y extrínsecos (condiciones edafoclimáticas) (Gachkar *et al.*, 2007). En un amplio estudio realizado en 17 poblaciones de romero silvestres de la Región de Murcia (Moñino, 2010) se identificaron un total de 26 moléculas que representan el 98% de los componentes volátiles identificados en aceite esencial de romero (tabla 5).

Tabla 5. Composición porcentual del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (Moñino, 2010).

Compuesto	%	Compuesto	%	Compuesto	%
α -Pinenol	16,1 \pm 3,6	Linalol	1,02 \pm 0,5	Limoneno	2,84 \pm 0,9
Canfeno	7,26 \pm 1,6	Canfolenal	0,32 \pm 0,2	Eucaliptol	21,0 \pm 4,9
β -Pinenol	1,96 \pm 0,6	Alcanfor	19,9 \pm 8,4	γ -Terpineno	1,00 \pm 0,3
3- Octanona	0,49 \pm 0,8	Borneol	5,00 \pm 1,9	Terpinoleno	0,99 \pm 0,4
Mirceno	4,25 \pm 1,8	Terminen-4-ol	0,11 \pm 0,1	Acetato de bornilo	0,72 \pm 0,4
3- Octanol	0,08 \pm 0,1	p-Cymen-8-ol	2,67 \pm 0,6	(E)- β -Cariofileno	0,37 \pm 0,3
α -Felandreno	0,35 \pm 0,2	α - Terpineol	5,13 \pm 2,2	α -Cariofileno	0,26 \pm 0,1
Δ -3-Careno	0,03 \pm 0,1	Verbenona	0,88 \pm 0,6	Óxido de cariofileno	0,26 \pm 0,1
p-Cimeno	2,00 \pm 0,9				

En última instancia, las **propiedades físicas, químicas y biológicas** de estos compuestos activos mayoritarios son las que van a determinar sus posibles aplicaciones. La industria transformadora obtiene compuestos aromáticos para alimentación y fragancias para perfumería y cosmética, en cuya fabricación los aceites esenciales son un ingrediente fundamental. Además, existe numerosas referencias bibliográficas sobre las propiedades antimicrobianas y antivirales (Al-Sereiti, Abu-Amer, y Sen, 1999; Rezzoug, Boutekedjiret, y Allaf, 2005) y antioxidantes (Ojeda-Sana, van Baren, Elechosa, Juárez, y Moreno, 2013; Özcan y Arslan, 2011) del aceite esencial de romero. Ouattara *et al.*, (1997) investigaron la actividad antibacteriana de algunos aceites esenciales contra microorganismos responsables del deterioro de los alimentos, llegando a la conclusión de que los aceites esenciales de canela, clavo y romero fueron los más activos. Similares resultados fueron obtenidos por Valero y Salmerón (2003) para la actividad antibacteriana del aceite esencial de romero contra *cepas de Bacillus cereus* cultivadas en caldo de zanahoria.

Subproducto de la extracción del aceite esencial de romero: la hoja destilada

La producción de aceite esencial genera un gran excedente de subproductos. Datos publicados revelan que en España se producen anualmente una media de 180 T de aceite esencial de romero; si se considera que el rendimiento medio en aceite esencial se encuentra entre el 0,6 % en peso fresco se puede estimar que se requiere una producción de 30×10^6 kg de materia fresca (Sotomayor, 1998).

La hoja de romero destilada, libre de aceite esencial, contiene una gran cantidad de polifenoles que no son extraídos con vapor de agua. Dentro de este grupo destacan los polifenoles diterpénicos: ácido carnósico y carnosol; flavonoides: apigenina, genkwanina y luteolina; y ácidos fenólicos como el ácido rosmarínico, ácido cumárico y ácido gálico (Del Baño *et al.*, 2003; Papageorgiou, Mallouchos, A., y Komaitis, 2008). Esta riqueza polifenólica permite la obtención de **extractos de romero ricos en polifenoles** hidrosolubles y liposolubles. La actividad antioxidante de los extractos de romero va a depender de su contenido en compuestos fenólicos: los extractos ricos en diterpenos fenólicos son más efectivos en sistemas lipídicos (Hopia, Huang, Schwarz, German, y Frankel, 1996) mientras que los extractos ricos en ácido rosmarínico son más efectivos en sistemas acuosos (Cuvelier, Bondety, y Berset, 2000). Por lo general, la fracción hidrosoluble del extracto tiene un rendimiento del 7,1% en peso con respecto a materia seca, mientras que el rendimiento para la fracción liposoluble, primera extracción con metanol, es del 10,8%. Sin embargo, el uso combinado de disolventes convencionales y/o fluidos supercríticos (Schwarz *et al.*, 2001; Del Baño *et al.*, 2003) (Figura 5) permite la obtención de extractos con rendimientos, concentraciones y proporciones diferentes de los 6 principales compuestos fenólicos en cantidad de la hoja destilada de romero (Tabla 6), permitiendo su adaptación a las diferentes aplicaciones según las necesidades.

Figura 5. Esquema de extracción de seis extractos de romero diferentes (CA 1- CA 5 y RO) (Del Baño *et al.*, 2003).

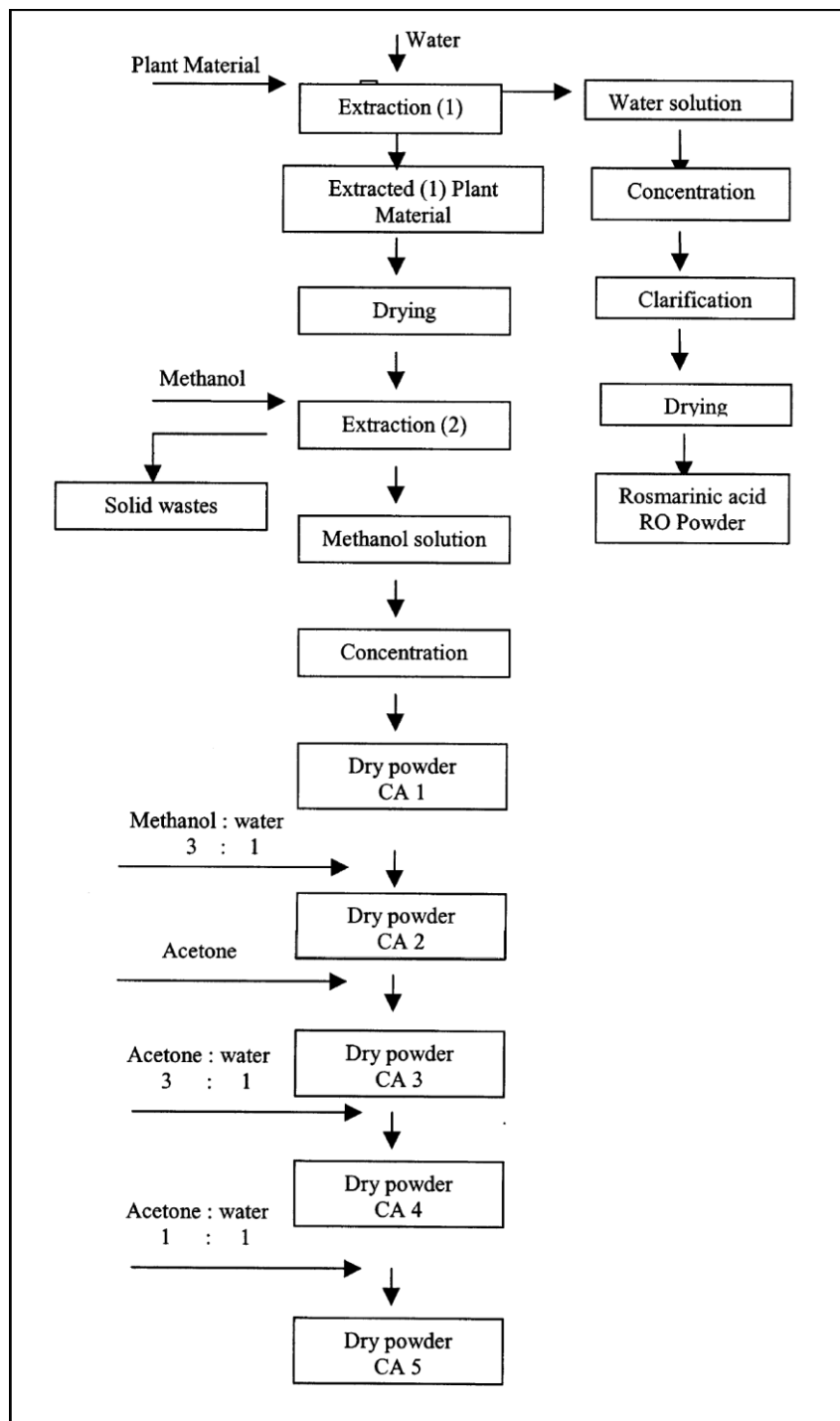


Tabla 6. Concentración de los principales compuestos polifenólicos presentes en diferentes extractos de hoja de romero (CA 1-CA 5 y RO) (% contenido absoluto) (Del Baño *et al.*, 2003).

polyphenolic compounds	CA 1	CA 2	CA 3
rosmarinic acid	0.35 ± 0.01	1.17 ± 0.02	0.10 ± 0.00
isoscutellarein 7- <i>O</i> -glucoside	0.02 ± 0.00	0.89 ± 0.02	0.02 ± 0.00
genkwanin	0.04 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.59 ± 0.01
carnosol	2.88 ± 0.03	7.13 ± 0.06	9.92 ± 0.06
carnosic acid	2.93 ± 0.03	6.13 ± 0.04	9.77 ± 0.07
12-methylcarnosic acid	0.41 ± 0.01	1.00 ± 0.02	2.03 ± 0.02
total	6.63 ± 0.03	16.44 ± 0.06	22.43 ± 0.07
polyphenolic compounds	CA 4	CA 5	RO
rosmarinic acid	0.07 ± 0.00	0.61 ± 0.01	8.46 ± 0.06
isoscutellarein 7- <i>O</i> -glucoside	0.06 ± 0.00	0.01 ± 0.00	4.46 ± 0.04
genkwanin	1.15 ± 0.02	1.50 ± 0.02	0.13 ± 0.01
carnosol	8.00 ± 0.06	13.14 ± 0.09	0.07 ± 0.00
carnosic acid	17.70 ± 0.09	28.30 ± 0.11	0.15 ± 0.01
12-methylcarnosic acid	0.45 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.01 ± 0.00
total	27.43 ± 0.09	44.15 ± 0.11	13.28 ± 0.06

La solubilidad de los polifenoles es una propiedad muy importante para su potencial actividad biológica, ya que influye en los mecanismos de transporte al interior de la célula.. Por su parte, la mayor o menor actividad de los distintos principios activos dependerá en gran medida del número de grupos hidroxilo, la estructura estereoespacial de la molécula tipo y la disposición de sus sustituyentes entre otros factores, así como de la longitud de la cadena alifática y la presencia de dobles enlaces. Si consideramos separadamente los principios activos en base a su solubilidad, el ácido carnósico y el carnosol serían responsables del 90% del potencial antioxidante de los extractos liposolubles de romero (Aruoma, Halliwell, Aeschbach, y Löliger, 1992; Frankel, Huang, Aeschbach, y Prior, 1996). En estos sistemas, la actividad antioxidante *in vitro* del ácido carnósico se considera tres veces mayor que la del carnosol y siete veces mayor que la mostrada por antioxidantes sintéticos como el BHA y el BHT (Richheimer, Bernart, King, Kent, y Bailey, 1996). En extractos hidrosolubles, el ácido rosmarínico aparece como el componente mayoritario, asociado igualmente a una importante actividad antioxidante (Del Baño *et al.*, 2003).

El mecanismo de la actividad antioxidante de los productos a base de romero dependerá por tanto de su composición química: las quinonas isoprenoides actúan como terminadores de la cadena de radicales libres y como quelantes de especies reactivas al oxígeno (ROS); los compuestos fenólicos se comportan como antioxidantes primarios al reaccionar con los radicales lipídicos e hidroxilo para convertirlos en productos estables; pueden actuar como quelantes de iones metálicos (principalmente Fe^{2+}), reduciendo así el ratio de formación de especies reactivas derivadas del oxígeno, y pueden actuar como protectores y regeneradores de otros antioxidantes, como es el caso de la vitamina E (Gladine, Morand, Rock, Bauchart y Durand, 2007). En el caso específico del ácido carnósico y carnosol, Pérez-Fons *et al.*, (2010) demostraron la capacidad de ambos diterpenos para alterar el orden lipídico y el modelo de empaquetado de las membranas fosfolípídicas, lo cual contribuiría a estabilizar dichas membranas y a impedir la propagación de ROS, suponiendo una protección extra contra el daño oxidativo. Así mismo, el ácido carnósico y el carnosol podrían inducir ciertas rutas metabólicas (Keap1-Nf2) responsables de incrementar la transcripción y síntesis de antioxidantes endógenos, como las enzimas de “fase 2” (GSTP, GSH, SOD) (Satoh, McKercher, y Lipton, 2013; Lin *et al.*, 2015). Ambos mecanismos podrían ayudar a explicar la mayor eficacia antioxidante de la suplementación dietética con respecto a la adición directa de diterpenos de romero.

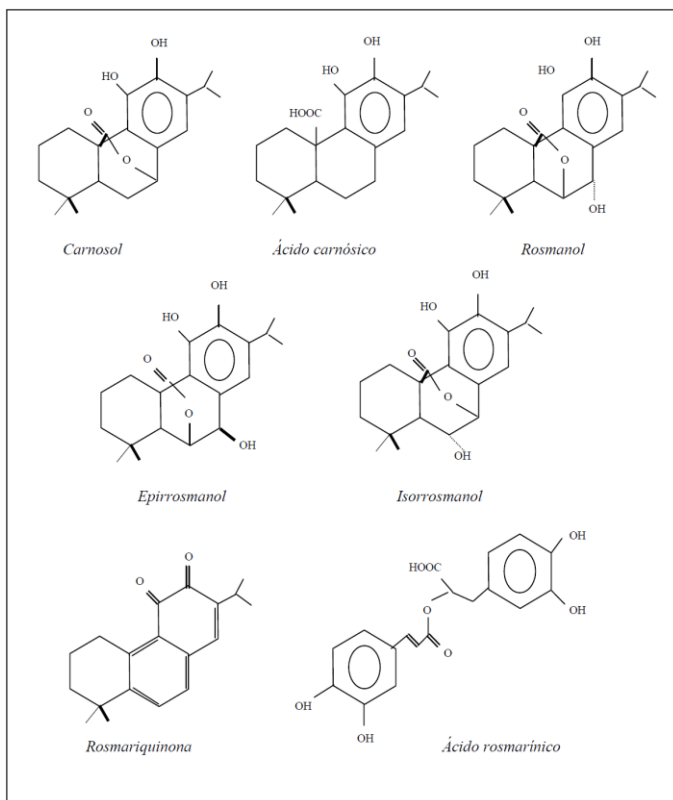


Figura 6. Estructura molecular de los principales compuestos antioxidantes aislados en romero (*Rosmarinus officinalis* L.) (Estrada, 2007).

El mecanismo de acción antibacteriano de los polifenoles del romero consiste en su interacción con la membrana celular, causando la fuga de los componentes celulares y cambios en la composición de los ácidos grasos y fosfolípidos, afectando así al metabolismo celular, al consumo de nutrientes, al transporte de electrones y provocando cambios en la síntesis de material genético. Además, Fung *et al.*, (1977) demostraron que estos compuestos pueden también interactuar con las proteínas de la membrana, causando la deformación en su estructura y funcionalidad. Estudios *in vitro* realizados con diferentes extractos de romero, asociaron la mayor concentración de ácido carnósico y carnosol con una mayor acción antibacteriana de los extractos (Moreno *et al.*, 2006). En el mismo sentido, recientemente se ha demostrado la acción inhibitoria de dosis de hasta 100 mg/kg de extracto de la hoja de romero, principalmente compuesto por ácido carnósico y, en menor proporción, carnosol, sobre el crecimiento de *E.coli* (Bueno *et al.*, 2015).

Por último, algunos compuestos polifenólicos, principalmente los flavonoides, están implicados en el funcionamiento del organismo a través de su participación en

actividades biológicas, como son: efecto vasodilatador; acción anticarcinogénica, antibacteriana y estimulante del sistema inmune (Middelton, Kandaswami, y Theoharides, 2000); antialérgicos y antivirales (Song, Lee, y Seong, 2005); presentan efectos estrogénicos e inhibiendo numerosas enzimas como las fosfolipasas A, ciclooxigenasas y lipooxigenasa, aunque estimulan otras como la superóxido dismutasa. Algunos de estos compuestos bioactivos reducen el riesgo de muchas enfermedades, incluyendo enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares, hipertensión diabetes y cáncer (Borrás-Linares *et al.*, 2015; Petiwala, Puthenveetil, y Johnson, 2013).

1.3.2 Aplicación del romero y derivados como conservante de la carne y productos cárnicos

El **uso de derivados de romero como aditivo** en carnes y productos cárnicos es bien conocido y sus efectos, tanto antioxidantes como antimicrobianos, han sido demostrados en la carne y en los productos cárnicos frescos y tratados por el calor (Ahn, Grün, y Mustapha, 2007; Camo, Beltrán, y Roncalés, 2008; Georgantelis, Ambrosiadis, Katikou, Blekas, y Georgakis, 2007; Karre, Lopez, y Getty, 2013; Kim, Cadwallader, Kido, y Watanabe, 2013; Nowak, *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012; Tajkarimi, Ibrahim, y Cliver, 2010). Sin embargo, como ya se ha comentado, la **suplementación dietética** con romero presentaría una doble ventaja frente a su empleo como aditivo alimentario: (i) desde el 2008 está prohibido el uso de aditivos antioxidantes en carnes frescas (Reglamento CE 1333/2008), aunque sí está permitido la deposición de antioxidantes en el músculo a través la dieta; (ii) está demostrado que la suplementación dietética ofrece mejores resultados que la adición exógena, ya que los principios activos son metabolizados y depositados en las membranas celulares, donde pueden llevar a cabo su actividad de forma más efectiva (Govaris *et al.*, 2004; Higgins, Kerry, Buckley, y Morrissey, 1999).

A la vista de lo anterior, el volumen de estudios específicos de la suplementación de romero y derivados sobre la calidad de la carne ha aumentado en los últimos años (Lopez-Bote, Gray, Gomaa, y Flegal, 1998; Cullen, Monahan, Callan, y O'Doherty, 2005; Caputi-Jambrenghi *et al.*, 2005; O'Grady *et al.*, 2006; Botsoglou *et al.*, 2007; Govaris *et*

Introducción

al., 2007; Janz *et al.*, 2007; Haak *et al.*, 2008; Nieto *et al.*, 2010a, 2011; Morán *et al.*, 2012a, 2012b, 2013; Smeti, Atti, Mahouachi, y Munoz, 2013; Vasta *et al.*, 2013; Beghelli *et al.*, 2014; Liotta, Chiofalo, D'Alessandro, LoPresti y Chiofalo, 2015; Cardinali *et al.*, 2015). En general, llama la atención la disparidad de resultados en distintas especies de abasto, en particular cuando se emplean aceites esenciales. Por ejemplo, la incorporación de 400 mg/kg y 600 mg/kg de aceite esencial a la dieta de corderos (tabla 7) no produjo ningún efecto sobre la oxidación lipídica, la pérdida de color y la calidad sensorial de la carne almacenada en refrigeración (*et al.* Smeti *et al.*, 2013), ni sobre el perfil de ácidos grasos o de volátiles (Vasta *et al.*, 2013), respectivamente. Aouadi *et al.*, (2014) encontraron un incremento en la capacidad antioxidante del músculo (medida con FRAP, DPPH, etc.) tras suplementar la dieta de corderos con 400 mg/kg de aceite esencial de romero, pero, sin embargo, no se observó efecto alguno sobre la oxidación lipídica (TBARS) ni sobre el color CIELab durante su refrigeración durante 7 días. Por el contrario, la incorporación a la dieta de 5 y 10 g/kg de hojas secas y flores de romero inhibió el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas, bacterias ácido-lácticas, enterobacterias y psicrótrofos en la carne de pavo (Govaris *et al.*, 2007). Igualmente, López-Bote *et al.*, (1998) encontraron que la inclusión en la dieta de aceites esenciales de romero y salvia resultaba más efectiva a la hora de reducir la oxidación lipídica de la carne que la suplementación con α -tocoferol. Esta disparidad de resultados podría achacarse a diferencias en la biodisponibilidad de los compuestos activos, en la metabolización de los compuestos por las bacterias del rumen, en el método de dosificación o en el empleo de un reducido número de unidades experimentales, como comentan Vasta *et al.* (2013). Un factor adicional a tener en cuenta a la hora de valorar el uso de aceite esencial de romero como suplemento dietético es su uso como sustituto de promotores antibióticos del crecimiento, especialmente en pollo y cerdo, aunque también en algunas especies ruminantes (Westendarp, 2005; Mathlouthi *et al.*, 2012). Tomando toda esta información en su conjunto, y teniendo en cuenta los estrechos márgenes económicos existentes en producción animal y el elevado precio que alcanza el aceite esencial en el mercado debido a sus otras aplicaciones, parece poco viable su uso como aditivo para alimentación animal orientado a mejorar la capacidad de conservación de la carne.

Por el contrario, el empleo de hoja destilada **libre de aceite y sus extractos** supone una alternativa más económica, cuya aplicación también ha sido estudiada en diversas especies con igual disparidad de resultados. La suplementación de la dieta con extracto de romero no tuvo efecto antioxidante sobre la carne porcina (Haak *et al.*, 2008; Beghelli *et al.*, 2014) o de conejo (Cardineli *et al.*, 2015). Liota *et al.*, (2015) encontraron un cierto incremento en el nivel de AGIs de la carne de cerdo suplementado con 1000 mg/kg de extracto de romero, aunque éste no resultó en una mayor estabilidad oxidativa, ya que probablemente, al ser la grasa más insaturada era más susceptible a la oxidación. La suplementación dietética de extracto de romero, en dosis de 1000 mg por animal y día, tampoco mejoró la estabilidad lipídica, el color o las propiedades sensoriales de carne de ternera almacenada en condiciones de venta al por menor (Ó Grady *et al.*, 2006).

En lo que respecta a la **especie ovina** (tabla 7), la inclusión de hoja de romero libre de aceite esencial en la dieta de ovejas gestantes permitió mejorar la estabilidad del color y reducir la oxidación lipídica y carga microbiana en la carne cruda de cordero almacenada en atmósfera modificada y refrigeración (Nieto *et al.*, 2010), logrando también dicha suplementación disminuir la oxidación lipídica y el deterioro sensorial de carne cocinada mantenida en refrigeración y aerobiosis (Nieto *et al.*, 2011a). En dichos estudios, el aumento de la capacidad conservante endógena de la carne fue relacionado con la ingesta de diterpenos, en particular, de ácido carnósico y carnosol (Moñino *et al.*, 2008). En la misma línea, la inclusión de pienso suplementado con extracto de romero de composición desconocida (1000 mg/kg) en la dieta de corderos resultó efectiva para prevenir el deterioro lipídico de la carne cruda almacenada en refrigeración (Caputi-Jambrenghi *et al.*, 2005). En cualquier caso, los resultados observados deben ser considerados con cautela, sobre todo si no se conoce la ingesta real de compuestos activos. La obtención de extractos de romero, al igual que sucede con todas las plantas aromáticas en mayor o menor medida, suele acarrear una gran **heterogenicidad** en la cantidad y proporción de compuestos fenólicos dependiendo de la especie, época del año, pluviosidad o zona de recogida de la planta (Jordán, Lax, Rota, Lorán, y Sotomayor, 2013; Sotomayor, 2009). Si sumamos la heterogeneidad de los extractos y la variabilidad intrínseca de los animales estudiados, se hace muy difícil

Introducción

extrapolar conclusiones definitivas. Este hecho supone un problema a la hora de valorar su potencial aplicación, ya que supone una falta de estandarización de los principios activos que derivará en una gran variabilidad de su efecto.

Visto lo anterior, parece más aconsejable emplear extractos dietéticos de romero (EDR o en inglés, DRE) con una composición tipificada de principios activos, que a su vez permita establecer una clara relación causa-efecto. Los trabajos preliminares a la presente tesis han demostrado que la suplementación de los corderos de cebo con 200 y 600 mg de DREs con diferente ratio ácido carnósico: carnosol (2:1-DRE y 1:1-DRE) por kg de pienso consigue ralentizar la oxidación de lípidos y pigmentos, el crecimiento microbiano y el deterioro sensorial de la carne cruda de cordero envasada en atmósfera protectora (Bañón *et al.*, 2012; Ortuño *et al.*, 2014; Serrano *et al.*, 2014ab). Por el contrario, una mayor suplementación (600 y 1200 mg/kg) con ácido carnósico sólo protegería contra la oxidación lipídica y no tendría efecto antimicrobiano (Morán *et al.*, 2012ab). El efecto protector de los DREs también se extendería a la carne cocinada. La suplementación de los corderos con 600 mg 1:1 DRE por kg pienso mejoró la estabilidad oxidativa sensorial de la carne cocinada, refrigerada y recalentada, simulando condiciones de catering (Serrano *et al.*, 2014b). Sin embargo, el uso de dosis inferiores de 1:1-DRE o de 2:1-DRE no tuvo efecto protector sobre la carne cocinada, revelando la importancia del contenido en carnosol del extracto (Serrano *et al.*, 2014ab). Por su parte, el uso de ácido carnósico a elevadas dosis (1200 mg/kg) permitió reducir el nivel de óxidos del colesterol pero no mejoró otros parámetros sensoriales en la carne cocinada de cordero (Morán *et al.*, 2012a). En otro estudio, los mismos autores encontraron una reducción en el nivel de compuestos volátiles marcadores de la oxidación lipídica de la carne cocinada aplicando una dosis inferior de ácido carnósico (600 mg/kg), lo cual resulta contradictorio con los resultados anteriores (Morán *et al.*, 2013).

Tabla 7. Cuadro resumen de los estudios sobre suplementación dietética con romero realizados en ovino.

Referencia	Producto empleado	Dosis	Animal	Almacenamiento	Periodo	Resultados obtenidos
Caputi-Jambrenghi <i>et al.</i> 2005	Extracto desconocido	1000 mg/kg	Corderos	Refrigeración	7 días	Carne cruda: reducción oxidación lipídica
Nieto <i>et al.</i> , 2010	HDLAE	10-20%	Ovejas	MAP y refrigeración	21 días	Carne cruda: mayor estabilidad color, reducción deterioro microbiológico, reducción oxidación lipídica y prevención deterioro organoléptico
Nieto <i>et al.</i> , 2011	HDLAE	10-20%	Ovejas	Cocinado y refrigeración	4 días	Carne cocinada: reducción oxidación lipídica y prevención deterioro organoléptico
Bañón <i>et al.</i> , 2012	Extracto (1:1 CA:CAR)	600 mg/kg	Cordero	MAP y refrigeración	21 días	Carne cruda: mayor estabilidad color, reducción deterioro microbiológico, reducción oxidación lipídica y prevención deterioro organoléptico
Morán <i>et al.</i> , 2012/2013	Ácido carnósico	600 – 1200 mg/kg	Cordero	MAP, refrigeración y cocinado	14 días	Carne cruda: reducción oxidación lipídica Carne cocinada: reducción formación COPs, mejor textura y mejor perfil VOCs (600 mg/kg)
Smeti <i>et al.</i> , 2013	Aceite esencial	600 mg/kg	Cordero	Refrigeración	9 días	Carne cruda: sin efectos sobre oxidación lipídica, prevención color ni calidad organoléptica
Vasta <i>et al.</i> , 2013	Aceite esencial	400 mg/kg	Corderos	-	Día 0	Carne cruda: sin efecto sobre grasa intramuscular ni perfil VOCs
Aouadi <i>et al.</i> , 2014	Aceite esencial	400 mg/kg	Corderos	Refrigeración	7 días	Carne cruda: incremento capacidad antioxidante; sin efectos sobre oxidación lipídica ni prevención color
Serrano <i>et al.</i> , 2014a	Extracto ratio 2:1 CA:CAR	600 mg/kg	Ovejas y corderos	MAP y refrigeración	21 días	Carne cruda: mayor estabilidad color, reducción deterioro microbiológico, reducción oxidación lipídica y prevención deterioro organoléptico
Serrano <i>et al.</i> , 2014a	Extracto ratio 2:1 CA:CAR	600 mg/kg	Ovejas y corderos	Cocinado y refrigeración	4 días	Carne cocinada: sin efectos sobre oxidación lipídica, prevención color ni calidad organoléptica
Serrano <i>et al.</i> 2014b	Extracto ratio 1:1 y 2:1 CA:CAR	200-400-600 mg/kg	Corderos	Cocinado y refrigeración	4 días	Carne cocinada: reducción oxidación lipídica y prevención deterioro organoléptico (600 mg/kg y ratio 1:1)
Ortuño <i>et al.</i> , 2014	Extracto ratio 1:1 CA:CAR	200-400 mg/kg	Corderos	MAP y refrigeración	14 días	Carne cruda: mayor estabilidad color, reducción deterioro microbiológico, reducción oxidación lipídica y prevención deterioro organoléptico

1.3.3 Factores que determinan la eficiencia de extractos dietéticos de romero para conservar la carne

Incorporación al pienso

Los productos y subproductos derivados de las PAMs empleados en alimentación animal se engloban en el grupo de “sustancias, microorganismos o preparados distintos de las materias primas y premezclas, que se añaden intencionadamente al alimento o al agua para influir favorablemente en: (i) las características de los piensos o de los productos de origen animal, (ii) las consecuencias ambientales de la producción animal, (iii) los rendimientos productivos, el bienestar, la salud, mediante su influencia en el perfil de la flora microbiana intestinal o la digestibilidad de los alimentos, o (iv) por su efecto coccidiostático o histomonostático.” (Reglamento CE 1831/2003). La vía y forma de administración del aditivo en cuestión serán determinantes sobre la eficacia final, motivo por el que es fundamental tener en cuenta las propiedades físicas de los compuestos activos. La vía más directa y efectiva de administración de aditivos sería a través del agua del bebida; sin embargo, esta vía no es viable en muchas ocasiones dada la escasa hidrosolubilidad de muchos de los compuestos empleados como suplementos con propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas, como los principales diterpenos del romero (ácido carnósico y carnosol). Otros factores a tener en cuenta serán la transmisión de sabores u olores extraños que creen rechazo en el animal, o la capacidad de conservación del producto en un medio acuoso que puede favorecer su rápido deterioro.

Hoy en día la alimentación de pequeños rumiantes (ovino y caprino) en producción intensiva, o como suplemento en sistemas semiextensivos, se realiza mediante piensos granulados o pellets. La elaboración de pellets consiste en un proceso donde las materias primas en forma de harinas son convertidas en porciones de material que resultan más apetecibles y digeribles por los animales. El proceso de peletizado consiste en la aglomeración de las pequeñas partículas de una mezcla, en unidades largas o comprimidos densos mediante un proceso mecánico combinado con la aplicación de humedad, calor y presión.

Las **condiciones de temperatura, presión y humedad junto con el tiempo de exposición** a estos factores serán los principales aspectos a tener en cuenta durante el procesado del pienso de cara a asegurar la presencia en condiciones óptimas de los principios activos en el producto final. Debido a la gran sensibilidad de los compuestos activos (tocoferoles, polifenoles) a las elevadas temperaturas y a la exposición a la luz (Zhang *et al.*, 2012), resulta necesario determinar la cantidad de compuestos activos añadidos antes y presentes después en el pienso peletizado con el fin de poder estimar el rendimiento de los mismos. Será fundamental calcular las cantidades necesarias que aseguren una dosis efectiva en el pienso final. En el caso de los diterpenos del romero, Jordán *et al.* (2014) estudiaron la degradación en el pienso de dos DREs con diferente proporciones ratio ácido carnósico:carosol. Aplicando las mismas condiciones durante la fabricación del pienso (70-75°C de temperatura y 2 bar de presión durante un tiempo no superior a 17 minutos), observaron un mayor porcentaje de degradación de la fracción diterpénica en el pienso elaborado con 2:1-DRE que con 1:1-DRE. Por tanto, el carosol, un compuesto resultante de la oxidación del ácido carnósico, incrementó la estabilidad de este último estabilizando mejor la fracción diterpénica del extracto durante el peletizado. Este tipo de piensos suele presentar en torno a un 10% de humedad y se suelen conservar a temperatura ambiente. No obstante, no hay datos sobre la estabilidad de estos principios durante el **almacenamiento y conservación del pienso**.

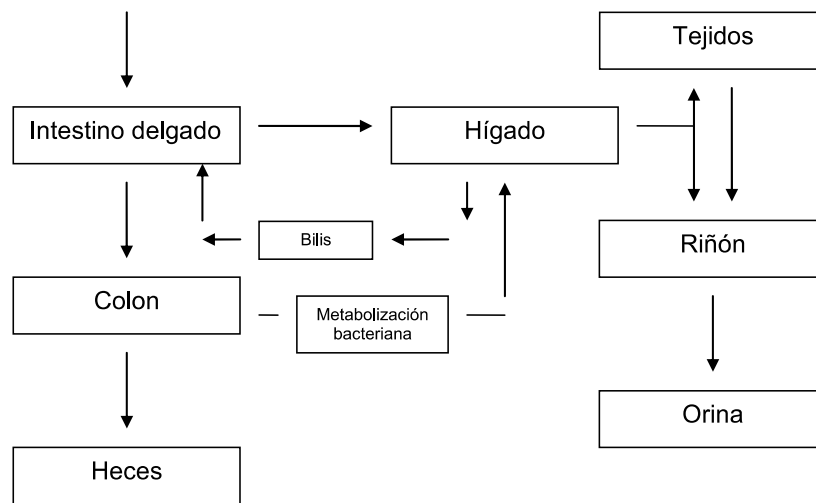
Biodisponibilidad y bioactividad

La eficacia antioxidante de un compuesto dietético depende directamente de su absorción en el tracto gastrointestinal y su deposición en los tejidos (Vasta y Luciano, 2011). Factores como la **biodisponibilidad** de los polifenoles, la actividad de sus metabolitos, su distribución y acción en los tejidos diana, o la concentración mínima efectiva, son poco conocidos y varían ampliamente de unos polifenoles a otros. Su estructura química y el tipo de glicósido unido a las agliconas (compuestos mayoritarios de los polifenoles en los alimentos vegetales) determinará su ratio de absorción, metabolismo y finalmente su actividad biológica. Debido a las modificaciones sufridas por los polifenoles tras su metabolización en hígado u otros órganos, o por las bacterias intestinales o ruminales, los metabolitos resultantes que

llegan a la sangre y a los órganos diana podría presentar actividades biológicas diferentes en comparación con las moléculas iniciales (Oi, Hashimoto, y Kanazawa, 2008), por lo que su identificación resulta indispensable para valorar los mecanismos de acción.

Fig 7. Rutas de polifenoles dietéticos y sus metabolitos (Fuente: Scalbert *et al.*, 2002).

Compuestos fenólicos en la dieta



El incremento de la capacidad antioxidante determinado en el plasma, orina y otros órganos (riñón, hígado, músculo) tras el consumo de polifenoles constituye una **evidencia indirecta** de su absorción intestinal y posterior metabolización. Este hecho, por ejemplo, se ha observado en el plasma, músculo, hígado y corazón de pollos suplementados con subproductos de orujo de oliva (Gerasopoulos *et al.*, 2015), en el plasma y músculo de cabritos suplementados con extractos de plantas ricas en polifenoles (Suman, Tyagi, y Phondba, 2015), o en el hígado de corderos alimentados con 0,15% de naringina (Bodas *et al.*, 2012). Los estudios con romero han dado lugar a resultados dispares. O’Grady *et al.* (2006) no encontraron un incremento en la actividad antirradicalaria en el plasma de terneros suplementados con 1000 mg DRE por animal y día; mientras que, por el contrario, la suplementación dietética con hoja destilada de romero (10-20%) (Moñino *et al.*, 2008), aceite esencial de romero (Aouadi *et al.*, 2014) y DRE rico en ácido carnósico y carnosol (600 mg/kg) (Jordán *et al.*, 2014)

sí mejoraron la capacidad antirradicalaria en el músculo y/u otros órganos (hígado y riñón). En otro estudio similar, se comprobó que la inclusión de hojas destilada de romero y tomillo en la dieta de oveja durante la gestación y lactación modificó el perfil polifenólico del plasma y las excreciones, poniendo de manifiesto que los polifenoles procedentes de las plantas aromáticas ensayadas se excretan, en su forma primitiva, principalmente a través de la orina (Moñino, 2010). Igualmente se observó un aumento en la concentración de algunos polifenoles (mayoritariamente, ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico) en el plasma de cabritos alimentados con hoja destilada de romero (Martínez *et al.*, 2007b).

A pesar de las incógnitas en torno a la metabolización de los polifenoles en especies ruminantes, la deposición muscular de polifenoles del romero ha sido demostrada en la carne de cordero (Moñino *et al.*, 2008; Morán *et al.*, 2013; Jordán *et al.*, 2014). La alimentación de ovejas gestantes y lactantes con un 10% o un 20% de hoja destilada de romero incrementó la concentración de ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico en los músculos *Deltoideus* y *Obliquus externus abdominis* del cordero (Moñino, 2008). Estudios posteriores han confirmado la deposición de diterpenos del romero en músculo y otros órganos de detoxificación (hígado, riñón) de los corderos suplementados con DRE (Morán *et al.*, 2013; Jordán *et al.*, 2014). Se ha establecido una correlación positiva entre la aportación de carnosol en la dieta y la transferencia de diterpenos al músculo. Un **ratio** ácido carnósico: carnosol de 1:3 (107: 374) (Moñino, 2010) y 1:1 (290: 350) (Jordán *et al.*, 2014) consiguió alcanzar una mayor transferencia de diterpenos en su forma original (ácido carnósico y carnosol) o de sus metabolitos ($C_{19}H_{22}O_3$), que cuando la proporción de ácido carnósico fue 2:1 (445:240) (Jordán *et al.*, 2014) o cuando añadió ácido carnósico solamente (Morán *et al.*, 2013). Esta mayor transferencia de diterpenos fue asociada con una mayor actividad antirradicalaria en el músculo y en los órganos de detoxificación (Jordán *et al.*, 2014). Este hecho fue confirmado en los estudios sobre vida comercial de la carne fresca y cocinada de cordero, donde un incremento en la proporción de carnosol en el extracto fue crucial para mejorar su eficacia antioxidante (Serrano *et al.*, 2014a).

Un aspecto importante de cara a la rentabilización de este tipo de aditivos en el pienso es **la dosis y el periodo de dosificación**. Desde un punto de vista económico, lo más rentable es utilizar la menor dosis posible de extracto durante el menor tiempo posible, preferiblemente, sólo en corderos de cebo, aunque parece claro de la cantidad de diterpenos depositados en músculo va a depender de su nivel de ingesta. Morán *et al.* (2013) detectaron ácido carnósico en el músculo de cordero de cebo suplementado con 1,2 g kg⁻¹ de ácido carnósico puro, pero no cuando se utilizó una dosis de 0,6 g kg⁻¹. Las evidencias obtenidas sugieren que, al igual que sucede con la suplementación de otros antioxidantes, como la vitamina E, la relación entre ingesta y deposición de diterpenos de romero deja de ser proporcional a partir de niveles altos de dosificación. Por ejemplo, el aumento del 10% al 20% de la ingesta de hoja destilada de romero por parte de las ovejas gestantes y lactantes no incrementó la deposición de polifenoles en el músculo del cordero (Moñino *et al.*, 2008) y apenas mejoró la vida comercial de los filetes de carne (Nieto *et al.*, 2010a). De modo similar, la suplementación adicional de las ovejas gestantes y lactantes con 2:1-DRE apenas mejoró la capacidad conservante de la carne de cordero, alcanzándose resultados similares a los obtenidos en los corderos suplementados sólo durante el cebo (Serrano *et al.*, 2014a). En base a estos resultados, y cara a una optimización económica, la suplementación con DRE durante el cebo del cordero podría considerarse la más apropiada. En esta línea, un estudio reciente indica como la suplementación con 500 mg de alfa-tocoferol/kg pienso durante etapas finalizadoras de entre 10 y 30 días serían suficientes para asegurar la estabilidad oxidativa y del color de carne de cordero almacenada en refrigeración (Ripoll, González-Calvo, Molino, Calvo, y Joy, 2013). Por tanto, una intensificación con el suplemento adecuado al final del periodo de cebo podría ser suficiente para obtener resultados positivos.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos hasta la fecha en cordero Segureño de cebo, se puede afirmar que el efecto conservante sobre la carne del 1:1-DRE, el extracto más efectivo, va a depender del nivel de dosificación empleado: 200 mg kg⁻¹ sería la dosis mínima efectiva para mejorar la capacidad de conservación de la carne cruda envasada en atmósfera modificada y mantenida en refrigeración, mientras que sería necesario elevar esta dosis a 600 mg kg⁻¹ para conseguir un efecto antioxidante

en la carne cocinada, refrigerada y recalentada (Bañón *et al.* 2012; Ortuño *et al.*, 2014; Serano *et al.*, 2014). A continuación se expone una figura que resume el proceso seguido por el grupo de Tecnología Alimentaria de la Universidad de Murcia y el grupo de Plantas Aromáticas y Medicinales del IMIDA, desde el testaje de la hoja destilada hasta la optimización del extracto de romero para alimentación animal, previos a los estudios descritos en la presente tesis (figura 8).

Uso subproducto de la extracción del aceite esencial de romero (hoja destilada) como aditivo pienso de ovejas



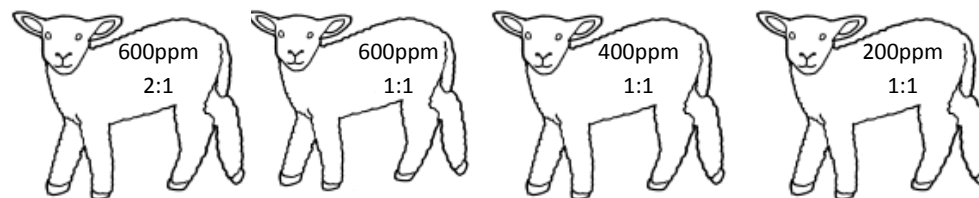
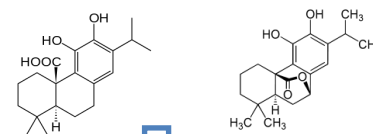
Extracto tipificado de romero rico en ácido carnósico y carnosol (30%)

+ Elimina la variabilidad en la ingesta de principios activos

+ Permite controlar los niveles de compuestos activos



Optimización de la dosis y ratio del extracto



Effects of dietary rosemary extract on lamb spoilage under retail display conditions Bañón *et al.*, 2012

Use of dietary rosemary extract in ewe and lamb to extend the shelf life of raw and cooked meat Serrano *et al.*, 2014

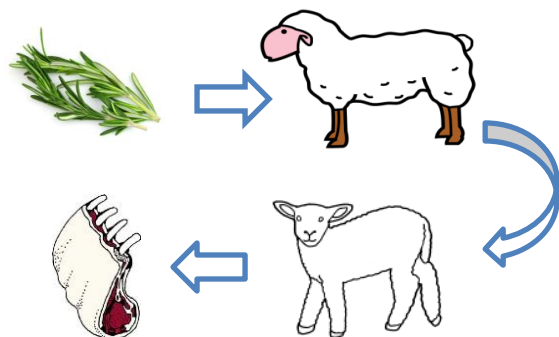
Improving the sensory and oxidative stability of cooked and chill-stored lamb using dietary rosemary diterpenes Serrano *et al.*, 2014

Shelf life of meat from lambs given essential oil-free rosemary extract containing carnosic acid plus carnosol at 200 or 400mg/kg Ortuño *et al.*, 2014

Relevance of the carnosic acid/carnosol ratio for the level of rosemary diterpene transfer and for improving lamb meat antioxidant status. Jordán *et al.*, 2014



- 1:1-DRE mg/kg es más efectivo que 2:1-DRE kg-1
- Efecto antioxidante y antimicrobiano
- 200 mg 1:1-DRE mg/kg: dosis mínima efectiva carne envasada en atmósfera modificada y refrigerada
- 600 mg 1:1-DRE mg/kg: dosis mínima efectiva carne cocinada, refrigerada y recalentada



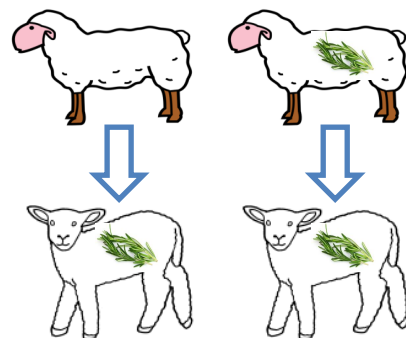
Polyphenolic Transmission to Segureño Lamb Meat from Ewe's Diet Supplemented with the Distillate from Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves Moñino *et al.*, 2008

Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): influence on lamb meat quality. Nieto *et al.*, 2010

Effects in ewe diet of rosemary by-product on lipid oxidation and the eating quality of cooked lamb under retail display conditions Nieto *et al.*, 2011



Relevancia del ácido carnósico y el carnosol



Use of dietary rosemary extract in ewe and lamb to extend the shelf life of raw and cooked meat Serrano *et al.*, 2014



Se considera el cebo como suficiente para conseguir efecto protector sobre capacidad conservación de la carne

2. Justificación y objetivos

Justification and objectives

2.1 Justificación

El compendio de trabajos recogido en la presente tesis doctoral está centrada en la aplicación práctica del extracto tipificado de romero para mejorar la calidad de la carne de cordero de una forma saludable, ecológica y económicamente viable.

El primer trabajo "*Relationship between antioxidant status and oxidative stability in lamb meat reinforced with dietary rosemary diterpenes*" establece la relación existente entre la concentración de metabolito diterpénico en músculo, la capacidad antioxidante (DPPH, FRAP, ABTS) de la carne fresca y los principales índices empleados para evaluar el deterioro oxidativo de la carne (Hue, color magro, hexanal, rancidez, TBARS, oxidación de proteínas). La carne es un sistema complejo donde el equilibrio de factores anti- y pro-oxidantes, tanto endógenos como exógenos, determina la evolución de los procesos oxidativos durante el almacenamiento. Los principales métodos de determinación de la capacidad antioxidante se basan en medir la capacidad antirradicalaria de diferentes extractos cárnicos en este caso. Los efectos observados en estudios *in vivo* sugieren que otros factores distintos a la actividad antirradicalaria podrían estar involucrados en la actividad antioxidante (Jordán *et al.*, 2014), como, por ejemplo, los cambios reológicos inducidos por los diterpenos en las membranas fosfolipídicas (Pérez-Fons *et al.* 2010), o la activación de ciertas rutas metabólicas que incrementarían la producción de enzimas de "fase 2" (Lin *et al.*, 2015). La hipótesis de trabajo fue que los valores de capacidad antioxidante determinados a partir de diferentes métodos analíticos (DPPH, FRAP y ABTS) podrían no tener la misma precisión para predecir el posterior deterioro oxidativo de la carne. La existencia de correlación entre diferentes mediciones preliminares de la capacidad antioxidante y los índices físico-químicos y sensoriales observados a lo largo de la vida útil de la carne podría resultar de gran utilidad de cara a evaluar precozmente la eficacia de los antioxidantes, permitiendo ahorrar tiempo y dinero.

El segundo trabajo "*Antioxidant and antimicrobial effects of dietary supplementation with rosemary diterpenes (carnosic acid and carnosol) vs vitamin E on lamb meat packed under protective atmosphere*" compara de forma directa y en dosis

Justificación y objetivos

equivalentes la suplementación dietética con 1:1-DRE y α -tocoferol, el antioxidante de referencia en producción animal, con el objeto de evaluar sus ventajas y limitaciones. El nivel mínimo de suplementación con α -tocoferol para obtener una protección óptima en la carne de cordero fue establecido por López-Bote *et al.*, (2001) en 500 mg/kg pienso. En el estudio se empleó una dosis algo más alta (600 mg/kg) de extracto 1:1-DRE y vitamina E, que en el primer caso ya había sido probada con éxito en carne fresca y cocinada. La hipótesis de trabajo fue que la suplementación de la dieta de los corderos con vitamina E podría tener un mayor efecto antioxidante sobre la carne que el 1:1-DRE, pero, en cambio, no tendría actividad antimicrobiana, coincidiendo con estudios previos (Álvarez *et al.*, 2008; Lauzurica *et al.*, 2005; Ripoll *et al.*, 2011), lo que supondría un valor añadido en el caso del extracto de romero. Por tanto, había que establecer la posible extensión de la vida útil de la carne de cordero en condiciones de venta al por menor proporcionada por ambos suplementos en base a determinaciones físico-químicas, microbiológicas y sensoriales, y en particular, conocer si el extracto de romero potenciaba o no el efecto antimicrobiano de la atmósfera protectora rica en CO₂. La información obtenida sería concluyente para la posible comercialización del extracto dietético de romero como aditivo para alimentación animal.

En el último trabajo "*Use of dietary rosemary diterpenes to extend the preservation of sulphited-lamb products*" se dio un paso adelante, al plantear nuevas aplicaciones del extracto, en concreto, se quería estudiar la posibilidad de reducir la dosis máxima de sulfitos permitida (450 mg/kg) para conservar preparados cárnicos tipo hamburguesa mediante el procesado de carne de cordero reforzada con diterpenos de romero. El dióxido de azufre (SO₂) es el aditivo conservante autorizado en preparados cárnicos crudos debido a su efecto antimicrobiano, antioxidante y sobre todo, estabilizador de la mioglobina (Shayne, 2005). Sin embargo, se considera especialmente importante minimizar o sustituir su uso en los productos cárnicos debido a sus contraindicaciones sanitarias (FAO/OMS, 2009). Estudios previos habían mostrado la posibilidad de reducir la cantidad de SO₂ necesaria para conservar los preparados cárnicos mediante la incorporación de ingredientes naturales de carácter polifenólico, como el té verde y la semilla de uva (Bañón *et al.*, 2007). La hipótesis de trabajo fue que la acción antioxidante de los diterpenos depositados en la carne podía proteger a los sulfitos

frente a las reacciones de degradación, y que se podría alcanzar el mismo efecto conservante con menos sulfitos. Por tanto, procesando carne reforzada con diterpenos de romero y aplicando tecnologías de elaboración adecuadas, sería posible reducir los requerimientos de sulfitos en productos cárnicos crudos.

Justification

The collection of papers gathered in the present PhD thesis focuses on the practical application of an optimised rosemary extract to improve meat quality in a healthy, ecological and economically viable way.

The first paper, "*Relationship between antioxidant status and oxidative stability in lamb meat reinforced with dietary rosemary diterpenes*", establishes the existing relationship between the diterpenic metabolic concentration in muscle, the antioxidant capacity (DPPH, FRAP, ABTS) of fresh meat and the main indexes employed to evaluate meat oxidative spoilage (Hue, lean colour, hexanal, rancidity, TBARS, protein oxidation). Meat is a complex system in which the equilibrium between pro- and antioxidant factors, both endogenous and exogenous, determines the evolution of the oxidative processes during meat storage. The most common methods employed to determine antioxidant capacity are based on the radical scavenging activity of the meat extracts. The results obtained from *in vivo* experiments suggest that other factors beyond the radical scavenging activity are involved in the antioxidant capacity (Jordán *et al.*, 2014), such as phospholipidic membranes rheological changes induced by diterpenes (Pérez-Fons *et al.*, 2010), or the activation of different metabolic routes, which yield an increase in phase 2 enzymes (Lin *et al.*, 2015). The working hypothesis was that the antioxidant capacity values obtained from the common analytical methods (DPPH, FRAP, ABTS) do not have the same precision for predicting subsequent oxidative meat spoilage. The existence of correlation between these preliminary measurements of the antioxidant capacity and the physical-chemical and sensorial indexes observed throughout the meat shelf-life could be of great interest for the early evaluation of antioxidants, with important savings in time and money.

In the second paper, “*Antioxidant and antimicrobial effects of dietary supplementation with rosemary diterpenes (carnosic acid and carnosol) vs vitamin E on lamb meat packed under protective atmosphere*”, we made a direct comparison between dietary supplementation with 1:1-DRE and equivalent doses of α -tocoferol, the reference antioxidant in animal production, with the aim of evaluating its advantages and limitations. The minimum level of α -tocoferol supplementation necessary to obtain an optimum protection of lamb meat was established by López-Bote *et al.* (2001) as 500 mg/kg feed. In the present study, we used doses successfully tested previously on fresh and cooked meat (600 mg/kg) of both 1:1-DRE and vitamin E. The working hypothesis was that the supplementation of lamb diet with vitamin E could have a better antioxidant effect on meat than 1:1-DRE, but, in contrast, would not show any antimicrobial activity, as was indicated in previous studies (Álvarez *et al.*, 2008; Lauzurica *et al.*, 2005; Ripoll *et al.*, 2011). This would imply an extra value for the rosemary extract. Therefore, it was deemed necessary to establish the potential shelf-life extension of lamb meat in retailing conditions using both dietary supplements as seen from physical-chemical, microbiological and sensorial determinations. Particularly, it was necessary to know whether the 1:1-DRE improved the antimicrobial effect of the CO₂-enriched atmosphere employed. The information obtained would be conclusive for the potential commercial use of the dietary rosemary extract as additive in animal feeding.

The last paper, “*Use of dietary rosemary diterpenes to extend the preservation of sulphited-lamb products*”, goes one step beyond, as it considers new applications of the extract. More specifically, we considered the possibility of reducing the maximum permitted dose of sulphites in the EU (450 mg/kg) for preserving burger-type meat products through the processing of meat reinforced with rosemary diterpenes. Sulphur dioxide (SO₂) is the authorized preservative additive for raw meat products due to its antimicrobial, antioxidant and, especially, myoglobin stabilisation effects (Shayne, 2005). However, there is growing pressure to minimise or substitute its use in meat products due to health concerns (FAO-WHO, 2009). Previous studies showed the possibility of reducing the dose of SO₂ needed for meat products preservation by through the incorporation of natural ingredients of a polyphenolic nature, such as

green tea and grape seed (Bañón *et al.* 2007). The working hypothesis was that the antioxidant action of the diterpenes deposited in meat could protect sulphites against degradation reactions, and, thus, it could be possible to obtain the same effect with a lower dose of SO₂. Therefore, the processing of meat reinforced with rosemary diterpenes together with the application of suitable production technologies, would allow a reduction in the sulphites needed for raw meat products.

2.2 Objetivos

El objetivo general del trabajo fue demostrar la aplicabilidad de un extracto dietético de romero (EDR) para mejorar la capacidad de conservación de la carne de cordero.

The general aim of the work was to demonstrate the suitability of a dietary rosemary extract (DRE) for improving the conservation capacity of the lamb meat.

Objetivos específicos:

Primero. Determinar la correlación entre las medidas de actividad antioxidante (DPPH, FRAP y ABTS) en la carne fresca y los diferentes índices físico-químicos y sensoriales utilizados para monitorizar la estabilidad oxidativa de la carne de cordero suplementada con diferentes dosis de antioxidantes de romero

First. To determine the relationship between antioxidant status, assessed as DPPH·, ABTS·+ and FRAP, and the values of different physical, chemical and sensory indices used to monitor oxidative stability in lamb meat reinforced with different levels of rosemary antioxidants.

Segundo. Comparar el efecto conservante alcanzado mediante la suplementación de la dieta con 1:1-DRE y una dosis equivalente de acetato de α -tocoferol sobre la vida comercial del lomo de cordero mantenido en condiciones de venta al por menor (atmósfera protectora rica en O₂ y CO₂, refrigeración e iluminación fluorescente).

Justificación y objetivos

Second. To compare the effects of 1:1-DRE containing carnosic acid and carnosol and an equivalent dose of α -tocopheryl acetate on the shelf life of lamb loin in retailing conditions (high O₂/CO₂ MAP, refrigeration and fluorescent lighting).

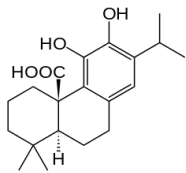
Tercero. Estudiar la posibilidad de potenciar la acción conservante de los sulfitos en preparados cárnicos a través de la suplementación con 1:1-DRE, junto con la posibilidad de reducir los requerimientos de sulfitos necesarios para conservar preparados cárnicos tipo hamburguesa.

Third. To study the possibility of enhancing the preservative actions of sulphites in lamb patties through supplementation with a DRE containing carnosic acid and carnosol; the possibility of reducing the SO₂ dose required to preserve the patties was also considered.

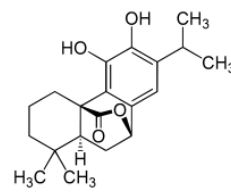
3. Metodología *Methodology*

A continuación se expone una representación esquemática de la **metodología** empleada en el presente compendio de publicaciones dividida en base a los 2 experimentos contemplados: Experimento 1 (Trabajos 1 y 3; Material suplementario 1) / Experimento 2 (Trabajo 2; Material suplementario 2 y 3)

- ✓ Las flechas verdes corresponden a las diferentes dietas suplementadas con DRE 1:1 según la dosificación (R200/R400 Trabajos 1 y 3; R: Trabajo 2).
- ✓ La flecha roja corresponde a la dieta suministrada con alfa-tocoferol (E: Trabajo 3).
- ✓ Los corderos con la letra C corresponden a las dietas no suplementadas en cada caso (Trabajos 1,2 y 3)
- ✓ El cuadro de texto central muestra las condiciones de cría y los pesos al destete y sacrificio de los animales.
- ✓ Los cuadros de texto con línea continua corresponden a los parámetros estudiados en la carne para evaluar el deterioro oxidativo, microbiológico y/o sensorial en cada trabajo (ver sección 4).
- ✓ Los cuadros de texto con línea discontinua corresponden a las condiciones de almacenamiento de la carne en cada trabajo.

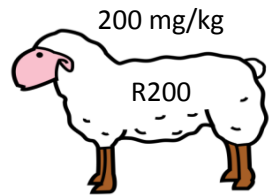


Extracto Romero Libre Aceite
Esencial
Ácido Carnósico: Carnosol
1:1



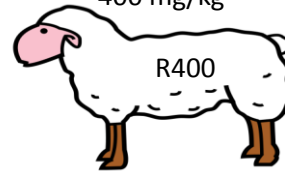
Methodology

Experimento 1



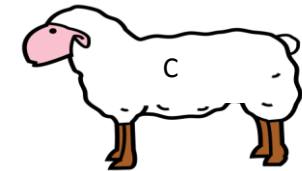
200 mg/kg

R200



400 mg/kg

R400



C

Corderos raza Segureña – 9 animales/dieta – Período de cebo: 80±7 días – Peso sacrificio: 25±1 kg – Peso canal: 13±1 kg

Trabajo 1: Capacidad antioxidante

C / R200 / R400

Longissimus thoracicus et lumborum

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
DPPH / TEAC / FRAP
Determinación Analitos

MAP
800 lx
2°C
0-7-11-14 días

ESTABILIDAD OXIDATIVA
ΔTBARS / ΔPOx / ΔHex / ΔH* / ΔE /
ΔOR / ΔDC

Trabajo 3: Reducción SO₂

C / R400
Pierna

PICADO

+ 0 / 150 / 300 / 450 mg/kg SO₂
PATTIES 20g

C0
C150
C300
C450

MAP
800lx
2°C
0 – 3 – 6 – 9 días

R0
R150
R300
R450

CVMO / POx / CIEL*a*b* / Microbiología
Análisis sensorial (QDA) / pH / CRA

Material suplementario 1:
Calidad aromática

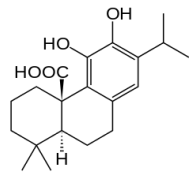
C / R200 / R400

Longissimus thoracicus et lumborum

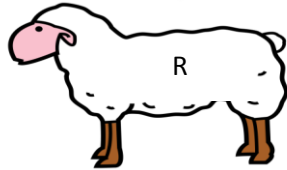
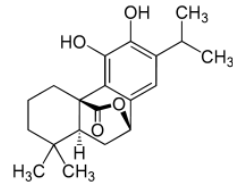
FILETEADO

MAP
2°C
800 lx
0 – 7 – 11 – 14 días

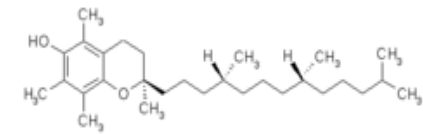
Perfil de Volátiles
Correlación con
principales parámetros
oxidación



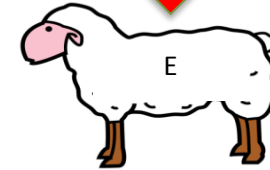
1:1-DRE
600 mg/kg



Experimento 2



Vitamina E - 600 mg/kg



Corderos raza Segureña - 10 animales/dieta – Periodo cebo: 50±8 días – Peso sacrificio: 24±1 kg – Peso canal: 12±1 kg

Trabajo 2: Comparación con antioxidante de referencia



C / E / R

Longissimus thoracicus et lumborum



FILETEADO

MAP / 2°C / 800 lx
0 – 7 – 11 – 14 – 18 días

Determinación Vitamina E
Determinación Terpenos
TBARS / POx
CIEL*a*b* / pH / CRA
Microbiología
Análisis Sensorial (QDA)

Material suplementario 2: Calidad Microbiológica



C / E / R

Pierna



PICADO

AIRE / VACÍO / MAP
4°C / 800 lx (ciclo 12h)
1 – 4 - 7 días

Microbiología
(TVC / ENB / LAB / *Pseudomonas spp* / *B.thermosphacta*)
pH / TBARS
CIEL*a*b*
Análisis Sensorial (QDA)

Material suplementario 3: Calidad Nutricional



C / E / R

Paletilla



PICADO

COCINADO

AIRE
4°C / 800 lx (ciclo 12h)
0 - 2 días

Determinación tocoferol
TBARS / POV
Perfil Ácidos Grasos
Determinación Esteroles
COPs

4. Resultados y discusión

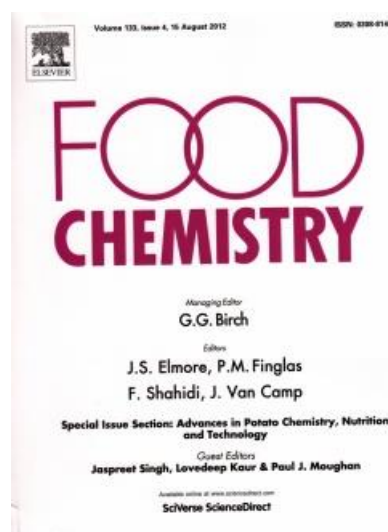
Results and discussion

Revista: *Food Chemistry*

Factor Impacto (2015): 3.391

Ámbito: Food science & technology

Rango: 8 / 123 (Q1)



Título: Relationship between antioxidant status and oxidative stability in lamb meat reinforced with dietary rosemary diterpenes

Authors: Jordi Ortuño, Rafael Serrano, María José Jordán, Sancho Bañón

Resumen:

The relationship between the antioxidant status of fresh meat and oxidative stability of chilled-packed meat obtained from lambs fed on a diet supplemented with two different doses of a rosemary extract containing carnosic acid and carnosol was studied. The incorporation of rosemary extract in the lamb diet led to the deposition of functional levels of the diterpenic metabolite $C_{19}H_{22}O_3$ in meat, which improved its stability against oxidation. The antioxidant status could be assessed through both the radical scavenging capacity (DPPH and TEAC) and the ferric reducing power (FRAP). In general, antioxidant status values correlated better ($P < 0.05$) with the changes in CIELAB colour, malondialdehyde and sensory scoring than with the changes in hexanal and protein carboxylation measured in the lamb cuts kept under protective atmosphere for up to 14 days. The FRAP and DPPH assays were more suitable than the TEAC assay for predicting meat oxidation and any resulting discolouration and rancidity.

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615009528>

Título Revista: *Meat Science*

Factor de Impacto (2015): 2.615

Ámbito: Food science & technology

Rango: 21 / 123 (Q1)



Título: Antioxidant and antimicrobial effects of dietary supplementation with rosemary diterpenes (carnosic acid and carnosol) vs vitamin E on lamb meat packed under protective atmosphere.

Autores: Jordi Ortuño, Rafael Serrano, and Sancho Bañón

Resumen:

The antioxidant and antimicrobial effects on lamb meat of the dietary use of rosemary diterpenes and vitamin E were compared. Thirty fattening lambs were assigned to three diets: (C) control; (R) C plus 600 mg kg⁻¹ carnosic acid and carnosol at 1:1 w:w; or (E) C plus 600 mg kg⁻¹ α -tocopherol. The deposition of the dietary supplements in muscle was determined. Microbial quality (Total Viable Counts, Lactic Acid Bacteria, *Enterobacteriaceae*, *E.coli* and *Salmonella spp*), oxidative stability (CIELab color, malondialdehyde and total carbonyls) and sensory attributes (appearance and odor) were determined in loin stored at 2°C under 70% O₂/30% CO₂ atmosphere. Microbial quality was ensured by packaging and chilling. The E-diet was more effective (P<0.05) than the R-diet in preventing meat oxidation, although the latter had antimicrobial effects on meat. The shelf life of lamb (assessed as the loss of freshness) could be increased by 5 (R-diet) or 10 (E-diet) days.

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174015300553>

Título Revista: *Small Ruminant Research*

Factor de Impacto (2015): 1.125

Ámbito: Agricultural, dairy and animal science

Rango: 19 / 57 (Q2)



Título: *Use of dietary rosemary diterpenes to extend the preservation of sulphited-lamb products*

Autores: Jordi Ortuño, Rafael Serrano and Sancho Bañón.

Resumen:

The use of dietary antioxidants is proposed for enhancing the preservative effects of sulphite in minced lamb products. Lamb diet was supplemented with 400 mg rosemary diterpenes (carnosic acid plus carnosol at 1:1 w:w ratio) per kg feed during the fattening stage. The patties were formulated combining meat from different sources (lambs given feed supplemented with rosemary extract and control lambs) and SO₂ addition levels (0, 150, 300 and 450 mg kg⁻¹). Several physical-chemical (reflectance, pH, WHC, carbonyls and volatiles from lipid oxidation), microbial (viable and lactic acid bacteria and coliforms) and sensory (appearance and odor) traits were determined in patties kept at 2°C and packed under 70/30 O₂/CO₂ atmosphere. Dietary antioxidants extended the shelf life from 7.9 to 12.3 days in patties made with 450 mg kg⁻¹ SO₂, but had little effect at lower SO₂ doses. Greater inhibition of browning, lipid oxidation, odor deterioration and rancidity was achieved by using supplemented lamb. The processing of lamb meat reinforced with endogenous diterpenes from rosemary seems to be a promising strategy for manufacturing sulphited raw products.

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448814003757>

5. Conclusiones

Conclusions

Primera. La suplementación dietética de los corderos Segureños de cebo con un extracto tipificado de romero rico en ácido carnósico y carnosol permite la deposición muscular dosis dependiente de un metabolito diterpénico que mejora la capacidad de conservación de la carne a partir de una dosis mínima efectiva de 200 mg/kg.

First. The dietary supplementation of fattening lambs from Segureña breed with a typified rosemary extract rich in carnosic acid and carnosol, leads to the deposition of a diterpenic metabolite in muscle, which is able to increase the preservative capacity of meat from a minimal effective dose of 200 mg/kg.

Segunda. La determinación de la capacidad antioxidante en el músculo mediante técnicas de medida de la actividad antirradicalaria y del poder reductor del hierro supone una herramienta útil para predecir el deterioro oxidativo posterior de la carne durante el almacenamiento, y, en particular, para evaluar la efectividad de los antioxidantes dietéticos empleados para extender la vida útil de la carne.

Second. Determination of the antioxidant status in muscle by reference to the radical scavenging capacity and ferric reducing power is a useful tool for predicting the oxidative deterioration of meat during storage, and, in particular, for assessing the effectiveness of the dietary antioxidants used to extend the shelf life of meat.

Tercera. Los diterpenos de romero presentan una menor biodisponibilidad en músculo ovino que la vitamina E. No obstante, la deposición muscular de metabolito diterpénico refuerza los mecanismos antioxidantes endógenos y reduce la degradación de vitamina E, incrementando su concentración. Además, dicho metabolito confiere cierta actividad antimicrobiana a la carne, que es incluso evidente en la carne envasada en atmósfera protectora bacteriostática.

Third. Rosemary diterpenes are less bioavailable than vitamin E in lamb muscle. However, the deposition of diterpenic metabolite in muscle improves the endogenous antioxidant mechanisms and reduces vitamin E degradation, increasing the

Conclusiones

concentration of this vitamin. Moreover, this metabolite provides certain antimicrobial activity that is evident even in the meat packed in a bacteriostatic atmosphere.

Cuarta. Los extractos diterpénicos de romero son menos efectivos que la vitamina E como suplemento dietético con propiedades antioxidantes sobre la carne de cordero. A pesar de esto, cualquiera de los dos tratamientos dietéticos permite extender la vida útil de la carne de cordero refrigerada y envasada en una atmósfera protectora rica en oxígeno y dióxido de carbono.

Fourth. Diterpenic rosemary extracts are less effective than vitamin E as a dietary supplement with antioxidant properties. Despite this, both dietary treatment extend the shelf life of refrigerated meat packed in atmosphere rich in oxygen and carbon dioxide.

Quinta. El uso dietético de diterpenos de romero en un nivel de dosificación eficaz para proteger filetes de carne, por el contrario, no permite reducir los requerimientos de SO₂ necesarios para extender la vida útil de la carne picada envasada en atmósfera protectora y refrigeración. En cualquier caso, la capacidad antioxidante y antimicrobiana mejora en la carne de cordero reforzada con diterpenos de romero y con sulfitos añadidos, lo que sugiere que los diterpenos podrían ser eficaces para extender la vida comercial de la carne picada almacenada en condiciones menos prooxidantes.

Fifth. The dietary use of rosemary diterpenes at a dose that has been seen effective for protecting the meat cuts, does not allow a reduction in the SO₂ needed to extend the shelf life of minced meat kept in protective atmosphere under refrigeration. Whatever the case, the antioxidant and antimicrobial capacity was higher in the meat with added sulfites and reinforced with rosemary diterpenes, suggesting that diterpenes might be capable of extending the shelf life of minced meat kept in less prooxidant storage conditions.

Sexta. De acuerdo con lo anterior, la posible aplicación de extractos diterpénicos de romero en alimentación animal se basaría sobre todo en su doble potencial, antioxidante y antimicrobiano, sobre la carne, así como en su sinergia con la acción de los sulfitos. El uso dietético de estos extractos permitiría aprovechar y poner en valor los subproductos de hoja generados por destilación del romero, aunque sería necesario adaptar la ingesta de diterpenos para incrementar en la medida de lo posible la vida útil de la carne y sus derivados, sin tener que recurrir a aditivos conservantes.

Sixth. Taking into account the above conclusions, the possible application of diterpenic rosemary extracts in animal feeding would be mainly based on a double potential: an antioxidant and antimicrobial effect on meat, as well as a synergistic effect with sulfite. The dietary use of these extracts would add value the by-products generated from the distillation of rosemary leaves, although it would be necessary to adapt the intake of diterpenes to extend the shelf life of meat and meat products to the greatest extent possible without resorting to preservative additives.

6. Difusión de resultados

Results dissemination

Artículos en revistas

Ortuño J., Serrano R., Jordán M.J., Bañón S. (2014) Shelf life of meat from lambs given essential oil-free rosemary extract containing carnosic acid plus carnosol at 200 or 400mg kg⁻¹. *Meat Science*, 96 (4): 1452 - 1459

Serrano R., Ortuño J., Bañón S. (2014) Improving the sensory and oxidative stability of cooked and chill-stored lamb using dietary rosemary diterpenes. *Journal of Food Science*, 79 (9): S1805 - S1810

Ortuño J., Serrano R., Bañón S. (2015) Use of dietary rosemary diterpenes to extend the preservation of sulphited-lamb products. *Small Ruminant Research*, 123: 269 – 277

Ortuño J., Serrano R., Bañón S. (2015) Antioxidant and antimicrobial effects of dietary supplementation with rosemary diterpenes (carnosic acid and carnosol) vs vitamin E on lamb meat packed under protective atmosphere. *Meat Science*, 110: 62 – 69

Ortuño J., Serrano R., Jordán M.J., Bañón S. (2016) Relationship between antioxidant status and oxidative stability in lamb meat reinforced with dietary rosemary diterpenes. *Food Chemistry*, 190: 1056 – 1063

Ortuño J., Serrano R., Bañón S. (2016) Use of dietary rosemary diterpenes to inhibit rancid volatiles in lamb meat packed under protective atmosphere. *Animal*, *In Press*.

Ortuño J., Serrano R., Bañón S. (2016) Use of Rosemary diterpenes to inhibit bacterial spoilage in lamb patties packed under different environments. *In Press*.

Comunicaciones orales en congresos

Ortuño J., Serrano R., Bañón S. (2015) Dietary use of rosemary diterpenes to inhibit the formation of volatile markers of lipid oxidation in lamb. *Future trends in phytochemistry in the global era of agri-food and health II*. Phytochemical Society of Europe. San Pedro del Pinatar (Murcia – Spain).

Pósters en congresos

Ortuño J., Serrano R., Bañón S. (2015) Mejora de la capacidad conservante de la carne de cordero mediante la suplementación dietética con diterpenos de romero. III Congreso Internacional sobre Seguridad Alimentaria. Ilustre Colegio de Veterinarios de Murcia. Murcia (España).

7. Resumen

Abstract

La presente Tesis Doctoral por compendio de publicaciones aborda la aplicación práctica de un extracto dietético de romero (EDR) obtenido mediante segunda destilación de la hoja libre de aceite esencial, cuyos principios activos son los diterpenos ácido carnósico y carnosol, presentes en la misma proporción. El uso en alimentación animal de este EDR había sido previamente patentado por el equipo investigador con el objeto de mejorar la calidad y capacidad de conservación endógena de la carne de cordero de una forma saludable, ecológica y económicamente viable.

En el primer trabajo, “*Relationship between antioxidant status and oxidative stability in lamb meat reinforced with dietary rosemary diterpenes*”, publicado en la revista Food Chemistry, se estableció la relación existente entre la concentración del metabolito diterpénico depositado en músculo resultante de la ingesta de EDR, la capacidad antioxidante de la carne fresca y los principales índices físico-químicos (Color CIELab, hexanal, TBARS y carbonilos totales) y sensoriales (apariencia y rancidez) empleados para evaluar el deterioro oxidativo de la carne. La toma por los corderos de cebo de 200 y 400 mg EDR por kg de pienso dio lugar a la deposición dosis-dependiente de niveles funcionales de metabolito diterpénico $C_{19}H_{22}O_3$ en el músculo, lo que mejoró la estabilidad oxidativa de los medallones de lomo (*Longissimus thoracicus et lumborum*) de cordero mantenidos a 4°C en atmósfera protectora (70% O_2 / 30% CO_2) e iluminación constante (800 lx), y analizados en intervalos entre 0, 7, 11 y 14 días. Se estableció una correlación ($P < 0,05$) entre el nivel de deposición muscular de metabolito diterpénico y la capacidad antioxidante de la carne fresca, medida mediante técnicas de capacidad antirradicalaria (DPPH y TEAC) y del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP). A su vez, la capacidad antioxidante se correlacionó mejor ($P < 0,05$) con cambios en los valores de color CIELab, TBARS y puntuaciones sensoriales, que con el incremento de los valores de hexanal y de carbonilos totales procedentes de proteínas miofibrilares. Los ensayos FRAP y DPPH resultaron más precisos que el ensayo TEAC para predecir el deterioro oxidativo de la carne refrigerada y, en particular, para evaluar la efectividad antioxidante sobre la carne del EDR empleado. Por tanto, la determinación de la capacidad antioxidante en la carne fresca permite predecir el deterioro oxidativo de la carne mantenida en

condiciones de venta al por menor, de modo que se podría prescindir o simplificar los estudios de vida comercial requeridos para testar este tipo de suplementos dietéticos.

El siguiente paso fue explorar las posibilidades comerciales del extracto de romero, comparándolo con un suplemento de vitamina E, el antioxidante de referencia en alimentación animal. En el segundo trabajo, "*Antioxidant and antimicrobial effects of dietary supplementation with rosemary diterpenes (carnosic acid and carnosol) vs vitamin E on lamb meat packed under protective atmosphere*", publicado en la revista Meat Science, se compararon dosis equivalentes de EDR y α -tocoferol (600 mg/kg), con el objeto de evaluar sus ventajas y limitaciones. Para tal fin, se determinaron diversos parámetros microbiológicos (bacterias aerobias mesófilas y ácido-lácticas, Enterobacterias, *E.coli* y *Salmonella spp.*), físico-químicos (Color CIELab, TBARS y carbonilos totales) y sensoriales (apariencia y rancidez) en medallones de lomo mantenidos en condiciones de venta al por menor (ver artículo anterior) a los 0, 7, 11, 14 y 18 días. La combinación de envasado bacteriostático y baja temperatura resultó muy efectiva para asegurar la calidad microbiológica de la carne, por lo que el EDR no pudo mostrar todo su potencial antimicrobiano. La dieta R permitió alcanzar una concentración funcional muscular de metabolito diterpénico con capacidad antioxidante y antimicrobiana sobre la carne. Por su parte, la dieta E dio lugar a una alta deposición muscular de α -tocoferol y fue más efectiva ($P < 0,05$) que la dieta R para prevenir la oxidación de la carne y sus consecuencias sensoriales. Ambos tratamientos dietéticos permitieron incrementar la vida útil de la carne de cordero, determinada como la pérdida de frescura, hasta 5 (dieta R) ó 10 (dieta E) días, respectivamente. En comparación con la vitamina E, la menor biodisponibilidad de los diterpenos de romero limitaría su potencial actividad conservante sobre la carne, si bien parecen reforzar los mecanismos antioxidantes endógenos, protegiendo a la vitamina E frente a reacciones de degradación.

Finalmente, se estudió una nueva aplicación para incrementar el valor tecnológico del EDR, basada en potenciar la acción conservante de los sulfitos. En el tercer trabajo, "*Use of dietary rosemary diterpenes to extend the preservation of sulphited-lamb products*", publicado en la revista Small Ruminant Research, se estudió la posibilidad

de emplear la suplementación con EDR con el objeto de reducir los requerimientos de sulfitos necesarios para conservar los preparados cárnicos. La dieta de los corderos fue suplementada con 400 mg EDR/kg y se prepararon diversas masas formuladas con carne de corderos suplementados (R) o no (C) con EDR y distintas dosis de SO_2 (0, 150, 300 y 450 mg/kg), dando lugar a 8 tratamientos diferentes: C0, C150, C300, C450, R0, R150, R300 y R450. Se determinaron diferentes parámetros físico-químicos (color CIELab, pH, CRA, TBARS, carbonilos totales y VOCs), microbiológicos (bacterias aerobias mesófilas y ácido-lácticas y *E. Coli*/coliformes) y sensoriales (apariciencia y olor) en preparados tipo hamburguesa mantenidos en condiciones de venta al por menor (ver artículos anteriores) durante los días 0, 4, 8 y 12. El uso de carne obtenida de corderos suplementados con EDR retrasó la decoloración, la oxidación lipídica, el deterioro del olor y la aparición de rancidez en la carne picada. La suplementación con EDR permitió extender de 7,9 a 12,3 días la vida útil (determinada como la pérdida de frescura) de las hamburguesas elaboradas con 450 mg SO_2 /kg, la máxima dosis legal permitida, aunque ésta fue menos efectiva al emplear dosis más reducidas de SO_2 . Por tanto, el procesado de carne de cordero reforzada con diterpenos del romero parece ser una estrategia prometedora para la fabricación de productos cárnicos crudos con sulfitos añadidos.

En base a los resultados anteriores se puede concluir que la potencial aplicación de extractos diterpénicos de romero en alimentación animal se basaría sobre todo en su doble potencial, antioxidante y antimicrobiano, sobre la carne, así como en su sinergia con la acción de los sulfitos. El uso dietético de EDR permitiría aprovechar y poner en valor los subproductos de hoja generados por destilación del romero, aunque sería necesario adaptar la ingesta de diterpenos para incrementar en la medida de lo posible la vida útil de la carne y sus derivados, sin tener que recurrir a aditivos conservantes.

Abstract

The collection of papers gathered in the present PhD thesis focuses on the practical application of a dietary rosemary extract (DRE) obtained by the second distillation of the leaves from which the essential oil has already been removed, in which the active principles are diterpenes carnosic acid and carnosol, both present in the same proportion. The use of this DRE in animal feeds has previously been patented by the research team with the aim of improving the quality and the endogenous conservation capacity of lamb meat in a healthy, ecological and economically viable way.

In the first paper, "*Relationship between antioxidant status and oxidative stability in lamb meat reinforced with dietary rosemary diterpenes*", published in the journal *Food Chemistry*, we established the relationship between the concentration of the diterpenic metabolite deposited in muscle resulting from the dietary consumption of DRE, the antioxidant capacity of the fresh meat and the main physico-chemical (CIELabcolor, hexanal, TBARS and total carbonyls) and sensorial (appearance and rancidity) parameters used for the assessment of the oxidative spoilage of meat. The intake of 200 and 400 mg DRE/kg feed by the fattening lambs resulted in a dose-dependent deposition of functional levels of the diterpenic metabolite $C_{19}H_{22}O_3$ in muscle, which improved the oxidative stability of the resulting lamb loin fillets (*Longissimusthoracicus et lumborum*) kept at 4 °C in a protective atmosphere (70% O_2 /30% CO_2) and constant illumination (800 lx), and analysed at different storage periods of between 0, 7, 11 and 14 days. A correlation ($P < 0.05$) was established between the muscular deposition concentration of the diterpenic metabolite and the antioxidant capacity of the fresh meat, measured by means of the radical scavenging techniques (DPPH and TEAC) and the ferric reduction antioxidant power (FRAP). The antioxidant capacity was better correlated ($P < 0.05$) with changes in the values of the CIELabcolor, TBARS and sensorial scores than with the increase in hexanal and total carbonyls coming from myofibrillar proteins. FRAP and DPPH assays were seen to be more accurate than TEAC for predicting the chilled meat oxidative spoilage and, particularly, for assessing the antioxidant effectiveness of the tested DRE on meat. Therefore, evaluation of the antioxidant capacity in fresh meat allows the oxidative

spoilage of meat kept in retail conditions to be predicted. Thus, it would be possible to avoid or simplify the shelf-life studies needed for testing this kind of dietary supplement.

The next step was to explore the commercial possibilities of the DRE, comparing it with a vitamin E supplement, the reference antioxidant in animal feeding. In the second paper, "*Antioxidant and antimicrobial effects of dietary supplementation with rosemary diterpenes (carnosic acid and carnosol) vs vitamin E on lamb meat packed under protective atmosphere*", published in the journal *Meat Science*, two equivalent doses of DRE and α -tocopherol (600 mg/kg feed) were compared with the aim of evaluating their relative advantages and limitations. For this purpose, different microbiological (TVC, LAB, *Enterobacteriaceae*, *E.coli* and *Salmonella spp.*), physico-chemical (CIELabcolor, TBARS and total carbonyls) and sensorial (appearance and rancidity) parameters in loin fillets kept in retail conditions (see above paper) were analysed on days 0, 7, 11, 14 and 18. The combination of a bacteriostatic packaging and the low temperature were seen to be very effective for ensuring meat microbial quality. As a consequence, the whole antimicrobial potential of the DRE could not be unequivocally confirmed. Despite that, the R-diet reached a functional concentration of the diterpenic metabolite in the muscle, which resulted in an increased antioxidant and antimicrobial activity on the meat. In contrast, the E-diet yielded a higher muscular deposition of α -tocopherol and was more effective ($P < 0.05$) than the R-diet at preventing meat oxidation and resulting sensorial consequences. Both dietetic treatments allowed an increase in the shelf-life of lamb meat, assessed as the loss of freshness, up to 5 (R-diet) and 10 (E-diet) days, respectively. Compared with vitamin E, the lower bioavailability of the rosemary diterpenes would limit its potential for preserving meat. However, it did seem to reinforce the endogenous antioxidant mechanisms, regenerating and protecting vitamin E against degradation reactions.

Finally, we looked at a new application for increasing the technological value of the DRE, based on promoting the preservative activity of sulphites. In the third paper, "*Use of dietary rosemary diterpenes to extend the preservation of sulphited-lamb products*", published in the journal *Small Ruminant Research*, we studied the possibility of using

DRE supplementation to reduce the sulphites required for preserving meat products. The lamb diet was supplemented with 400 mg DRE/kg feed and patties were formulated with meat from supplemented (R) or not (C) lambs and increasing doses of SO₂ (0, 150, 300 and 450 mg/kg meat), yielding 8 different treatments: C0, C150, C300, C450, R0, R150, R300 and R450. Different physico-chemical (CIELab color, pH, WHC, TBARS, total carbonyls and VOCs), microbiological (TVC, LAB and *E.coli*/coliforms) and sensorial (appearance and odour) parameters were analysed in meat patties kept in retail conditions (see above paper) at days 0, 4, 8 and 12. The use of meat obtained from lambs supplemented with DRE delayed discoloration, lipid oxidation, odour spoilage and the rancidity on meat patties. DRE supplementation extended from 7.9 to 12.3 days the shelf-life, assessed as the loss of freshness, of the patties formulated with 450 mg SO₂/kg meat, the maximum legal dose permitted, although it was less effective when lower SO₂ doses were employed. Therefore, the meat processing of lamb meat reinforced with rosemary diterpenes seems to be a promising strategy for the manufacture of raw meat products with added sulphites.

Taking into account the results obtained, it can be concluded that the potential application of rosemary diterpenic extracts on the animal feeding would be based on its dual potential effect, as antioxidant and antimicrobial, on meat, and on its synergism with sulphite activity. The dietary use of DRE would take advantage and increase the value of the leaf by-products generated from rosemary distillation. However, diterpene intake needs to be optimised to increase even further the shelf-life of meat and meat products, without the use of preserving additives.

8. Bibliografía

Bibliography

- Abdalla, A.E., & Roozen, J.P. (1999). Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chemistry*, *64*, 323-329
- Ahn, D. U., Jo, C., & Olson, D. G. (1999). Headspace oxygen in sample vials affects volatiles production of meat during the automated purge-and-trap/GC analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 2776–2781.
- Ahn, J., Grün, I.U., & Fernando, L.N. (2002). Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolics compounds in cooked ground beef. *Journal of Food Science*, *67*, 1364-1369.
- Ahn, J., Grün, I. U., & Mustapha, A. (2007). Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*, *24*(1), 7–14.
- Al-Sereiti, M.R., Abu-Amer, R.M., & Sen, P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*, *37*, 124–130.
- Álvarez, I., de la Fuente, J., Díaz, M. T., Lauzurica, S., Pérez, C., & Cañeque, V. (2008). Estimation of α -tocopherol concentration necessary to optimise lamb meat quality stability during storage in high-oxygen modified atmosphere using broken-line regression analysis. *Animal*, *2*(9), 1405–1411.
- Álvarez, A., García García, B., Jordán, M. J., Martínez-Conesa, C., & Hernández, M. D. (2012). The effect of diets supplemented with thyme essential oils and rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during storage on ice. *Food Chemistry*, *132*(3), 1395–1405.
- AMSA (1991). Guidelines for meat color evaluation. American Meat Science Association and National Livestock and Meat Board (www.meatscience.org)
- Andrés, S., Tejido, M. L., Bodas, R., Morán, L., Prieto, N., Blanco, C., & Giráldez, F. J. (2013). Quercetin dietary supplementation of fattening lambs at 0.2% rate reduces discolouration and microbial growth in meat during refrigerated storage. *Meat Science*, *93*(2), 207–12.
- Andrés, S., Hueriga, L., Mateo, J., Tejido, M. L., Bodas, R., Morán, L., Prieto, N., Rotolo, L. & Giráldez, F. J. (2014). The effect of quercetin dietary supplementation on meat oxidation processes and texture of fattening lambs. *Meat Science*, *96*, 806–11.

Bibliografía

- Aouadi, D., Luciano, G., Vasta, V., Nasri, S., Brogna, D. M. R., Abidi, S., Ben Salem, H. (2014). The antioxidant status and oxidative stability of muscle from lambs receiving oral administration of *Artemisia herba alba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Meat Science*, *97*, 237–243.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 7970–7981.
- Arnold, R. N., Arp, S. C., Scheller, K. K., Williams, S. N., & Schaefer, D. M. (1993). Tissue equilibration and subcellular distribution of vitamin E relative to myoglobin and lipid oxidation in displayed beef. *Journal of Animal Science*, *71*, 105–118.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Aeschbach, R., & Löliger, J. (1992). Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, *22*(2), 257–268.
- Asghar, A., Gray, J.L., Buckley, D.J., Pearson, A.M., & Boren, A.M. (1988). Perspectives of warmed-over flavor. *Food Technology*, *42*, 102-108.
- Baker, I.A., Alkass, J.E. & Saleh, H.H. (2013). Reduction of oxidative rancidity and microbial activities of the Karadi lamb patties in freezing storage using natural antioxidant extracts of rosemary and ginger. *International Journal of Agricultural and Food Research*, *2*, 31 – 42.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, *99*, 191–203.
- Banks, J. G., Dalton, H. K., Nychas, G. J. & Board, R. G. (1985). Sulfite, an elective agent in the microbiological and chemical changes occurring in uncooked comminuted meat products. *Journal of Applied Biochemistry*, *7* (3), 161-79.
- Bañón, S., Díaz, P., Rodríguez, M., Garrido, M. D. & Price, A. (2007). Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. *Meat Science*, *77*, 626-633.
- Bañón, S., Méndez, L., & Almela, E. (2012). Effects of dietary rosemary extract on lamb spoilage under retail display conditions. *Meat Science*, *90*(3), 579–83.

- Barbut, S. (2002). Meat color and flavour. In: *Poultry products processing: an industry guide*, 429-465. CRC Press LLC, Florida (USA)
- Beaufort, A., Cardinal, M., Le-Bail, A., & Midelet-Bourdin, G. (2009). The effects of superchilled storage at -2 degrees C on the microbiological and organoleptic properties of cold-smoked salmon before retail display. *International Journal of Refrigeration*, 32, 1850-1857
- Becker, T. (2005) Defining meat quality. In: *Meat processing. Improving quality*, 2, 3-5. CRC Press LLC, Florida (USA).
- Beghelli, D., Bailetti, L., Cavallucci, C., Ferraro, S., Olivi, L., & Polidori, P. (2014) Lipid metabolism, antioxidant status and meat sensorial profile in pigs supplemented with plant extracts (*Origanum vulgare* and/or *Rosmarinus officinalis*). *Progress in nutrition*, 16(4), 263 - 268.
- Bejarano, S. Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos. Volumen I y II. (2001). Ediciones Martín y Macias.
- Benov, L., Szejnberg, L., & Fridovich, I. (1998). Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 25(7), 826–831.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Bodas, R., Prieto, N., Jordán, M. J., López-Campos, Ó., J. Giráldez, F., Morán, L., & Andrés, S. (2012). The liver antioxidant status of fattening lambs is improved by naringin dietary supplementation at 0.15% rates but not meat quality. *Animal*, 6(05), 863–870.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*, 30, 609–615.
- Borch, E., Kant-Muermans, M. L. & Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 103-120.

Bibliografía

- Borrás-Linares, I., Pérez-Sánchez, A., Lozano-Sánchez, J., Catalán, E. B., Arráez-Román, D., Cifuentes, A., Micol, V., & Carretero, A. S. (2015). A bioguided identification of the active compounds that contribute to the antiproliferative/cytotoxic effects of rosemary extract on colon cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, *80*, 215–222.
- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., & Trakatellis, A. G. (1994). Rapid , Sensitive , and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue , Food , and Feedstuff Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*, 1931–1937.
- Botsoglou, N.A., Florou-Paneri, P., Christaki, E., Fletouris, D.J., & Spais, A.B. (2002). Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *British poultry science*, *43*(2), 223-230.
- Botsoglou, N., Govaris, A., Giannenas, I., Botsoglou, E., & Papageorgiou, G. (2007). The incorporation of dehydrated rosemary leaves in the rations of turkeys and their impact on the oxidative stability of the produced raw and cooked meat. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *58*, 312–320.
- Botsoglou, N.A., Grigoropoulou, S.H., Botsoglou, E., Govaris, A., & Papageorgiou, G. (2003). The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science*, *65*, 1193-1200.
- Boylston, T. (2012). Land animal product. In Nollet L.M.L. (Ed.) *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*, 140 – 156. Wiley-Blackwell, Oxford (UK).
- Braden, K.W., Blanton, J.R., Montgomery, J.L., Santen, E.V., Allen, V.G., & Miller, M.F. (2007). Tasco supplementation: effects on carcass characteristics, sensory attributes and retail display shelf-life. *Journal of Animal Science*, *85*, 754-768.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, *28*, 25–30.
- Brody, A.L. (2009). Innovations in fresh prepared meal delivery systems. *Food Technology*, *63*, 84-86.

- Buckley, D.J., Morrissey, P.A. & Gray, J.I. (1995). Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *Journal of Animal Science*, *73*, 3122 – 3130.
- Bueno, E., Victoria, D., Cayuela, J.M., Tejada, L., Abellán, A., Salazar, E., & Girón, F. (2015). Actividad antimicrobiana frente a E.coli de distintas concentraciones de ácido carnósico y carnosol obtenidos de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.). *III Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria*, 578. Ilustre Colegio de Veterinarios de Murcia. Murcia (España).
- Burton, G., & Ingold, K. (1981). Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *Journal of the American Chemical Society*, *25*, 6472–6477.
- Burton, G.W., & Traber, M.G. (1990). Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual Review of Nutrition*, *10*, 357-364.
- Buyts, E. M., Krüger, J., & Nortjé, G. L. (1994). Centralised bulk pre-packaging of fresh pork retail cuts in various gas atmospheres. *Meat Science*, *36*(3), 293–308.
- Camo, J., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2008). Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Science*, *80*(4), 1086–91.
- Caputi-Jambrenghi, A., Colonna, M. A., Giannico, F., Favia, R., Minuti, F., Scafizzari, M., & Vonghia, G. (2005). Dietary supplementation of garlic and rosemary: effects on colour stability and lipid oxidation in lamb meat. *Italian Journal of Animal Science*, *4*(2), 366–368.
- Cardinali, R., Cullere, M., Dal Bosco, A., Mugnai, C., Ruggeri, S., Mattioli, S., Castellini, C., Trabalza, M., & Dalle Zotte, A. (2015). Oregano, rosemary and vitamin E dietary supplementation in growing rabbits: Effect on growth performance, carcass traits, bone development and meat chemical composition. *Livestock Science*, *175*, 83–89.
- Cook, J.D., & Monser, E.R. (1999) Food iron absorption in human subjects III. comparison of the effect of animal proteins on non-haem iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, *29*, 859 - 867.
- Cullen, S.P., Monahan, F. J., Callan, J.J., & O’Doherty, J.V. (2005). The effect of dietary garlic and rosemary on grower-finisher pig performance and sensory characteristics of pork. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, *44*, 57-67

Bibliografía

- Cuvelier, M.E., Bondety, V., & Berset, C (2000). Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: Structure-activity relationship. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 77, 819-823.
- Dainty, R. H., & Mackey, B. M. (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 103s–114s.
- Dal Bosco, A., Gerencsér, Z., Szendrő, Z., Mugnai, C., Cullere, M., Kovács, M., & Dalle Zotte, A. (2014). Effect of dietary supplementation of Spirulina (*Arthrospira platensis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*) on rabbit meat appearance, oxidative stability and fatty acid profile during retail display. *Meat science*, 96(1), 114-119.
- Daneshvar, B., Frandsen, H., Autrup, H., & Dragsted, L. O. (1997). γ -Glutamyl semialdehyde and 2-amino-adipic semialdehyde: Biomarkers of oxidative damage to proteins. *Biomarkers*, 2, 117–123
- Dave, D., & Ghaly, A. E. (2011). Meat Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: A Critical Review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6(4), 486–510.
- Decker, E. A., Livisay, S. A., & Zhou, S. (2000). Mechanisms of endogenous skeletal muscle antioxidants: Chemical and physical aspects. In E. Decker, C. Faustman, & C.J. Lopez-Bote (Eds.), *Antioxidants in muscle foods*, 39–47. John Wiley & Sons Inc New York (USA).
- Deckert, V., Desrumaux, C., Athias, A., Duverneuil, L., Palleau, V., Gambert, P., Masson, D., & Lagrost, L. (2002). Prevention of LDL, α -tocopherol consumption, cholesterol oxidation and vascular endothelium dysfunction by polyphenolic compounds from red wine. *Atherosclerosis*, 165,41–50.
- Del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Del Río, J. A., Ortuño, A., Quirin, K.W. & Gerard, D. (2003). Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves , Flowers , Stems , and Roots of *Rosmarinus officinalis* . Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4247–4253.
- Delaquis, P.J., Ward, S.M., Holley, R.A., Cliff, M.C., & Mazza, G. (1999). Microbiological, chemical and sensory properties of pre-cooked roast beef preserved with horseradish essential oil. *Journal of Food Science*, 64, 519- 524.

- Descalzo, A., Rossetti, L., & Grigioni, G. (2007). Antioxidant status and odour profile in fresh beef from pasture or grain-fed cattle. *Meat Science*, *75*, 299–307.
- Descalzo, A., & Sancho, A. (2008). A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Science*, *79*(3), 423–36.
- Dineen, N., Kerry, J.P., Buckley, D.J., Morrissey, P.A., Arendt, E.K. & Lynch, P.B. (2001). Effect of dietary α -tocopheryl acetate supplementation on the shelf-life stability of reduced nitrite cooked ham products. *International Journal of Food Science and Technology*, *36*, 631 – 639.
- Djenane, D., Montañés, L., & Roncalés, P. (2005). Nuevas perspectivas para la conservación natural de la carne. *Eurocarne*, *133*, 153–180.
- Enser, M., Hallett, K., Hewitt, B., Fursey, G. A. J., & Wood, J. D. (1996). Fatty acid content and composition of english beef, lamb and pork at retail. *Meat Science*, *42*(4), 443–456.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: a review. *Meat Science*, *89*(3), 259–79.
- European Parliament and Council Directive Nº 95/2/EC of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners (OJ No L 61, 18. 3. 1995).
- Falowo, A. B., Fayemi, P. O., & Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*, *64*, 171-181.
- FAO-OMS (2009) Evaluation of certain food additives. Sixty-ninth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. *WHO Series of Technical Information*, *733*(3), 55 – 66. Geneva (Switzerland).
- Farhat, M. Ben, Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J. a., & Jordán, M. J. (2013). Phytochemical composition and in vitro antioxidant activity of by-products of *Salvia verbenaca* L. growing wild in different habitats. *Industrial Crops and Products*, *49*, 373–379.
- Faustman, C., Cassens, R. G., Schaefer, D. M., Buege, D. R., & Scheller, K. K. (1989). Vitamin E supplementation of Holstein steer diets improves sirloin steak colour. *Journal of Food Science*, *54*, 485–486.

Bibliografía

- Fernandez-López, J., Sevilla, L., Sayas-Barberá, M.E., Navarro, C., Marín, F., & Pérez-Álvarez, J. A. (2003). Evaluation of the antioxidant potential of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in cooked pork meat. *Journal of Food Science*, *68*, 660-664.
- Fernández-López, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Pérez-Álvarez, J. A., & Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, *69*(3), 371-380.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., & Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 1035–1040.
- Font i Furnols, M., Realini, C. E., Guerrero, L., Oliver, M. A., Sañudo, C., Campo, M. M., Nute G.R., Cañeque, V., Álvarez I., San Julián, R., Luzardo, S., Brito, G., & Montossi, F. (2009). Acceptability of lamb fed on pasture, concentrate or combinations of both systems by European consumers. *Meat Science*, *81*(1), 196–202.
- Frankel, E. N. (1984). Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *61*(12), 1908–1917.
- Frankel, E. N. (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science & Technology*, *4*, 220-225.
- Frankel, E.N. (1998) *Lipid oxidation*. The Oily Press Ltd. Dundee (Scotland, UK).
- Frankel, E. N., Huang, S.-W., Aeschbach, R., & Prior, E. (1996). Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(1), 131–135.
- Fung, D.Y., Taylor, S., & Kahan, J. (1977). Effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Safety*, *1*(1), 39-51.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Alipoor Astaneh, S., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, *102*(3), 898–904
- Galipalli, S., Gadiyaram, K.M., Kouakou, B., Terrill, T.H., & Kannan, G. (2004). Physiological responses to preslaughter transportation stress in Tasco-supplemented Boer goats. *South African Journal of Animal Science*, *34*(5).

- Gatellier, P., Mercier, Y., & Renerre, M. (2004). Effect of diet finishing mode (pasture or mixed diet) on antioxidant status of Charolais bovine meat. *Meat Science*, 67(3), 385–94.
- Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., & Georgakis, S. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*, 76(1), 172–81.
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Kokkas, S., Petrotos, K., Kantas, D., Goulas, P., & Kouretas, D. (2015). Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology*, 82, 42–49.
- Gill, C. O., & Tan, K. H. (1980). Effect of Carbon Dioxide on Growth of Meat Spoilage Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(2), 317.
- Gill, C. O. (1996). Extending the storage life of raw chilled meats. *Meat Science*, 43(96), 99–109.
- Gladine, C., Morand, C., Rock, E., Bauchart, D., & Durand, D. (2007). Plant extracts rich in polyphenols (PERP) are efficient antioxidants to prevent lipoperoxidation in plasma lipids from animals fed n-3 PUFA supplemented diets. *Animal Feed Science and Technology*, 136, 281–296
- González-Calvo, L., Ripoll, G., Molino, F., Calvo, J. H., & Joy, M. (2015). The relationship between muscle α -tocopherol concentration and meat oxidation in light lambs fed vitamin E supplements prior to slaughter. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 103 - 110
- Govaris, A., Botsoglou, N., Papageorgiou, G., Botsoglou, E., & Ambrosiadis, I. (2004). Dietary versus post-mortem use of oregano oil and/or alpha-tocopherol in turkeys to inhibit development of lipid oxidation in meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(2), 115–23.
- Govaris, A., Florou-Paneri, P., Botsoglou, E., Giannenas, I., Amvrosiadis, I., & Botsoglou, N. (2007). The inhibitory potential of feed supplementation with rosemary and/or α -tocopheryl acetate on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*, 40(2), 331–337.

Bibliografia

- Grau, R., Hamm, R. (1953). Eine einfache methode zur bestimmung der wasserbindung im muskel. *Naturwissenschaften*, 40, 29-30.
- Gray, J.I., Goma, E. A., & Buckley, D. J. (1996). Oxidative Quality and Shelf Life of Meats, *Meat Science*, 43(96), 111-123.
- Gravador, R. S., Serra, A., Luciano, G., Pennisi, P., Vasta, V., Mele, M., Pauselli, M., & Priolo, a. (2014). Volatiles in raw and cooked meat from lambs fed olive cake and linseed. *Animal*, 9(04), 715–722.
- Greene, B.E. (1969). Lipid oxidation and pigment changes in raw beef. *Journal of Food Science*, 47, 52-55.
- Grosch, W. & Ullrich, F. (1987). Identification of important volatile flavor compounds formed during autoxidation of linoleic and linolenic acids. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 64, 624 – 624.
- Gruen, I.U., Fernando, L.N., & Ahn, J. (2005). Reduction of warmed-over flavor by natural antioxidants systems. Paper 59-5 presented at *Ann. Mtg., Inst. of Food Technologist*, New Orleans, LA., July 15-20.
- Grunert, K. G. (2006). Future trends and consumer lifestyles with regard to meat consumption. *Meat Science*, 74(1), 149–160.
- Guardiola, F., Cabony, R., Addis, P.B., Rafecas, M., & Boatella, J. (1996). Biological effects of oxysterols: Current status. *Food Chemistry and Toxicology*, 34, 193.
- Günther, A., König, T., Habicher, W. D. & Schwetlick, K. (1997). Antioxidant action of organic sulphites-I. Esters of sulphurous acid as secondary antioxidants. *Polymer Degradation and Stability*, 55, 209-216.
- Gyesley, S.W. (1991). Total systems approach to predict shelf life of packaged foods (p. 46–50). ASTM STP 1113-EB. Conshohocken, PA: American Society for Testing Methods Int.
- Haak, L., Raes, K., Van Dyck, S., & De Smet, S. (2008). Effect of dietary rosemary and α -tocopheryl acetate on the oxidative stability of raw and cooked pork following oxidized linseed oil administration. *Meat Science*, 78(3), 239–47.
- Hansen, E., Juncher, D., Henckel, P., Karlsson, A., Bertelsen, G., & Skibsted, L.H. (2004). Oxidative stability of chilled pork chops following long term freeze storage. *Meat Science*, 68, 479-484.

- Hayes, J.E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M.N., O'Brien, N.M., & Kerry, J.P. (2009). The effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on lipid oxidation and oxymyoglobin oxidation in bovine and porcine muscle model systems. *Meat science*, 83(2), 201-208.
- Higgins, F. M., Kerry, J. P., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (1998). Dietary supplementation versus direct post mortem addition of alpha-tocopherol on lipid and colour stability in cooked turkey breast patties. *Food Research International*, 31(3), 205–209.
- Higgins, F. M., Kerry, J. P., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (1999). Effects of alpha-tocopheryl acetate supplementation and salt addition on the oxidative stability (TBARS) and warmed-over flavour (WOF) of cooked turkey meat. *British Poultry Science*, 40(1), 59–64.
- Higgs, J. (2005) The nutritional quality of meat. In: *Meat processing. Improving quality*, 4, 64 - 104.
- Honikel, K.O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat science*, 49(4), 447-457.
- Hopia, A. I., Huang, S.-W., Schwarz, K., German, J. B., & Frankel, E. N. (1996). Effect of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without α -tocopherol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2030–2036.
- Insausti, K., Beriain, M. J., Purroy, A., Alberty, P., Gorraiz, C., & Alzueta, M. . (2001). Shelf life of beef from local Spanish cattle breeds stored under modified atmosphere. *Meat Science*, 57(3), 273–281.
- ISO 2917 (1999) Meat and meat products – Measurement of pH – Reference method. www.iso.org
- ISO 4121 (2003). Sensory analysis methodology. Evaluation of food products by methods using scales. International Organization for Standardization Publications (www.iso.org).
- ISO 4831 (2006) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of coliforms – Most probable number technique www.iso.org

Bibliografía

- ISO 4833 (2003) Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30 degrees. www.iso.org
- ISO 8586 (2012) Sensory analysis – General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors. www.iso.org
- ISO 15214 (1998) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30 degrees. www.iso.org
- Janz, J.A.M., Morel, P.C.H., Wilkinson, B.H.P., & Purchas, R.H. (2007). Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. *Meat Science*, 75, 360-365.
- Jenkins, W.A., & Harrington, J.P. (1991). Packaging foods with plastics. CRC Press LLC, Florida (USA).
- Jerónimo, E., Alfaia, C. M. M., Alves, S. P., Dentinho, M. T. P., Prates, J.M., Vasta, V., Santos-Silva, J. & Bessa, R. J. B. (2012). Effect of dietary grape seed extract and *Cistus ladanifer* L. in combination with vegetable oil supplementation on lamb meat quality. *Meat Science*, 92(4), 841–7.
- Johnston, J.E., Sepe, H.A., Miano, C.L., Brannan, R.G., & Aderton, A.L. (2005). Honey inhibits lipid oxidation in ready-to-eat ground beef patties. *Meat Science*, 70, 627-631.
- Jordán, M. J., Castillo, J., Bañón, S., Martínez-Conesa, C., & Sotomayor, J. A. (2014). Relevance of the carnosic acid/carnosol ratio for the level of rosemary diterpene transfer and for improving lamb meat antioxidant status. *Food Chemistry*, 151, 212–218.
- Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S., & Sotomayor, J.A. (2013). Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L., *Food Control*, 30(2), 463-468.
- Jordán, M.J., Moñino, M.I., Martínez, C., Lafuente, A., & Sotomayor, J. A. (2010). Introduction of distillate Rosemary leaves into the diet of the Murciano-Granadina goat: Transfer of polyphenolic compounds to goats' milk and the plasma of suckling goat kids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8265-8270.

- Karabagias, I., Badeka, A., & Kontominas, M. G. (2011). Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Science*, *88*, 109–116.
- Karami, M., Alimon, A.R., Sazili, A.Q., Goh, Y.M., & Ivan, M. (2011). Effects of dietary antioxidants on the quality, fatty acid profile, and lipid oxidation of *Longissimus* muscle in Kacang goat with aging time. *Meat Science*, *88*, 102-108.
- Karre, L., Lopez, K., & Getty, K. J. K. (2013). Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*, *94*(2), 220–227.
- Kasapidou, E., Wood, J. D., Richardson, R. I., Sinclair, L. a., Wilkinson, R. G., & Enser, M. (2012). Effect of vitamin E supplementation and diet on fatty acid composition and on meat colour and lipid oxidation of lamb leg steaks displayed in modified atmosphere packs. *Meat Science*, *90*(4), 908–916.
- Kennedy, C., Buckley, D.J., & Kerry, J.P. (2004). Display life of sheep meats retail packaged under atmospheres of various volumes and composition. *Meat Science*, *68*, 649-658.
- Kerry, J. P., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., O’Sullivan, K., & Lynch, P. B. (1998). Endogenous and exogenous alpha-tocopherol supplementation: Effects on lipid stability (TBARS) and warmed-over flavour (WOF) in porcine *M. longissimus dorsi* roasts held in aerobic and vacuum packs. *Food Research International*, *31*(3), 211–216.
- 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
- Kerry, J. P., Sullivan, M. G. O., Buckley, D. J., Lynch, P. B., & Morrissey, P. A. (2000). The effects of dietary alpha-tocopheryl acetate supplementation and modified atmosphere packaging (MAP) on the quality of lamb patties. *Meat Science*, *56*, 61–66.
- Kerth, C.R. (2013) The science of meat quality. First Edition. John Wiley & Sons, Inc. Iowa (USA).
- Kim, H., Cadwallader, K. R., Kido, H., & Watanabe, Y. (2013). Effect of addition of commercial rosemary extracts on potent odorants in cooked beef. *Meat Science*, *94*(2), 170–6.

Bibliografía

- Lauzurica, S., de la Fuente, J., Díaz, M. T., Álvarez, I., Pérez, C., & Cañeque, V. (2005). Effect of dietary supplementation of vitamin E on characteristics of lamb meat packed under modified atmosphere. *Meat Science*, *70*(4), 639–46.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, *55*(1), 181-186.
- Leistner, L., & Gorris, L.G. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*, *6*(2), 41-46.
- Lillard, D.A. (1987). Oxidative deterioration in meat, poultry and fish. In: *Warmed-over flavor of meat* (pp. 41-67). Academic Press. Orlando, Florida (USA).
- Lin, C.Y., Wu, C.R., Chang, S.W., Wang, Y.J., Wu, J.J., & Tsai, C.W. (2015) Induction of the pi class of glutathione S-transferase by carnosic acid in rat clone 9 cells via the p38/Nrf2 pathway. *Food and function*, *6*(6), 1936-1946.
- Liotta, L., Chiofalo, V., D'Alessandro, E., LoPresti V., & Chiofalo, B. (2015) Supplementation of Rosemary extract in the diet of Nero Siciliano pigs: evaluation of the antioxidant properties on meat quality. *Animal*, *9*(6), 1065 - 1072.
- López-Bote, C. J., Daza, A., Soares, M., & Berges, E. (2001). Dose-response effect of dietary vitamin E concentration on meat quality characteristics in light-weight lambs. *Animal Science*, *73*, 451–457.
- López-Bote, C. J., Gray, J. I., Goma, E. A., & Flegal, C. J. (1998). Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. *British Poultry Science*, *39*, 235–240.
- Luciano, G., Biondi, L., Scerra, M., Serra, A., Mele, M., Lanza, M., & Priolo, A. (2013). The effect of the change from a herbage- to a concentrate-based diet on the oxidative stability of raw and cooked lamb meat. *Meat Science*, *95*(2), 212–218.
- Luciano, G., Monahan, F. J., Vasta, V., Biondi, L., Lanza, M., & Priolo, A. (2009). Dietary tannins improve lamb meat colour stability. *Meat Science*, *81*(1), 120–5.
- Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P. & Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition and Food Research*, *55*, 83 – 95.
- Mancini, R. A., & Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, *71*, 100–121.

- Martinaud, A., Mercier, Y., Marinova, P., Tassy, C., Gatellier, P., & Renerre, M. (1997). Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(7), 2481-2487.
- Martínez, L., Cilla, I., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2007a). Effect of illumination on the display life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. Influence of the addition of rosemary, ascorbic acid and black pepper. *Meat science*, *75*(3), 443-450.
- Martínez, C., Jordán, M.J., Moñino, M.I., Lafuente, A., Quilez, M., & Sotomayor, J.A. (2007b). Identification of polyphenolic components in Murciano-Granadina goat milk and suckling goat kid plasma. *Planta Medica*, *73*(09), 323.
- Mathlouthi, N., Bouzaienne, T., Oueslati, I., Recoquillay, F., Hamdi, M., Urdaci, M., & Bergaoui, R. (2012). Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: In vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *Journal of Animal Science*, *90*, 813–823.
- McCarthy T.L., Kerry J.P., Kerry J.F., Lynch P.B., & Buckley D.J. (2001). Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science*, *58*, 45-52.
- McMillin, K.W., Huang, N.Y., Ho, C.P., & Smith, B.S. (1999). Quality and shelf-life of meat in case-ready modified atmosphere packaging. In: *Quality Attributes of Muscle Foods*, 73-93. Springer (USA).
- McMillin, K. W. (2008). Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*, *80*(1), 43–65.
- Mele, M., Serra, a, Pauselli, M., Luciano, G., Lanza, M., Pennisi, P., Conte, G., Taticchi, A., Esposto, S., & Morbidini, L. (2014). The use of stoned olive cake and rolled linseed in the diet of intensively reared lambs: effect on the intramuscular fatty-acid composition. *Animal*, *8*(1), 152–62.
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T.C., (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, *52*, 673–751.

Bibliografía

- Mielnik, M.B., Aaby, K., & Skrede, G. (2003). Commercial antioxidants control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat. *Meat science*, 65, 1147-1155.
- Miller H. E. (1971). A Simplified Method for the Evaluation of Antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45, 91-98.
- Miller, R.K. (1994) Quality characteristics. In: *Muscle foods*, 296 - 332. Chapman and Hall, New York (USA).
- Mills, J., Donnison, A., & Brightwell, G. (2014) Factors affecting microbial spoilage and shelf-life of chilled vacuum-packed lamb transported to distant markets: a review. *Meat Science*, 98(1), 71-80.
- Mitsumoto, M. (2000). Dietary delivery versus exogenous addition of antioxidants. Antioxidants in muscle foods. *Nutritional strategies to improve quality*. John Wiley & Sons, Inc. (Ch. 12). New York (U.S.A.)
- Mitsumoto, M., O'Grady, M.N., Kerry, J.P. & Buckley, D.J. (2005). Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. *Meat Science*, 69, 773-779.
- Montossi, F., Font-i-Furnols, M., del Campo, M., San Julián, R., Brito, G., & Sañudo, C. (2013). Sustainable sheep production and consumer preference trends: compatibilities, contradictions, and unresolved dilemmas. *Meat Science*, 95(4), 772–89.
- Moñino, I., Martínez, C., Sotomayor, J. A., Lafuente, A. & Jordán, M.J. (2008). Polyphenolic transmission to Segureño lamb meat from ewes' diet supplemented with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3363-3367.
- Moñino, M.I. (2010). Incorporación de hoja destilada de romero y tomillo en la dieta de oveja Segureña: estudio de la transmisión de antioxidantes a carne de cordero. Tesis doctoral. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agro-alimentario.
- Morán, L., Andrés, S., Bodas, R., Prieto, N. & Giráldez, F.J. (2012a). Meat texture and antioxidant status are improved when carnosic acid is included in the diet of fattening lambs. *Meat Science*, 91, 430-434.

- Morán, L., Rodríguez-Calleja, J. M., Bodas, R., Prieto, N., Giráldez, F. J., & Andrés, S. (2012b). Carnosic acid dietary supplementation at 0.12% rates slows down meat discoloration in gluteus medius of fattening lambs. *Meat Science*, *90*(3), 789–95.
- Morán, L., Giráldez, F. J., Panseri, S., Aldai, N., Jordán, M. J., Chiesa, L. M., & Andrés, S. (2013). Effect of dietary carnosic acid on the fatty acid profile and flavour stability of meat from fattening lambs. *Food Chemistry*, *138*(4), 2407–14.
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S., & Vojnov, A.A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, *40*(2), 223–31.
- Morrissey, P. a., Sheehy, P. J. a., Galvin, K., Kerry, J. P., & Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, *49*(98), S73–S86.
- Mullan, M., & McDowell, D. (2003). Modified atmosphere packaging. *Food packaging technology*, 303.
- Naveena, B.M., Vaithyanathan, S., Muthukumar, M., Sen, A.R., Kumar, Y.P., Kiran, M., Shaju, V.A. & Chandran, K.R. (2013). Relationship between the solubility, dosage and antioxidant capacity of carnosic acid in raw and cooked ground buffalo meat patties and chicken patties. *Meat Science*, *95*, 195 – 202.
- Nieto, G., Bañón, S., & Garrido, M. D. (2012). Administration of distillate thyme leaves into the diet of Segureña ewes: effect on lamb meat quality. *Animal*, *6*(12), 2048–2056.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., & Garrido, M. D. (2010a). Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): influence on lamb meat quality. *Meat Science*, *84*(1), 23–9.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., & Garrido, M. D. (2010b). Effect on lamb meat quality of including thyme (*Thymus zygis* spp. *gracilis*) leaves in ewes' diet. *Meat Science*, *85*(1), 82–8.
- Nieto, G., Estrada, M., Jordán, M. J., Garrido, M. D., & Bañón, S. (2011). Effects in ewe diet of rosemary by-product on lipid oxidation and the eating quality of cooked lamb under retail display conditions. *Food Chemistry*, *124*(4), 1423–1429.
- Nissen, L.R., Byrne, D.V., Bertelsen, G., & Skibsted, L.H. (2004). The antioxidative activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. *Meat Science*, *68*, 485-495.

Bibliografía

- Nowak, A., Kalemba, D., Krala, L., Piotrowska, M., & Czyzowska, A. (2012). The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. *Food Microbiology*, *32*, 212–216.
- Nychas, G.J.E., Skandamis, P., 2005. Improving the safety of fresh meat. In: *Fresh Meat Spoilage and Modified Atmosphere Packaging (MAP)*. CRC/Woodhead Publishing Limited, Cambridge (UK).
- O'Grady, M.N., Maher, M., Troy, D., Moloney, A.P. & Kerry, P. (2006). An assessment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Science*, *73*, 132-143.
- Ojeda-Sana, A. M., van Baren, C. M., Elechosa, M. A., Juárez, M. A., & Moreno, S. (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*, *31*(1), 189–195.
- Olafsdottir, G., Lauzon, H.L., Martinsdóttir, E., Oehlenschläuger, J., & Kristbergsson, K. (2006). Evaluation of shelf life of superchilled cod (*Gadus morhua*) fillets and the influence of temperature fluctuations during storage on microbial and chemical quality indicators. *Journal of Food Science*, *71*(2), 97-109.
- Olivares, A., Dryahina, K., Spanel, P., & Flores, M. (2012). Rapid detection of lipid oxidation in beef muscle packed under modified atmosphere by measuring volatile organic compounds using SIFT. *Food Chemistry*, *135*(3), 1801–1808.
- Oliver, C., Ahn, B., Moerman, E., Goldstein, S., & Stadtman, E. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(12), 5488–5491.
- Onega, E., Miguel, E., Blázquez, B., & Ruiz de Huidobro, F. (2001). Evolución de algunos parámetros de calidad de la carne de vacuno en los seis primeros días post mortem. *ITEA*, *22*, 568-570.
- Ortuño, J., Serrano, R., Jordán, M. J., & Bañón, S. (2014). Shelf life of meat from lambs given essential oil-free rosemary extract containing carnosic acid plus carnosol at 200 or 400 mg kg⁻¹. *Meat Science*, *96*(4), 1452–1459.
- Osswald, T.A., Baur, E., Brinkmann, S., Oberbach, K., & Schmachtenberg, E. (2006). International plastics handbook. Hanser Publishers, Munich, 507- 699, 708.

- Oi, N., Hashimoto, T., & Kanazawa, K. (2008). Metabolic conconversion of dietary quercetin from its conjugate to active aglicone following the induction of hepatocarcinogenesis in Fisher 344 rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *56*, 577-583.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E. K., Prior, R. L., & Huang, D. (2002). Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 2772–2777.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.P., & Begin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, *37*, 155-162.
- Özcan, M. M., & Arslan, D. (2011). Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. *Food Chemistry*, *129*(1), 171–174.
- Paniang-Vait P., King A.J., Jones A.D., & German B.G. (1995). Cholesterol oxides in foods of animal origin. *Journal of Food Science*, *60*(5), 1159- 1174.
- Papageorgiou, V., Mallouchos, A., & Komaitis, M. (2008). Investigation of the antioxidant behavior of air-and freeze-dried aromatic plant materials in relation to their phenolic content and vegetative cycle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(14), 5743-5752.
- Pearce, K.L., Masters, D.G., Smith, G.M., Jacob, R.H., & Pethick, D.W. (2005). Plasma and tissue α -tocopherol concentrations and meat colour stability in sheep grazing saltbush (*Atriplex spp.*). *Australian Journal of Agriculture Research*, *56*, 663-672.
- Pearson, A.M. and Tauber, F.W. (1984) Curing. In *Processed meats*, 47, 2nd edition. AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut (USA).
- Pearson, A.M. and Young, R.B. (1989) Muscle and meat biochemistry. 1st Edition, Academic Press, San Diego, (USA).
- Peinado, B., Latorre, R., Vázquez-Autón, J. M., Poto, A., Ramírez, G., López-Albors, O., Moreno, F. & Gil, F. (2004). Histochemical skeletal muscle fibre types in the sheep. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, *33*, 236–243.

Bibliografía

- Pérez-Fons, L., Garzón, M. T., & Micol, V. (2010). Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 161–71.
- Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2005). Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5036–5040.
- Peroni, D. G., & Poner, A. L. (1995). Sulphite sensitivity. *Clinical and Experimental Allergy*, 25(8), 680–681.
- Petiwala, S. M., Puthenveetil, A. G., & Johnson, J. J. (2013). Polyphenols from the Mediterranean herb rosemary (*Rosmarinus officinalis*) for prostate cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 1–4.
- Qwele, K., Hugo, A., Oyedemi, S. O., Moyo, B., Masika, P. J., & Muchenje, V. (2013). Chemical composition, fatty acid content and antioxidant potential of meat from goats supplemented with Moringa (*Moringa oleifera*) leaves, sunflower cake and grass hay. *Meat Science*, 93, 455–462.
- Ray, B. 2004. Fundamental food microbiology, 3rd Edition, 439-534. CRC Press,. Florida (USA).
- Re, R., Pellegrini, N., & Proteggente, A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.
- Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios.
- Reglamento (CE) nº 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en alimentación animal.
- Renerre, M., Poncet, K., Mercier, Y., Gatellier, P. & Métro, B. (1999). Influence of dietary fat and vitamin E on antioxidant status of muscle of turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1), 237-244.

- Rezzoug, S. A., Boutekedjiret, C., & Allaf, K. (2005). Optimization of operating conditions of rosemary essential oil extraction by a fast controlled pressure drop process using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, *71*(1), 9-17.
- Richheimer, S.L., Bernart, M.W., King, G.A., Kent, M.C., & Bailey, D.T. (1996). Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *73*, 507-514.
- Ripoll, G., Joy, M., & Muñoz, F. (2011). Use of dietary vitamin E and selenium (Se) to increase the shelf life of modified atmosphere packaged light lamb meat. *Meat Science*, *87*(1), 88–93.
- Ripoll, G., González-Calvo, L., Molino, F., Calvo, J.H., & Joy, M. (2013) Effects of finishing period length with vitamin E supplementation and alfalfa grazing on carcass color and the evolution of meat color and the lipid oxidation of light lambs. *Meat Science*, *93*, 906-913.
- Rivas-Cañedo, A., Apeleo, E., Muiño, I., Pérez, C., Lauzurica, S., Pérez-Santaescolástica, C., Díaz, M.T., Cañeque, V. & de la Fuente, J. (2013). Effect of dietary supplementation with either red wine extract or vitamin E on the volatile profile of lamb meat fed with omega-3 sources. *Meat Science*, *93*(2), 178–86.
- Rodríguez-Carpena J.G., Morcuende D. & Estévez M. (2011). Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. *Meat Science*, *89*, 166 – 173.
- Rojas, M.C. & Brewer, M.S. (2008). Effect of natural antioxidants on oxidative stability of frozen, vacuum-packaged beef and pork. *Journal of Food Quality*, *31*, 173 – 188.
- Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M., Owen, M. & Fletcher, H. (2002). Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat Science*, *62*, 165-177.
- Ross, C. F., & Smith, D. M. (2006). Use of Volatiles as Indicators of Lipid Oxidation in Muscle Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *5*(1), 18–25.

Bibliografía

- Sánchez-Escalante, A., Torrescano, G.R., Camou, J.P., González, N.F., & Hernández, G. (2008). Sistemas combinados de conservación para prolongar la vida útil de la carne y los productos cárnicos. *Nacameh*, 2, 124-159
- Santé-Lhoutellier, V., Engel, E., Aubry, L., & Gatellier, P. (2008). Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and in vitro digestibility. *Meat Science*, 79(4), 777–83.
- Sañudo, C., & Alfonso, M. (1999). Factores que afectan a la calidad del producto en el ganado ovino de aptitud cárnica. *XXIV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprino- tecnia*, pp. 33-48, Soria, España.
- Satoh, T., McKercher, S. R., & Lipton, S. A. (2013). Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 645–57.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., & Rémésy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56(6), 276–282.
- Schubring, R. (2009). "Superchilling"- an old variant to prolong shelf life of fresh fish and meat requicked. *Fleischwirtschaft*, 89(9), 104-113.
- Schreurs, N. M., Lane, G. A., Tavendale, M. H., Barry, T. N., & McNabb, W. C. (2008). Pastoral flavour in meat products from ruminants fed fresh forages and its amelioration by forage condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 146(3–4), 193–221.
- Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L.R., Gardner, P.T., Heinonen, M.I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., Mcphail, D., Skibsted, L.H., & Tijburg, L. (2001). Investigation of plant extracts for the protection of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research Technology*, 212, 319-328.
- Serpen, A., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2012). Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*, 90(1), 60–65.
- Serrano, R. & Bañón, S. (2012). Reducing SO₂ in fresh pork burgers by adding chitosan. *Meat Science*, 92, 651 – 658.
- Serrano, R., Jordán, M. J., & Bañón, S. (2014a). Use of dietary rosemary extract in ewe and lamb to extend the shelf life of raw and cooked meat. *Small Ruminant Research*, 116, 144–152.

- Serrano, R., Ortuño, J., & Bañón, S. (2014b). Improving the sensory and oxidative stability of cooked and chill-stored lamb using dietary rosemary diterpenes. *Journal of Food Science*, *79*(9), 1805-1810.
- Shahidi, F. & Pegg, R.B. (1993). Hexanal as indicator of meat flavor deterioration. *Journal of Food Lipids*, *1*, 177 – 186.
- Shayne, C. G. (2005). Sulfites. *Encyclopedia of Toxicology*. 113-115.
- Simitzis, P. E., Deligeorgis, S. G., Bizelis, J. a, Dardamani, A., Theodosiou, I., & Fegeros, K. (2008). Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. *Meat Science*, *79*(2), 217–23.
- Simitzis, P.E., Symeon, G.K., Charismiadou, M.A., Bizelis, J.A., & Deligeorgis, S. G. (2010). The effects of dietary oregano oil supplementation on pig meat characteristics. *Meat science*, *84*(4), 670-676.
- Simitzis, P. E., Ilias-Dimopoulos, V., Charismiadou, M. A., Biniari, E. E., & Deligeorgis, S. G. (2013). Effects of dietary hesperidin supplementation on lamb performance and meat characteristics. *Animal Science Journal*, *84*(2), 136–43.
- Sinclair, L. A., Cooper, S. I, Chikunya, S., Wilkinson, R. G., Hallett, K. G., Enser, M., & Wood, J. D. (2005). Biohydrogenation of n-3 polyunsaturated fatty acids in the rumen and their effects on microbial metabolism and plasma fatty acid concentrations in sheep. *Animal Science*, *81*(02), 239–248.
- Smeti, S., Atti, N., Mahouachi, M., & Munoz, F. (2013). Use of dietary rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils to increase the shelf life of Barbarine light lamb meat. *Small Ruminant Research*, *113*, 340–345.
- Soldatou, N., Nerantzaki, a., Kontominas, M. G., & Savvaidis, I. N. (2009). Physicochemical and microbiological changes of “Souvlaki” – A Greek delicacy lamb meat product: Evaluation of shelf-life using microbial, colour and lipid oxidation parameters. *Food Chemistry*, *113*(1), 36–42. ht
- Song, J. M., Lee, K. H., & Seong, B. L. (2005). Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research*, *68*(2), 66–74.
- Sotomayor, J.A. (1998). Estudio sobre plantas aromáticas de los géneros *Salvia* y *Thymus*, espontáneas en el Sureste Ibérico, para su establecimiento como cultivo. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. Departamento de Biología Vegetal (Botánica); Murcia (España).

Bibliografía

- Sotomayor, J. A., Martínez, C., Moñino, I., Lax, V., Quilez, M. & Jordán, M. J. (2009). Effect of Altitude on *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil in Murcia (Spain). In K. Turgut, A. N. Onus, & A. Mathe (Eds.), *1st International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs* (pp. 309-316). International Society for Horticultural Science, Leuven, Belgium.
- St. Angelo, A.J., & Spanier, A.M. (1993) Lipid oxidation in meat. In: *Shelf life studies of foods and beverages: chemical, biological, physical and nutritional aspects*, 35. Elsevier Science Publishers. Amsterdam (The Netherlands).
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 5, 67 - 78.
- Stiles, M. E. (1991). Modified atmosphere packaging of meat, poultry and their products. In *Modified atmosphere packaging of food*, 118–147. Ellis Horwood Limited. Chichester (UK)
- Strohecker, M.G., Faustman, C., Furr, H., Hoagland, T.A. & Williams, S.N. (1997). Vitamin E supplementation effects on color and lipid stability of whole and ground lamb. *Journal of Muscle Foods*, 8, 413 – 426.
- Suman, M., Tyagi, K., & Phondba, B.T (2015) Polyphenols rich plants extract supplementation to enhance the desaturation and antioxidant activity in goat kids. *Indian journal of animal science*, 85(6), 593 - 600.
- Sun, X. D., & Holley, R. a. (2012). Antimicrobial and Antioxidative Strategies to Reduce Pathogens and Extend the Shelf Life of Fresh Red Meats. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 340–354.
- Sutherland, M.M., & Ames, J.M. (1996). Free fatty acids composition of the adipose tissue of intact and castrated lambs slaughtered at 12 and 30 weeks of age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3113-3116
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. a., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218.
- Turner, K. E., McClure, K. E., Weiss, W. P., Borton, R. J., & Foster, J. G. (2002). Alpha-tocopherol concentrations and case life of lamb muscle as influenced by concentrate or pasture finishing. *Journal of Animal Science*, 80, 2513–2521.

- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*, 669–675.
- Troy, D. J., & Kerry, J. P. (2010). Consumer perception and the role of science in the meat industry. *Meat Science*, *86*(1), 214–226.
- Valero, M., & Salmerón, M.C. (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, *85*(1-2), 73-81.
- Van Oeckel, M.J., Warnants, N., & Boucqué, C.V. (1999). Measurement and prediction of pork colour. *Meat Science*, *52*(4), 347-354
- Vasta, V., Aouadi, D., Brogna, D. M. R., Scerra, M., Luciano, G., Priolo, A., & Ben Salem, H. (2013). Effect of the dietary supplementation of essential oils from rosemary and artemisia on muscle fatty acids and volatile compound profiles in Barbarine lambs. *Meat Science*, *95*(2), 235–41.
- Vasta, V., & Luciano, G. (2011). The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminants' products quality. *Small Ruminant Research*, *101*(1-3), 150–159.
- Vasta, V., & Priolo, A. (2006). Ruminant fat volatiles as affected by diet. A review. *Meat Science*, *73*(2), 218-228.
- Vasta, V., Ratel, J., & Engel, E. (2007). Mass spectrometry analysis of volatile compounds in raw meat for the authentication of the feeding background of farm animals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(12), 4630–9.
- Vergara, H., Gallego, L., García, A., & Landete-Castillejos, T. (2003). Conservation of *Cervus elaphus* meat in modified atmospheres. *Meat Science*, *65*, 779-793.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Beest, M.V., Kruif, N.D., & Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science & Technology*, *10*, 77-86
- Vuorela, S., Salminen, H., Mäkelä, M., Kivikari, R., Karonen, M. & Heinonen, M. (2005). Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*, 8492 – 8497.

Bibliografia

- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., & Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letters*, *187*, 33–37.
- Wedzicha, B. L. & Mountfort, K. A. (1991). Reactivity of sulphur dioxide in comminuted meat. *Food Chemistry*, *39*, 281 – 297.
- Westendarp, H. (2005) Essential oils in nutrition of poultry, swine and ruminants. *Deutsche tierärztliche wochenschrift*, *112* (10), 375 – 380.
- Winston, G. W., Regoli, F., Dugas, A. J., Fong, J. H., & Blanchard, K. A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, *24*, 480–493.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 4026–4037.
- Wulf, D. M., Morgan, J. B., Sanders, S. K., Tatum, J. D., Smith, G. C., & Williams, S. (1995). Effects of dietary supplementation of vitamin E on storage and caselife properties of lamb retail cuts. *Journal of Animal Science*, *73*, 399–405.
- Xiong, Y. L. (2000). Protein oxidation and implications for muscle foods quality. In, *Antioxidants in muscle foods*, 85–111. Wiley. New York (USA).
- Young, O.A., Berdagué, J.L., Viallon, C., Rousset-Akrim, S., & Theriez, M. (1997). Fat-borne volatiles and sheepmeat odour. *Meat Science*, *45*, 169-181.
- Zhang, Y., Smuts, J. P., Dodbiba, E., Rangarajan, R., Lang, J. C., & Armstrong, D. W. (2012). Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(36), 9305–9314.
- Zhao, Y., Wells, J.H., & McMillin, K.W. (1994) Applications of dynamic modified atmosphere packaging systems for fresh red meats: Review. *Journal of muscle foods*, *5*, 299.
- Zhong, R.Z., Tan, C.Y., Han, X.F., Tang, S.X., Tan, Z.L., & Zeng, B. (2009). Effect of dietary tea catechins supplementation in goats on the quality of meat kept under refrigeration. *Small Ruminant Research*, *87*, 122-125.

Zhou, G.H., Xu, X.L., & Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat— A review. *Meat Science*, *86(1)*, 119-128.

