

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA*

Efecto del tiempo de conservación y de la temperatura en los parámetros oxidativos de carne de potro

presentado por

MARIA BENAVENT SANELEUTERIO

aurkeztua

MÁSTER EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD DE LAS
INDURSTRIAS AGROALIMENTARIAS

*TEKNOLOGIA ETA KALITATEA NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN
INDUSTRIETAN MASTERRA*

Junio, 2016

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al proyecto del INIA “Estudio de la maduración y de la vida útil del color de la carne de potro. Percepción y calidad comercial de la carne de potro mediante la valoración del producto con consumidores” (RTA2012-00090-C03-01) del Centro Tecnológico de la Carne, por el que ha surgido este proyecto.

Al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, por la beca de Colaboración en el departamento de Producción Agraria que me han concedido.

Agradecer a mis tutoras Vicky Sarriés e Iosune Cantalejo, por su dedicación y ayuda ofrecida. A María José Beriain por sus consejos.

Al departamento de Producción Agraria y Tecnología de Alimentos por permitirme el uso de sus instalaciones.

Agradecer también a Susana García por enseñarme las técnicas empleadas y por su ayuda.

Un agradecimiento especial a mi familia, mis padres y a mi hermano, y a Juanjo por apoyarme durante este tiempo.

Por último, agradecer la ayuda y el apoyo de Olaia Urrutia, Lara Martínez, Marta Ruiz y Amaia Fernández.

Muchas gracias a todos/as.

ABSTRACT

The aim of the present study was to optimize the meat oxidation techniques and to investigate the effects of temperature and storage time on protein and lipid oxidation in foal steaks packed under vacuum. The meat was stored at 2 °C and 8 °C, respectively, during 0, 4, 8 and 12 days. Protein oxidation was measured by an estimation of carbonyl groups formed, using the method of Oliver et al. (1987). Likewise, lipid oxidation expressed as malonaldehyde content was evaluated using the method proposed by Vyncke (1975). The results showed that the carbonyl content significantly changed during the time of storage ($P < 0.05$), with values of 2.45 nmol carbonyls/mg protein on day 12. This fact may suggest some degree of meat oxidation. However, there were not differences in samples stored at two refrigeration temperatures ($P > 0.05$). Regarding lipid oxidation, the results were not conclusive and further work is needed.

Keywords

Foal meat, protein oxidation, lipid oxidation, storage time, refrigeration temperature.

Resumen

El objetivo de este estudio fue la puesta a punto de las técnicas de análisis de oxidación e investigar el efecto de la temperatura y del tiempo de conservación sobre la oxidación proteica y lipídica en filetes de carne de potro envasados al vacío. La carne se conservó a diferentes tiempos (0, 4, 8 y 12 días) y a dos temperaturas de refrigeración (2 °C y 8 °C). La oxidación proteica se midió empleando el método de Oliver et al. (1987) por el cual se cuantificó el contenido de carbonilos proteicos. La oxidación lipídica se evaluó con el método propuesto por Vyncke (1975), cuantificando el contenido de malonaldehído formado. Los resultados del presente estudio mostraron que la cantidad de carbonilos varió significativamente a lo largo del tiempo de conservación ($P < 0,05$), con valores de 2,45 nmol carbonilos/mg proteína a día 12, lo que implicaría cierto grado de oxidación de la carne. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las muestras conservadas a dos temperaturas de refrigeración ($P > 0,05$). La evolución de los carbonilos a lo largo del tiempo estudiado no sigue un patrón claro. Finalmente, los resultados de la oxidación lipídica no fueron concluyentes y sería necesario profundizar en su estudio.

Palabras clave

Carne de potro, oxidación proteica, oxidación lipídica, tiempo de conservación, temperatura de refrigeración.

ÍNDICE

1.	Introducción	1
2.	Revisión bibliográfica	2
2.1.	Sector equino	2
2.2.	Características generales de la carne de potro	3
2.3.	Características nutricionales de la carne de potro.....	4
2.4.	Características organolépticas de la carne de potro.....	7
2.5.	Oxidación de la carne	8
2.5.1.	Oxidación proteica	8
	Mecanismos	8
	Reactividad de los carbonilos proteicos.....	11
	Tratamientos <i>post mortem</i> de la carne y oxidación proteica	12
	Métodos para determinar la oxidación proteica en alimentos	12
	Consecuencias.....	13
2.5.2.	Oxidación lipídica	14
	Mecanismos	14
	Métodos para determinar la oxidación lipídica en alimentos	15
	Consecuencias.....	16
2.5.3.	Estrategias para combatir la oxidación	16
3.	Objetivos y planteamiento experimental	18
4.	Material y métodos	19
4.1.	Diseño experimental	19
4.2.	Sacrificio de los animales	20
4.3.	Condiciones de almacenamiento	21
4.4.	Método analítico	22
	Oxidación proteica	22
	Oxidación lipídica	22

4.5.	Análisis estadístico	23
5.	Resultados y Discusión	24
5.1.	Puesta a punto de las técnicas	24
5.1.1.	Oxidación proteica	24
5.1.2.	Oxidación lipídica	24
5.2.	Oxidación proteica	24
5.3.	Oxidación lipídica	26
6.	Conclusiones.....	29
7.	Referencias.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional carne de caballo.	5
Tabla 2. Composición aminoácidica en el músculo <i>Longissimus dorsi</i> en potros.....	6
Tabla 3. Factores que influyen en la oxidación lipídica	15
Tabla 4. Ingredientes y composición química y de ácidos grasos del pienso.	19
Tabla 5. Evolución de la oxidación proteica para las dos temperaturas a lo largo del tiempo. .	25
Tabla 6. Evolución de la oxidación lipídica para las dos temperaturas a lo largo del tiempo.	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de carne a nivel mundial por especies en 2013.....	2
Figura 2. Producción de la carne de caballo en España del 1993 al 2013.	3
Figura 3. Perfil AG potros.....	7
Figura 4. Perfil AG vacuno	7
Figura 5. Formación de un carbonilo proteico a partir de Lys	9
Figura 6. Modificación de las cadenas laterales de los aminoácidos como consecuencia de las reacciones de oxidación	10
Figura 7. Reacciones de un carbonilo proteico (AAS).....	11
Figura 8. Reacción del grupo carbonilo con el DNPH para formar DNP-hidrazona.....	13
Figura 9. Reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el MDA	16
Figura 10. Media canal de potro cruzado Burguete x Gallego de Monte, madurada 24 h.	20
Figura 11. Recepción de las canales a la sala de despiece.....	21
Figura 12. Lomos obtenidos tras el despiece.....	21
Figura 13. Filete del Longissimus dorsi.	21
Figura 14. Evolución de la oxidación lipídica para las muestras conservadas a 2 °C.....	27
Figura 15. Evolución de la oxidación lipídica para las muestras conservadas a 8 °C.....	27

ABREVIATURAS

AAA: ácido α -aminoadípico

AAS: semialdehído α -aminoadípico

Cu: cobre

DHA: Ácido docosahexaenoico

DNPH: dinitrofenilhidrazina

EEM: error estándar de la media

EPA: Ácido eicosapentaenoico

Fe: hierro

GC-MS: cromatografía de gases con espectrometría de masas

GGS: semialdehído γ -glutámico

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HPLC-DAD: cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos

HPLC-FLD: cromatografía líquida de alta resolución detector de fluorescencia

HPLC-MS: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas

HR: humedad relativa

I.R.: las ingestas recomendadas

LD: *Longissimus dorsi*

Lys: lisina

MAP: envasado en atmosfera modificada

MDA: malonaldehído

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados

OX-P: oxidación proteica

PUFA: ácidos grasos polinsaturados

ROS: especies reactivas de oxígeno

T^a: temperatura

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TC: tiempo de conservación

TCA: ácido tricloroacético

1. INTRODUCCIÓN

Un consumo regular de carne de caballo puede contribuir a la reducción del colesterol total y a la ingesta de las lipoproteínas de baja densidad (colesterol LDL) y a mejorar el índice n-3/n-6 y aumenta el índice n-3 (EPA + DHA), el ácido docosahexaenoico y el estado del hierro (Bo et al., 2013).

Los consumidores demandamos productos bajos en grasa y en colesterol, pensando en nuestra salud cardiovascular. Una buena opción es la carne de caballo que se caracteriza por tener una baja cantidad de grasa, bajo contenido de colesterol y altos niveles de hierro hemo, que es el que presenta una mayor absorción. Las características nutricionales de la carne de potro revelan que este tipo de carne puede ser considerada como una nueva alternativa en el consumo de carne, siendo considerada como una carne “dietética” (Badiani et al., 1997). Por su contenido en ácidos grasos poliinsaturados, contenido de hierro y de glucógeno, la carne de caballo presenta una mayor oxidación, lo que supone una disminución de su vida útil. Según Sarriés et al. (2014) en un estudio llevado a cabo con carne de potro, vieron que el tiempo de conservación de esta carne madurada era de 3 días a refrigeración en bandejas de polietileno y cubiertas con film. Por esto es necesario estudiar el comportamiento oxidativo de la carne que permitan estudiar estrategias para aumentar su vida útil.

La oxidación lipídica y proteica en la carne y derivados es una de las causas principales del deterioro de la carne. La oxidación lipídica ha sido tradicionalmente más estudiada que la oxidación proteica en alimentos, esta última es uno de los temas más innovadores de estudio dentro del campo de química de los alimentos. El hecho que las proteínas son objetivos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) se ignoró durante varias décadas (Lund et al., 2011).

En los lineales frigoríficos de comercialización la carne se mantiene a una temperatura de 2 °C, en este estudio se emplearon dos temperaturas de refrigeración (2 °C y 8 °C) para conocer su efecto sobre la calidad de la carne y así estudiar la posibilidad de mantenerla en rangos de temperatura comprendidos entre 2 y 8 °C.

El presente Trabajo Final de Máster forma parte de un Proyecto de investigación titulado “Estudio de la maduración y de la vida útil del color de la carne de potro. Percepción y calidad comercial de la carne de potro mediante la valoración del producto con consumidores”. Dicho proyecto ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) cuya referencia es RTA2012-00090-C03-02, correspondiente a la Convocatoria 2012 dentro del Subprograma de Proyectos de Investigación Fundamental orientada a los recursos y tecnologías Agrarias en coordinación con las Comunidades Autónomas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sector equino

Los équidos, desde la antigüedad, se han considerado como productores de carne para la alimentación humana. No obstante, en España, históricamente no se han contemplado los caballos como animales destinados a la producción de carne. Aunque tradicionalmente para la producción de carne se ha usado todo tipo de ganado equino (caballar, mular y asnal), hoy en día este subsector se sustenta básicamente de la producción de caballos de aptitud cárnica (Magrama, 2003).

La carne de caballo se produce en diferentes países, pero el nivel de producción es menor en comparación con otros tipos de carnes. En la Figura 1 se representa la producción de carne por especies a nivel mundial, el sector equino representa el 0.25% del total. Según Faostat desde el año 1993 al 2013, los productores principales a nivel mundial son, China, Méjico, Kazajistán y Rusia. Respecto a la producción de carne equina en Navarra, en el año 2014 esta fue de 2.574,12 Tm (canal) mientras que en el 2015 fue de 3.289,14 Tm (canal) (Gobierno-Navarra, 2016). Se observa que hubo un incremento el último año.

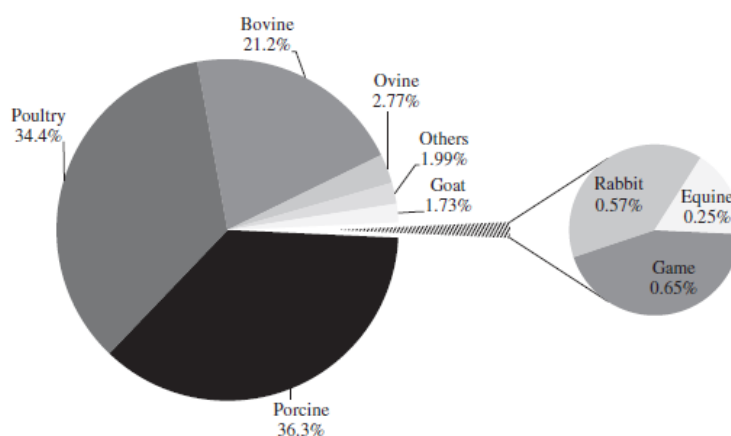


Figura 1. Producción de carne a nivel mundial por especies en 2013 (Belaunzaran et al., 2015).

El caballo de Burguete es un cruce de yeguas tipo Jaca con caballos franceses pesados como el Bretón, Ardenés y Comtois. Esta raza se extiende fundamentalmente por la zona noreste de Navarra. Está considerada por la FAO, el MAGRAMA y por la Comunidad Foral de Navarra como razas autóctonas en peligro de extinción (BON).

El caballo Gallego de Monte es una denominación de la población equina explotada en régimen de libertad en los montes de Galicia y está relacionada directamente con el caballo de Pura Raza Gallega, con el tronco Celta en común (Franco et al., 2011).

En la Figura 2 se muestra la producción de la carne de caballo en España durante los últimos 20 años. En España hay cada vez más aceptación de la carne de equino entre los consumidores. De hecho, su producción se disparó en los años de la crisis económica, aunque en 2013 la oferta se redujo sensiblemente y lo mismo sucedió en 2014. Con respecto a la Producción Final Agraria, el sector aportó en 2014 el 0,1% y con respecto a la Producción Animal, el 0,3% (en ambos casos

muy por encima de las cifras del año 2013). En el año 2014 se sacrificaron aproximadamente 46.400 animales (un 9% menos que en 2013) y la producción de carne se situó en unas 11.100 toneladas, 600 tm menos que el año anterior. La región con mayor producción de carne de equino en 2014 fue de nuevo Navarra con el 22% del total y también mostró el mayor censo con el 18% del total (Sainz et al., 2016).

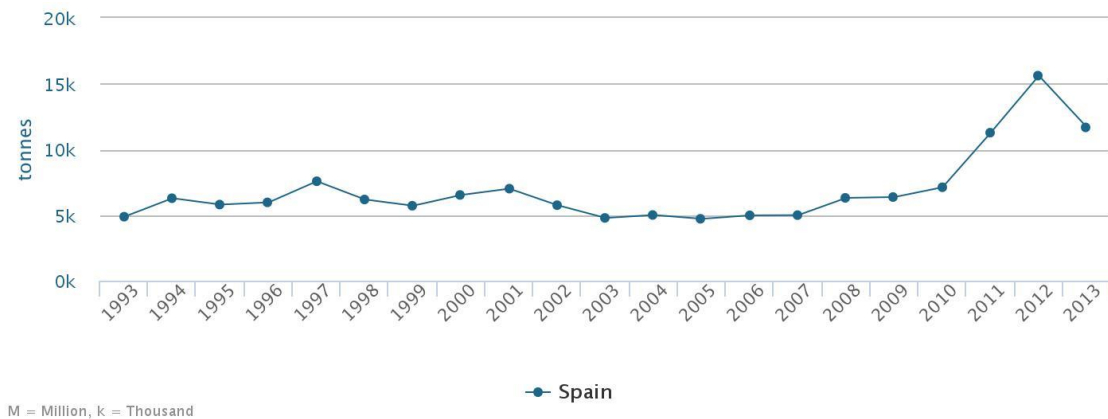


Figura 2. Producción de la carne de caballo en España del 1993 al 2013 (FAO, 2016).

2.2. Características generales de la carne de potro

Según el Código Alimentario Español, la denominación genérica de carne incluye la parte comestible de los músculos de los bóvidos, óvidos, suidos, cápridos, équidos y camélidos sanos, sacrificados en condiciones higiénicas. Presentará un olor característico, y su color debe oscilar del blanco rosáceo al rojo oscuro, dependiendo de la especie animal, raza, edad, alimentación, forma de sacrificio y periodo de tiempo transcurrido desde que aquél fue realizado. En la calidad de la carne influyen diferentes parámetros y atributos como el pH, el color, la flora bacteriana, la capacidad de retención de agua, la composición química, el nivel de oxidación lipídica, propiedades de la textura, atributos sensoriales, etc. Estos atributos no pueden considerarse independientes, ya que están muy relacionados entre sí y su interacción proporciona las características globales de la calidad de la carne (Sierra, 2010).

En España hay dos sistemas de ganado para producir la carne de potro, que difieren principalmente en la edad del sacrificio, uno es a los 16 meses y el otro a los 24 meses. Según el “Catalogue de Classement des Équidés” del Office National Interprofessionnel du Bétail et des Viandes, se considera animal joven o potro a los animales menores de 1 año y entre los 15-24 meses de edad, pueden llegar ocasionalmente hasta los 30 meses. Los animales adultos o caballos se consideran a partir de 30 meses (ONIBEV, 1979). Según Fàbregas (2002) la carne de potro incluye las canales de lechales y potros, animales jóvenes cuya carne es rosada con grasa de color crema. La carne de caballo, incluye principalmente a canales de caballos y también adultos de asnos y mulas, carne roja con grasa de color amarillo. El color de la carne de caballo depende de la edad, así la carne de potro es más rosada y la del caballo adulto tiene un tono más intenso.

2.3. Características nutricionales de la carne de potro

La carne de caballo contiene entre 0,5 y 3 veces más cantidad de glucógeno que la carne de ternera, esto le proporciona un flavor más dulce. Por la cantidad de glucógeno y de ATP, la carne de caballo conserva el grado de plasticidad y la elasticidad durante más tiempo (Rossier, 1993). La maduración de esta carne alcanza un punto de maduración suficiente a los 4 - 5 días *post-mortem* y, por tanto, el pH baja rápidamente. Desde una perspectiva higiénico-sanitaria y por su elevado contenido en glucógeno, ácido láctico y nitrógeno no proteico, su período de vida útil comercial es inferior al de la carne de vacuno (Fàbregas, 2002).

En la Tabla 1 se muestra la composición nutricional de la carne de caballo por 100 g y por ración (150 g); también aparecen las ingestas recomendadas (I.R.) por día para hombres y mujeres de 20 a 39 años con una actividad física moderada y el porcentaje que representa cada nutriente por la toma de una ración de carne, según las recomendaciones diarias para un hombre. Las **calorías** aportadas por 100 g de carne de caballo no llegan a las 100 Cal, en cambio la carne de vacuno aporta sobre 120-200 Cal por 100 g. Por tanto, se puede decir que la carne de caballo aporta menos calorías.

En cuanto a las **proteínas**, la carne de potro se caracteriza por tener una mayor proporción de proteína que en ternera; esta última tiene 18.5% de proteínas y la carne de caballo 21%. Siendo esta de un elevado valor biológico (40% de aminoácidos esenciales). Su contenido se ve afectado por el sexo, el tipo de músculo y por el sistema de producción. La carne de potro es una fuente de aminoácidos esenciales. El aminoácido más abundante es la lisina, seguido de la leucina y la arginina. De los aminoácidos no esenciales más abundantes, están el ácido glutámico, ácido aspártico y la alanina (Lorenzo and Pateiro, 2013). En la Tabla 2 se observa la composición de los aminoácidos esenciales y no esenciales por g/100 g de proteína para potros en el músculo *Longissimus dorsi*.

Los **lípidos** se encuentran en baja cantidad y representan aproximadamente el 2% de la composición total de la carne. Respecto a la composición de los ácidos grasos, la carne de caballo se caracteriza por tener un nivel alto de ácidos grasos insaturados, de manera que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) predominantes son linoleico (n-6), que representa un 43% del total de los PUFA, y linolénico (n-3). El oleico es el ácido graso monoinsaturado (MUFA) más predominante. La carne de caballo tiene un bajo contenido de colesterol, sobre un 20% menos si se compara con otras carnes (Bo et al., 2013). Sarriés, Murray, Troy y Beriain (2006) encontraron contenidos mayores de PUFA en potros jóvenes en comparación con potros mayores.

El nivel de grasa aumenta con la edad, el peso y el sexo. Los potros hembras tienen mayor proporción de grasa en la canal. Según Lorenzo y Sarriés (2014) las hembras tienen 12,3% de grasa y los machos 9,4%. Respecto a la grasa de la canal, en hembras encontraron 14,9% y en los potros machos 15,8%. La mayor diferencia entre machos y hembras es que el grado de grasa es mayor en la canal de las hembras (Lorenzo et al., 2014b).

Tabla 1. Composición nutricional carne de caballo.

	100 g	Ración (150 g)	I.R. hombres	I.R. mujeres	% Ración
Energía (kcal)	93	140	3000	2300	4,6
Proteínas (g)	21	31,5	54	41	58
Lípidos totales (g)	2,2	3,3	100-117	77-89	3,3
AG saturados (g)	0,90	1,35	23-27	18-20	5
AG poliinsaturados (g)	0,65	0,975	17	13	5,73
n-6	0,43	0,65	10	8	6,5
n-3	0,21	0,315	3,3-6,6	2,6-5,1	9,55
AG monoinsaturados (g)	0,61	0,91	67	51	1,36
Colesterol (mg/1000cal)	50-61	75-91,5	<300	<230	13,35
Potasio (mg)	332	498	3500	3500	14,22
Fosforo (mg)	200	300	700	700	42,85
Sodio (mg)	44	66	<2000	<2000	3,3
Magnesio (mg)	23	34,5	350	330	10
Zinc (mg)	6	9	15	15	60
Hierro (mg)	4	6	10	18	60
Calcio (mg)	3,77	6,65	1000	1000	0,56
Selenio (µg)	3	4,5	70	55	6,43
Equivalentes de niacina (mg)	8,2	12,3	20	15	61,5
Riboflavina (mg)	0,1	0,15	1,8	1,4	8,3
Tiramina (mg)	0,07	0,11	1,2	0,9	9,17
Vitamina B₁₂ (µg)	2,08	3,12	2	2	156

Fuente: Badiani et al. (1997); Bo et al. (2013); Magrama (2016).

Tabla 2. Composición aminoacídica en el músculo *Longissimus dorsi* en potros.

Aminoácido esencial	Composición aminoacídica (g/100 g proteína)
Lisina	9,15 ± 0,22
Leucina	8,54 ± 0,18
Arginina	6,48 ± 0,75
Valina	5,32 ± 0,08
Isoleucina	5,23 ± 0,35
Treonina	5,09 ± 0,22
Histidina	4,60 ± 0,27
Fenilalanina	4,32 ± 0,09
Metionina	1,45 ± 0,26
Aminoácido no esencial	
Ácido glutámico	15,32 ± 0,21
Ácido aspártico	9,61 ± 0,21
Alanina	5,97 ± 0,12
Glicina	4,37 ± 0,20
Serina	4,06 ± 0,10
Prolina	3,92 ± 0,18
Tirosina	3,46 ± 0,27

Fuente: Lorenzo y Pateiro (2013).

En la Figura 3 se muestra el perfil de ácidos grasos para potros hembras de 16 meses y en la Figura 4 se puede observar el perfil de ácidos grasos para vacuno. La proporción de AG poliinsaturados es mayor en el caso del potro. Los ácidos grasos predominantes en el músculo LD del potro, son saturados, seguidos de los monoinsaturados y, finalmente se encuentran los poliinsaturados. Sarriés et al. (2006) estudiaron el perfil de ácidos grasos en potros y encontraron respecto a los ácidos grasos saturados, que los potros de 24 meses mostraron mayor proporción de mirístico y de pentadecanol, pero no se observaron diferencias para el palmitato. Los potros de 24 meses mostraron una cantidad menor de esteárico. Estos animales mostraron una concentración mayor de los ácidos grasos monoinsaturados, siendo el oleico el ácido graso que se encontró en mayor proporción (suponían el 71,3% del total de MUFA intramuscular). La proporción de los poliinsaturados, difirió entre los dos sistemas de producción (16 y 24 meses); los de 24 meses tenían concentraciones menores de ácido linoleico, araquidónico y del total n-6, pero mayor proporción de n-6/n-3, respecto a los potros de 16 meses.

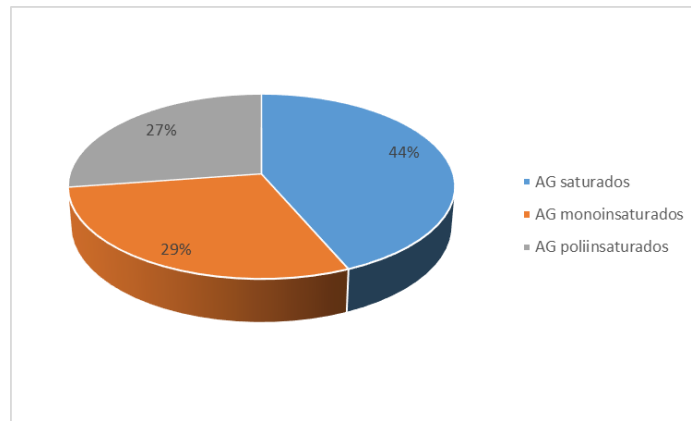


Figura 3. Perfil AG potros (Sarriés et al., 2006).

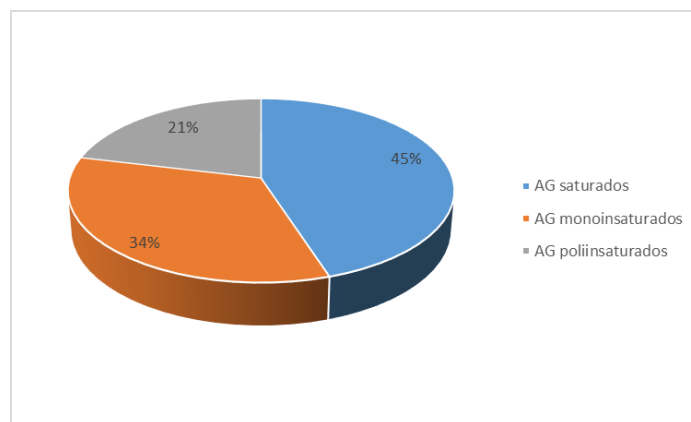


Figura 4. Perfil AG vacuno (Alzueta and Beriain, 2000).

2.4. Características organolépticas de la carne de potro

Las dos características organolépticas más importantes para el consumidor a la hora de comprar carne de potro, son la terneza y el color. Lo que determina la terneza es la parte insoluble de las proteínas de la carne: colágeno, las proteínas miofibrilares y las fibras musculares. Por otro lado, el color depende de la edad del caballo; así la carne de potro es más rosada y la del caballo adulto tiene un tono más intenso. Esto ocurre porque el contenido en pigmentos aumenta con la edad (Fàbregas, 2002). La carne de caballo es rica en mioglobina y tiene alta capacidad de combinarse con el oxígeno y por lo tanto se acelera la oxidación de la oximioglobina de color rojo brillante a metamioglobina de color marrón. Tateo et al. (2008), reportaron un valor de mioglobina en el músculo LD de 3,20 mg/g. En el trabajo de Sarriés y Beriain (2005) en potros de 24 meses presentaron un contenido de mioglobina menor que los de 16 meses (1,71 vs 3,51 mg/g de mioglobina). Estas circunstancias reducen la estabilidad del color rojo de la carne fresca de caballo, acortando la vida útil (Badiani and Manfredini, 1994). El color de la carne de caballo depende además del sexo y de la localización del músculo

Otro de los criterios de calidad organoléptica es el color de la grasa de la canal que varía según la cantidad de hierba o forraje que haya consumido el animal. Un potro alimentado con poca cantidad de hierba presentará una canal con buen estado de engrasamiento y grasa de color

crema, mientras que un potro que consuma más hierba, tendrá una canal más magra, la coloración de la grasa más amarillenta y la de la carne rosada oscura (Fàbregas, 2002).

2.5. Oxidación de la carne

Durante varias décadas se ha estudiado la oxidación lipídica de la carne, esto ha permitido conocer los mecanismos de oxidación de los ácidos grasos, el impacto de esta oxidación y algunas estrategias para frenarla. No obstante, también se produce oxidación en las proteínas y las proteínas cárnicas sufren cambios que van a afectar a sus propiedades funcionales.

El oxígeno juega un papel fundamental en la degradación de varios constituyentes de los alimentos, porque está involucrado en muchas reacciones como el crecimiento microbiano, el pardeamiento enzimático, pérdida de vitaminas y la oxidación lipídica (Caprioli et al., 2009).

2.5.1. Oxidación proteica

El estrés oxidativo puede causar modificaciones reversibles o irreversibles en las proteínas. Las modificaciones reversibles, generalmente en los residuos de cisteína, pueden ser reparadas mediante enzimas específicas como las glutaredoxinas o tioredoxinas (Lillig et al., 2008). Las modificaciones irreversibles no pueden ser reparadas, de forma que las proteínas inactivas se acumulan o son degradadas. Un ejemplo de modificaciones irreversibles es el caso de la carbonilación de las proteínas.

Mecanismos

Como en el caso de los lípidos, la oxidación proteica implica que los átomos traspasen electrones a otros átomos o moléculas en presencia de un agente oxidante, como un radical libre. Estos radicales libres son moléculas inestables que se forman como consecuencia de la reacción entre metales de transición como el hierro o el cobre y diversas especies de oxígeno como el peróxido de hidrógeno e incluso el oxígeno molecular. El hierro hemínico (mioglobina) también induce la carbonilación en proteínas cárnicas (Estévez et al., 2012a). Los radicales libres suelen actuar sobre los ácidos grasos con dobles enlaces y en las proteínas a las cadenas laterales de los aminoácidos. Además, el radical libre produce una desaminación oxidativa en presencia de un metal de transición que actúa como catalizador lo que provoca la pérdida del grupo amino y la formación de un grupo carbonilo (Figura 5). El proceso de oxidación proteica tiene lugar sobre la proteína íntegra y no hace falta una proteólisis previa. Se desconoce si una proteína parcialmente degradada es más o menos sensible a la acción de los radicales libres (Estévez et al., 2012a).

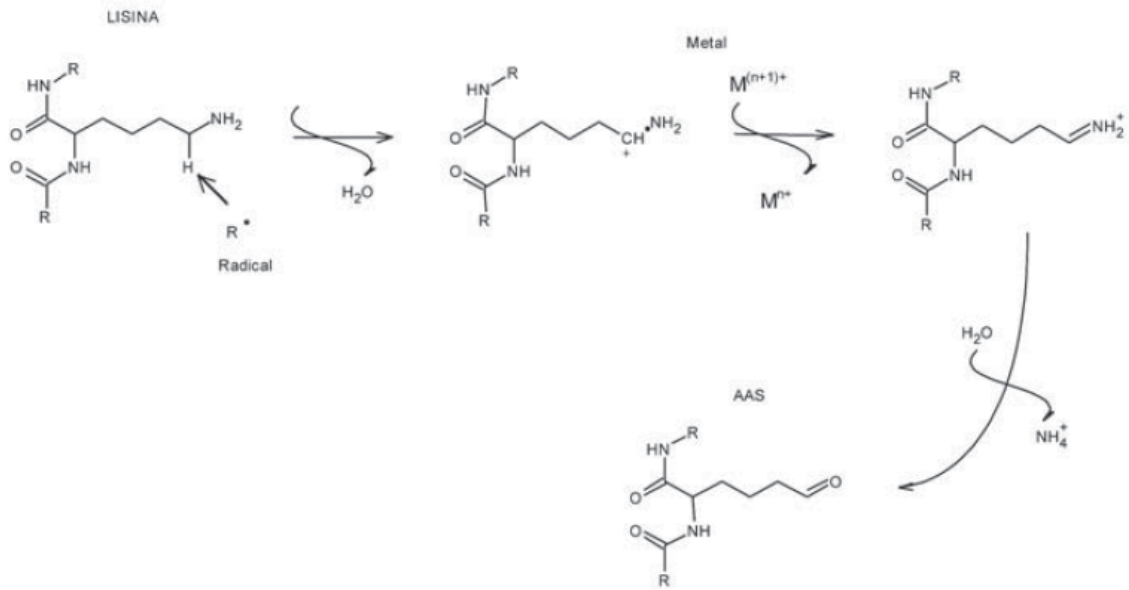
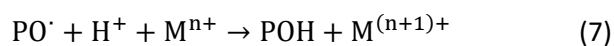
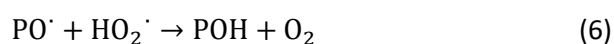
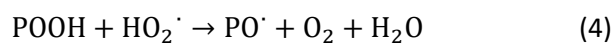
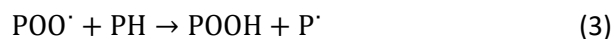


Figura 5. Formación de un carbonilo proteico a partir de Lys (Estévez et al., 2012a).

Algunas especies reactivas de oxígeno (ROS) como el superóxido ($O_2^{\cdot -}$), hidropéroxido (HO_2^{\cdot}) y el hidroxil (HO^{\cdot}) y otras especies no radicalarias como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o hidropéroxidos (ROOH) son potenciales iniciadores de la oxidación proteica (Estévez, 2011). Algunos componentes que están presentes en el tejido muscular como los lípidos insaturados, pigmentos hemo, metales de transición y enzimas oxidativas, son precursores potenciales o catalizadores de la formación de ROS y juegan un papel importante en la iniciación de la oxidación proteica del músculo (Xiong, 2000). Los objetivos de ROS suelen ser el esqueleto peptídico y el grupo funcional. Como consecuencia se extrae un átomo de hidrógeno y se forma un radical proteico en el carbón central (P^{\cdot}) (reacción 1). Este se convierte en un radical peróxido (POO^{\cdot}) en presencia de oxígeno y capta un hidrógeno de una molécula susceptible para formar un peróxido de alquilo (POOH) (reacciones 2 y 3). Otras reacciones con ROS, como el radical HO_2^{\cdot} radical o metales de transición como el Fe^{2+} o Cu^+ , pueden formar un radical alcoxi (PO^{\cdot}) (reacciones 4 y 5) y su derivado hidroxilo (POH) (reacción 7) (Estévez, 2011).



La formación de carbonilos a partir de las cadenas laterales de lisina, treonina, arginina y prolina se suele atribuir a los sistemas de oxidación catalizada por metales. Según este mecanismo, las formas reducidas de metales de transición reducirían H_2O_2 para formar un reactivo intermedio (radical hidroxilo; OH^\cdot) (reacción 8). Se ha demostrado que la combinación de metales de transición con H_2O_2 tiene efecto pro oxidante en las proteínas cárnicas (Estévez, 2011).



Como consecuencia de la oxidación mediada por metales, a partir de la treonina se forma el ácido alfa-cetobutírico, de la lisina se forma el semialdehído α -aminoadípico (AAS), y de la arginina y la prolina se obtiene el semialdehído γ -glutámico (GGG). El AAS y SGG se propusieron originalmente como biomarcadores del daño oxidativo de las proteínas. Estos semialdehídos se consideran los principales carbonilos debidos a la oxidación de proteínas catalizada por metales. Representan entre el 50 y el 70% del total de carbonilos que se forman en la carne y en productos cárnicos (Estévez et al., 2012a). Por esto se podrían utilizar como marcadores de daño oxidativo en proteínas de origen cárnico (Armenteros, 2010).

Hay otros mecanismos por los que se pueden formar carbonilos en proteínas, pero este es el único que se ha demostrado que ocurre en alimentos (Estévez, 2011). La oxidación proteica implica gran variedad de moléculas susceptibles, mecanismos y productos finales de oxidación. De este modo, cada aminoácido presenta una ruta específica de oxidación y da lugar a productos de oxidación específicos, en la Figura 6 se muestra las reacciones de oxidación de diferentes aminoácidos (Estévez et al., 2012a). A nivel aminoacídico, la oxidación provoca cambios irreversibles en los grupos funcionales de los aminoácidos originales para formar productos de oxidación de naturaleza diversa como puentes disulfuro, ditirosinas y carbonilos (Berlett, 1997).

La carbonilación puede tener lugar en ausencia de oxidación lipídica, pero en sistemas complejos como la carne, la presencia de lípidos oxidados influye muy probablemente sobre la OX-P. Los radicales lipídicos e hidroperóxidos que se forman en la oxidación lipídica pueden iniciar la oxidación de proteínas adyacentes (Estévez et al., 2012b).

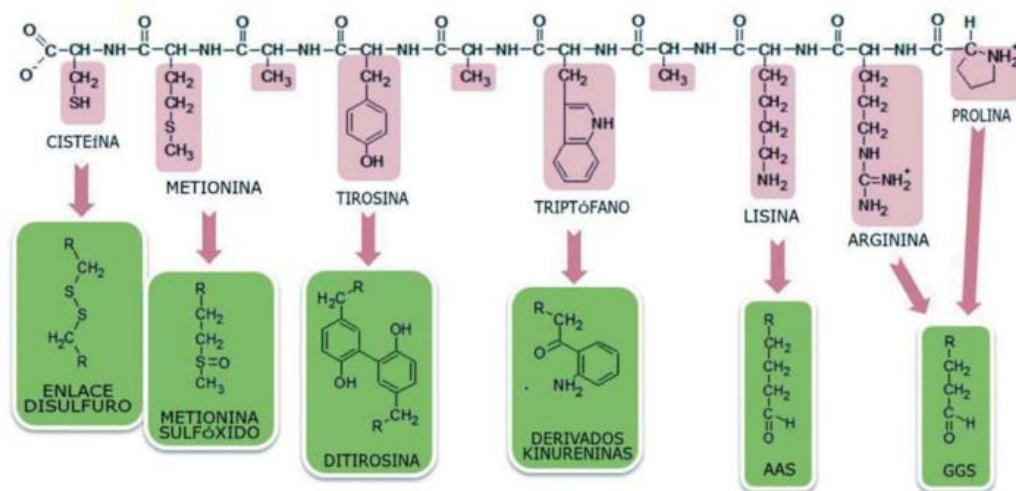


Figura 6. Modificación de las cadenas laterales de los aminoácidos como consecuencia de las reacciones de oxidación (Estévez et al., 2012a).

Como consecuencia del estrés oxidativo *in vivo* hay carbonilos en los animales en una cantidad basal, pero estos se incrementan tras el sacrificio del animal y durante el almacenamiento y procesado. La curación, las altas presiones, las radiaciones ionizantes y los tratamientos culinarios promueven la oxidación de proteínas y la formación de carbonilos. La carbonilación de las proteínas también tiene lugar durante el almacenamiento a refrigeración y en la congelación de la carne o de los productos cárnicos (Estévez et al., 2012b). El grado de carbonilación depende de la temperatura de almacenamiento de congelación (Utrera et al., 2014).

Reactividad de los carbonilos proteicos

Se sabe que los carbonilos participan en diferentes reacciones de importancia biológica. La fracción aldehído de los carbonilos proteicos, pueden participar en varias reacciones, i) degradación oxidativa en el que el aldehído se oxida a ácido carboxílico. ii) la reacción con un aldehído de otro residuo carbonílico unido a proteínas para formar un producto de condensación aldólica, iii) la reacción con un grupo amino de un aminoácido de una proteína vecina (principalmente lisina) para formar un enlace covalente a través de la formación de base de Schiff, y iv) la reacción con un grupo α -amino de un aminoácido libre para formar un aldehído de Strecker a través de la degradación Strecker desaminación oxidativa y descarboxilación del aminoácido en la presencia de un compuesto carbonilo (Estévez, 2011) (Figura 7).

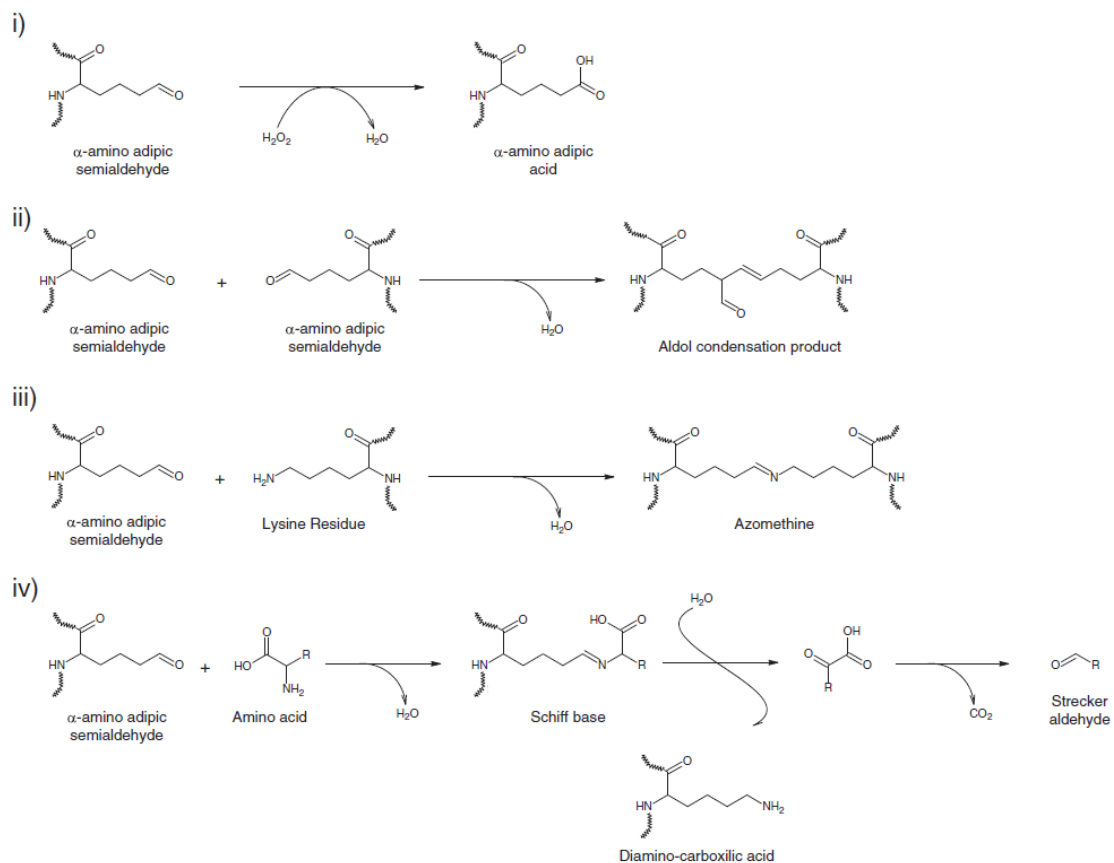


Figura 7. Reacciones de un carbonilo proteico (AAS): i) La oxidación del resto carbonilo. ii) Formación de una condensación aldólica producto por la reacción con un AAS vecina. iii) Formación de una azometina (base de Schiff) por reacción con un grupo amino de un aminoácido

vecino. iv) Implicación en la formación de un aldehído de Strecker por una degradación de tipo Strecker de un aminoácido libre (Estévez, 2011).

En condiciones de oxidaciones intensas, la oxidación continua de AAS daría lugar a la formación de un producto final estable: ácido α -aminoadípico (AAA). La formación de AAA a partir de AAS requiere la presencia de oxígeno y un agente oxidante. En sistemas biológicos, varios metales de transición y ROS podrían estar involucrados en la degradación oxidativa (Estévez, 2011). La molécula resultante se puede detectar fácilmente por HPLC o por GC-MS. Pero las investigaciones en relación al AAA como oxidación de proteínas son escasas. Sell, Strauch, Shen, y Monnier (2007) apuntaron que AAA puede ser un marcador más fiable de la P-OX que su precursor carbonilo.

Tratamientos *post mortem* de la carne y oxidación proteica (Soladoye et al., 2015)

- Maduración y fermentación

La maduración incrementa la concentración de carbonilos proteicos y se produce una reducción de los grupos sulfhidrilos que dependen de las condiciones de almacenamiento y del envase. La fermentación también va a favorecer la oxidación proteica, ya que se produce un descenso del pH del medio, aumentan los ácidos grasos libres y los aminoácidos libres.

- Salado y curado

La sal tiene un efecto pro-oxidante en los lípidos de la carne y depende del perfil metabólico del músculo, con un efecto mayor en los músculos rojos en comparación con los blancos; la grasa total y el nivel de ácidos grasos polinsaturados. Durante el curado también se produce un aumento de la oxidación en lomo y jamón de cerdo, aunque se ha visto que los nitritos tienen una capacidad antioxidante frente a la oxidación proteica, aunque Villaverde et al. (2014) observaron que los nitritos promovían la formación de carbonilos en salchichas fermentadas.

- Trituración

La trituración o el fileteado, aumenta el área de superficie de la proteína y dañar la compartimentación celular y el sistema de defensa antioxidante, esto hace que los diversos pro-oxidantes queden en contacto directo con las proteínas en presencia de oxígeno molecular, haciendo a las proteínas más vulnerables al ataque de los ROS (Xiong, 2000).

- Almacenamiento a congelación

Estudios recientes han declarado que el almacenamiento a congelación aumenta la oxidación proteica, lo cual fue atribuido a la liberación de hierro catalítico por la alteración de las membranas celulares y la posible crioconcentración de solutos pro-oxidante alrededor de las moléculas de proteína en la porción de agua descongelada en carnes congeladas (Utrera and Estévez, 2013).

Métodos para determinar la oxidación proteica en alimentos

Contenido total de carbonilos

La cantidad total de carbonilos es un indicador global de la oxidación proteica. De forma rutinaria se emplea la técnica dinitrofenilhidrazina (DNPH) para cuantificar los carbonilos proteicos, pero esta técnica no proporciona información de las rutas de oxidación implicadas y tampoco la naturaleza de los productos de oxidación.

El método consiste en la reacción de los grupos carbonilos proteicos con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar 2,4-dinitrofenilhidrazonas (Figura 8). La cantidad de carbonilos se mide a 370 nm y se expresa como nmol de carbonilos por miligramo de proteína usando el coeficiente de extinción molar de las hidrazonas (21.0/mM/cm). La concentración de proteínas se calcula midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando como estándar albumina de suero bovino.

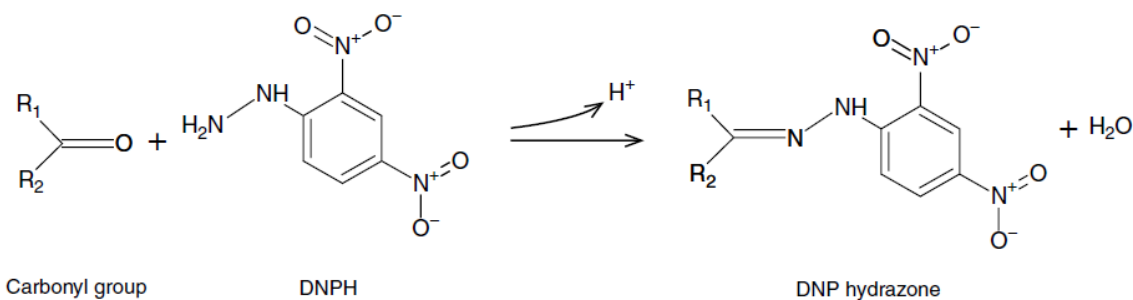


Figura 8. Reacción del grupo carbonilo con el DNPH para formar DNP-hidrazona (Estévez et al., 2009).

Carbonilos específicos

Se han desarrollado varios procedimientos para cuantificar los semialdehídos (AAS y GGS) en muestras biológicas, basados en la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-MS), en la cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos (HPLC-DAD) o con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) o acoplada a un espectrómetro de masas (HPLC-MS) (Armenteros, 2010).

Consecuencias

La OX-P tiene una influencia negativa tanto en la calidad sensorial como en el valor nutritivo de la carne. La repercusión sobre la calidad de la carne se debe a que ésta contiene menos aminoácidos esenciales y se digieren con mayor dificultad, ya que los enzimas digestivos se pueden inactivar o se puede oxidar el sustrato y estas no reconocerlo. Como no se digieren las proteínas, el organismo no puede asimilar los aminoácidos; por otro lado, las proteínas oxidadas pasan sin digerirse al intestino grueso, dónde se fermentan y producen compuestos potencialmente tóxicos (Estévez et al., 2012b).

Las proteínas oxidadas pierden parte de sus propiedades funcionales como la capacidad de retención de agua, que es muy importante en la jugosidad de la carne fresca; la capacidad de formar geles, necesaria para elaborar productos tratados con calor como el jamón cocido; y la capacidad emulsificante, que ayuda a retener la grasa en la elaboración de productos cárnicos (Estévez et al., 2012a). Todos estos factores afectan a la calidad de la carne y de los productos cárnicos. Además en productos cárnicos procesados la oxidación provoca cambios en el color y la textura (Estévez et al., 2012b).

La oxidación de las proteínas tiene una influencia negativa sobre la ternura de la carne. La tenderización de la carne que tiene lugar en el *rigor mortis* depende de las enzimas proteolíticas (calpaínas y catepsinas) que actúan sobre las proteínas miofibrilares, esto provoca una carne menos tierna y más firme (Estévez et al., 2012a). Finalmente se obtiene una carne menos tierna

y más firme. Según Lund, Lametsch, Hviid, Jensen, y Skibsted (2007) en la carne envasada en atmosferas ricas en oxígeno, se produce un aumento de la dureza, debido a la formación de enlaces cruzados, que provocan un incremento en la rigidez de la estructura miofibrilar.

Los procesos tecnológicos aplicados a la carne, como la curación, las altas presiones hidrostáticas, las radiaciones ionizadas o los tratamientos culinarios promueven la oxidación de proteínas y la formación de carbonilos. La carbonilación de las proteínas cárnicas continúa durante la refrigeración y congelación de la carne. La congelación de la carne influye en la capacidad de las proteínas de la carne para retener el agua y la grasa (Estévez et al., 2012a). Como indicaron Liu, Xiong, y Chen (2010) la formación de enlaces disulfuro como consecuencia de la OX-P, provoca la formación de una estructura muscular rígida e impide el hinchamiento de la carne durante el marinado y la captación de agua.

2.5.2. Oxidación lipídica

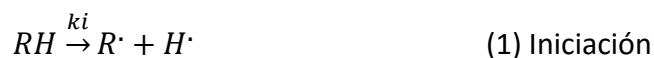
La oxidación lipídica es un aspecto importante a tener en cuenta durante el almacenamiento de la carne. El índice de TBA proporciona una medida del grado de oxidación de grasas. Se sabe que los ácidos grasos poliinsaturados, por el hecho de poseer varios dobles enlaces, son susceptibles a oxidación. Los cambios bioquímicos que ocurren durante la conversión del músculo en carne, como el descenso del pH y la ruptura de la estructura de las miofibrillas, favorecen las condiciones de oxidación. Así mismo, los niveles de oxidación lipídica en la carne pueden verse influenciados por el tipo de alimentación del ganado.

La oxidación de los lípidos es un proceso sumamente complejo que implica a numerosas reacciones que dan lugar a una gran variedad de cambios físicos y químicos. Los lípidos musculares de los alimentos, y en particular los compuestos fosfolipídicos, sufren una degradación y producen un gran número de compuestos volátiles. Sin embargo, los hidroperóxidos, productos de la oxidación primaria, no huelen y son insípidos, su degradación conduce a la formación de una variedad de productos secundarios como aldehídos, hidrocarburos, alcoholes, cetonas, ácidos, ésteres, entre otros (Jayathilakan et al., 2009). Los productos secundarios y sobre todo los aldehídos, originan un amplio espectro de olores. El proceso de oxidación puede iniciarse o acelerarse por el oxígeno, la luz, el hierro, etc. Por otro lado, la célula viva tiene la glutatión peroxidasa, que reduce los hidroperóxidos al compuesto hidroxílico, pero esta reacción cesa cuando se sacrifica el animal.

Mecanismos

La exposición al oxígeno y la luz son los principales factores que originan la aparición de fenómenos oxidativos en la carne y/o productos cárnicos. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) actúan sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica se inicia tras la abstracción de un átomo de hidrógeno en la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos poliinsaturados (reacción 1). En un ambiente aerobio se produce la interacción del radical lipídico (R[·]) con el O₂ dando lugar a la formación del radical peroxilo (ROO[·]) (reacción 2). Posteriormente, se puede sustraer un nuevo H de otro lípido (reacción secuencial), para formar un hidroperóxido lipídico (ROOH) y un nuevo radical lipídico, que inicia de nuevo la secuencia de propagación (reacción 3). El ciclo de propagación es interrumpido por las reacciones de

terminación (reacciones 4-6), en las que se consumen los radicales. Las interacciones bimoleculares de radicales libres originan productos no-radicales muy estables (Rojano et al., 2008), como el malondialdehído (MDA).



En los alimentos con alto contenido de lípidos, la etapa más importante es la formación y descomposición de los hidroperóxidos, que generan una serie de compuestos oxidados como cetonas, aldehídos, alcanos y alquenos de bajo peso molecular y de alta volatilidad, que a su vez determinan el valor sensorial del alimento. Este fenómeno se denomina rancidez (Rojano et al., 2008). El uso de antioxidantes puede retardar la rancidez, pero no la detienen.

Los agentes promotores e inhibidores de la oxidación se muestran en la Tabla 3. La reacción de oxidación, también depende de la distribución de los lípidos en el alimento, así como de su área de exposición (Badui, 2006). Los metales de transición como el hierro, cobre y cobalto pueden catalizar la iniciación y aumentar la propagación de la autooxidación lipídica.

Tabla 3. Factores que influyen en la oxidación lipídica.

Promotores	Inhibidores
Temperaturas altas	Refrigeración
Metales: Cu, Fe...	Secuestradores
Peróxidos de grasas oxidadas	Antioxidantes
Lipoxidasa	Escaldado
Presión de oxígeno	Gas inerte o vacío
Luz ultravioleta	Envase opaco
Poliinsaturación	Hydrogenación de ácidos insaturados

Fuente: Badui (2006).

De los productos de la oxidación lipídica secundaria, los aldehídos son compuestos clave, ya que reaccionan fácilmente con las proteínas y pueden llegar a modificar sus características organolépticas y propiedades nutricionales.

Métodos para determinar la oxidación lipídica en alimentos

La pérdida de los ácidos grasos sólo puede ser cuantificada en la última etapa del proceso de oxidación, se puede cuantificar con el índice del ácido tiobarbitúrico (TBA) se fundamenta en la detección del malondialdehído (MDA) y de otros aldehídos, que se generan en la descomposición oxidativa de los PUFA. Los aldehídos reaccionan con el ácido tiobarbitúrico,

para rendir una especie cromófora de color rosado, que presenta un máximo de absorción a 532 nm (Figura 9). El MDA es uno de los principales productos secundarios de la oxidación lipídica. El método TBARS se utiliza normalmente para medir los productos derivados de la oxidación secundaria de los lípidos en sistemas musculares (Armenteros, 2010).

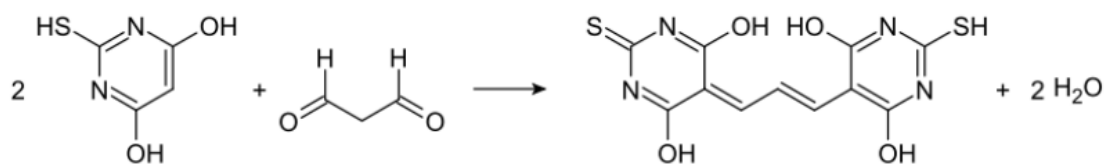


Figura 9. Reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el MDA (López et al., 2014).

No obstante, el método tiene algún inconveniente como la falta de especificidad, el TBA reacciona con una variedad de aldehídos, no sólo con aquellos formados como resultado de la peroxidación lipídica, el TBA produce compuestos amarillos con otros aldehídos, de forma que la presencia de sacarosa y de ácidos interfiere en su medida y además el MDA reacciona con proteínas lo cual reduce su concentración para su determinación (Badui, 2006). Otros problemas son que el MDA no es estable por largo periodos de tiempos, que la técnica es poco sensible a bajas concentraciones de MDA (Navarro et al., 2004)

Consecuencias

Los cambios asociados a la oxidación lipídica constituyen la principal causa de deterioro de la carne y/o productos cárnicos, ya que provocan la aparición de olores y sabores desagradables y la alteración del color y, por lo que en general la calidad organoléptica del producto. Por tanto producen una disminución del valor nutritivo de la carne (Armenteros et al., 2012). Así mismo dan lugar a una disminución del valor nutritivo de la carne y la generación de compuestos potencialmente nocivos para la salud relacionados con el riesgo de padecer diversas patologías. Se cree que la ingesta de lípidos oxidados tiene un gran impacto sobre la salud del consumidor, y además ciertos productos procedentes de la oxidación de lípidos están involucrados en el desarrollo de enfermedades como el cáncer y la cardiopatía coronaria (Armenteros et al., 2012).

2.5.3. Estrategias para combatir la oxidación

Hay diferentes estrategias para proteger las proteínas del daño oxidativo y así mejorar la calidad sensorial y el valor nutritivo de la carne y los productos cárnicos. Estas estrategias se dividen en dos grupos: estrategias *ante mortem* y *post mortem* (Estévez et al., 2012b). Las estrategias *ante mortem* o nutricionales, se aplican a través de la alimentación animal y, consisten en enriquecer los piensos en α -tocoferol y carotenoides; incluyendo polifenoles en las dietas. La alimentación en extensivo, mediante el uso de recursos naturales como bellotas y pasto, contribuye a mejorar la estabilidad oxidativa de las proteínas cárnicas y la calidad de la carne y productos cárnicos procesados. Este fenómeno se explica por el elevado contenido en tocoferoles de bellotas y pasto.

Las estrategias *post mortem* o tecnológicas, se aplican directamente sobre el alimento, mediante dos procedimientos: el primero es el envasado, siendo un ejemplo el envasado al vacío

que es efectivo para proteger a las proteínas cárnicas del daño oxidativo. El segundo es la aplicación de ingredientes o aditivos con actividad antioxidante, como por ejemplo los compuestos fenólicos que pueden actuar neutralizando radicales libres, donando un átomo de hidrógeno, y actuando como quelantes de metales e inhibiendo su acción pro-oxidante. Pero las formas oxidadas de los compuestos fenólicos promueven la desaminación oxidativa que lleva a su carbonilación (Estévez et al., 2012b).

3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Los objetivos del presente trabajo final de máster fueron:

- Puesta a punto de las técnicas para determinar la oxidación proteica y lipídica en muestras de carne de potro.
- Estudiar la influencia de la temperatura (2 y 8 °C) y el tiempo de conservación (0, 4, 8 y 12 días) sobre la oxidación proteica y lipídica en filetes de carne de potro conservados a vacío.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño experimental

Para este estudio se emplearon once potros cruzados entre la raza equina Caballo Gallego de Monte y la raza equina Burguete de Navarra. Los animales cruzados se criaron en la granja Marco da Curra (A Coruña, Galicia, España), situado a 650 m de altitud. Los potros nacieron entre los meses de abril a julio de 2014 y fueron destetados a los 6 -7 meses. Éstos fueron criados libremente con sus madres, de forma que pudieron pastar *ad libitum* y, a continuación, fueron alimentados en pastos en pastoreo rotativo; en campos con semillas. La vegetación estaba compuesta de semillas (*Lolium perenne* y *Trifolium repens*) y de hierba (*Agrostis* spp., *Lotus corniculatus*, *Holcus lanatus*, *Bromus mollis*, *Pseudoarrenatherum longifolium*, etc). Los potros fueron terminados en pastoreo y, durante un promedio de 104 días, fueron alimentados con pienso convencional (Tabla 4) que se fue incrementado gradualmente la cantidad de pienso administrado hasta llegar a los 2 kg por animal y día.

Tabla 4. Ingredientes y composición química y de ácidos grasos del pienso.

Ingredientes (%)	
Avena	30,0
Maíz	15,5
Cebada	30,0
Soja	10,0
Salvado	8,0
Glicerol	4,0
CaCO ₃	1,0
CaHPO ₄	0,5
Sal	0,5
Nucleo vit	0,5
Salmocid	0,1
Composición química (%)	
Proteína bruta	13,1
Fibra bruta	6,3
Grasa bruta	3,2
Ceniza bruta	4,9
Lisina	0,6
Metionina	0,2
Calcio	0,7
Fosforo	0,5
Sodio	0,3
Magnesio	0,2
Composición de los ácidos grasos (%)	
C14:0	0,18
C16:0	15,78
C18:0	2,10
C16:1	0,18
C18:1	31,28
C18:2	45,02
C18:3	2,99

4.2. Sacrificio de los animales

Los potros se sacrificaron en el año 2015 con 13 meses de edad (peso medio de 270 kg). Fueron sacrificados en un matadero autorizado, a 50 km de la explotación, en una planta comercial. Los animales fueron aturdidos por el método de la bala cautiva, de acuerdo con la normativa vigente de la UE (Directiva del Consejo de la Unión Europea 95/221EC). Después del sacrificio, las canales se enfriaron durante 24 h en una habitación convencional a 0 °C y un 98% de HR. Una vez en la sala de despiece (Figura 10 y 11), se extrajo el músculo *Longissimus dorsi* de cada canal (Figura 12 y se cortó en filetes de 2,5 cm de grosor (Figura 13).



Figura 10. Media canal de potro cruzado Burguete x Gallego de Monte, madurada 24 h.



Figura 11. Recepción de las canales a la sala de despiece.



Figura 12. Lomos obtenidos tras el despiece.



Figura 13. Filete del *Longissimus dorsi*.

4.3. Condiciones de almacenamiento

Los filetes de potro fueron cortados de manera aséptica y se envasaron en condiciones de vacío (99%) (FRIMAQ, V-900, Lorca, España). Estos se separaron en dos grupos, uno para mantenerlo a 2 °C y el otro a 8 °C. Para cada uno de los lotes se emplean 4 filetes para los 4 tiempos de conservación correspondientes a los 0, 4, 8 y 12 días de estudio y se emplearon dos

temperaturas (2 °C y 8 °C) de refrigeración para cada uno de los días de estudio. Los filetes se mantuvieron durante el tiempo de conservación a temperatura de refrigeración y posteriormente se procedió a su congelación, hasta la realización del análisis.

4.4. Método analítico

Oxidación proteica

Los carbonilos proteicos, medidos como el contenido de carbonilos totales, se cuantificaron siguiendo el método descrito por Oliver, Ahn, Moerman, Goldstein y Stadtman (1987) y modificado por Vuorela et al. (2005). Las muestras de carne se homogenizaron en 20 ml de 0,6 M NaCl durante 60 s usando el Ultra-Turrax (IKA T25 digital ULTRA-TURRAX). Se cogieron dos alícuotas del homogenizado (0,1 mL) y se transfirieron a viales Eppendorf. Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (1 mL) y se centrifugaron durante 5 min a 10000 g. A uno de los *pellets* se le trató con 2N HCl (1 mL) para cuantificar las proteínas y al otro con 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH) al 0,2% en HCl 2 M (1 mL) para cuantificar los carbonilos. Las muestras se incubaron durante 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente, agitándose cada 20 minutos. Después se añadió TCA al 10% (0,8 mL), se agitaron en vortex (Vortex Mixers ZX³ Velp Scientifica) durante 30 s, y se dejaron reposar durante 15 min a una temperatura de 0 - 4 °C. Se centrifugaron durante 5 min a 10000 g y se eliminó el sobrenadante. El *pelet* se lavó dos veces con 1 mL de etanol-acetato de etilo (1:1 v/v) y se secó con N₂ gas. Finalmente, el *pelet* se disolvió con 1,5 mL de 20 mM fosfato sódico 6 M en un búffer de hidrocloreuro de guanidina, y se agitó y centrifugó durante 5 min a 10000 g, para precipitar los fragmentos insolubles. El contenido de proteínas se calculó con la absorbancia a 280 nm (Espectrofotómetro UV/vis con detector de diodos, Shimadzu UV-2101PC) usando como estándar la albúmina de suero bovino. El contenido de carbonilos se expresó como nmol de carbonilos por miligramo de proteína usando un coeficiente de extinción de 21,0 mM⁻¹ cm⁻¹ a 370 nm.

Oxidación lipídica

La estabilidad lipídica se evaluó con el método propuesto por Vyncke (1975) con alguna variación. Se cogió una muestra de 2 gramos y se picó, se añadió 10 mL de TCA 5 % y se homogenizó con Ultra-Turrax (IKA T25 digital ULTRA-TURRAX) durante 1 min (11500 rpm). El homogenizado se mantuvo a - 10 °C durante 10 min y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró con filtro Filter-lab nº 1246 sobre hielo. Se cogió 1 mL del filtrado y se hizo reaccionar con 1 mL de TBA al 0,02 M y se incubó en baño de agua a 96 °C durante 40 min. Se enfriaron los tubos y se centrifugaron a 10000 rpm durante 4 minutos a 20 °C. La absorbancia se midió a 530 nm (Espectrofotómetro UV/vis con detector de diodos, Shimadzu UV-2101PC). Los valores de los TBARS, fueron calculados a partir de una curva patrón de 1,1-3,3 tetraetoxipropano (TEP) y expresado como mg MDA/kg muestra.

4.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) usando el Modelo Lineal General, mediante el programa IBM-SPSS versión 23 para Windows, para todas las variables consideradas, siguiendo el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + TC_j + (TxTC)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} : valores de oxidación proteica y lipídica para los diferentes tiempos de conservación y temperaturas.

μ : media de la población considerada.

T_i : efecto de la temperatura de refrigeración ($i = 1, 2$ °C; $i = 2, 8$ °C).

TC_j : efecto del tiempo de conservación ($j = 1$, día 0; $j = 2$, día 4; $j = 3$, día 8; $j = 4$, día 12).

ε_{ijk} : error residual aleatorio.

Se completa el estudio mediante comparaciones múltiples post hoc, con el procedimiento HSD de Tukey. El nivel de significación utilizado es del 5 % ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Puesta a punto de las técnicas

5.1.1. Oxidación proteica

Se han modificado unos pasos de la técnica original para su optimización. Cuando se tomaban las alícuotas de 100 μ l de la muestra homogenizada, se cogía el volumen adecuado en una micropipeta, y se pesaba en una balanza de precisión para comprobarlo, ya que un mínimo error en este paso, suponía grandes variaciones en los resultados finales.

Se decidió incrementar la fuerza gravitacional de 5000 g a 10000 g, ya que cuando se eliminaba el sobrenadante, parte del *pelet* era arrastrado con él. Al subir la fuerza centrífuga, el sobrenadante salía limpio. En el método de referencia (Oliver et al., 1987) especificaba poner las centrífugas a 4 °C, no obstante, en la modificación de Vuorela et al. (2005) no estaba especificada. Teniendo en cuenta otros trabajos que también indicaban la centrifuga a 4 °C (Tenas, 2012), se optó por hacerlo a esta temperatura.

Otra parámetro que se modificó fue reducir el número de lavados con etanol y acetato de etilo, ya que según Vuorela et al. (2005) se podían hacer 2 o 3 lavados, se compararon los resultados haciendo dos y tres lavados, y teniendo en cuenta que los resultados no mostraron diferencias, se procedió a realizar en las muestras dos lavados.

5.1.2. Oxidación lipídica

Anteriormente el método empleado en el laboratorio para determinar la oxidación lipídica en carne era el TBARS descrito por Tarladgis et al. (1960). Para este experimento se empleó el descrito por Vyncke (1975), del cual se han modificado algunos pasos.

Debido a que la carne de potro es muy sensible a la oxidación, a la hora de pesar la muestra, se dejaban los tubos en hielo y se homogenizaban con el hielo, pero en lugar de 2 minutos el tiempo empleado fue de 1 minuto a 11500 rpm. Las revoluciones de la centrifuga se subieron de 3500 rpm a 5000 rpm para tener un *pellet* más compacto y recoger mejor el sobrenadante. El sobrenadante se filtró con filtro Filter-Lab nº 1249 que hace una rápida filtración, ya que el poro es de 20-25 μ , sin embargo, con este filtro el filtrado obtenido contenía parte del precipitado. Por esto se cambió al filtro Filter-Lab nº 1246, que es de filtración lenta, con un poro de 1-3 μ m y se obtenía un filtrado limpio. Por último, antes de leer la absorbancia se hace una centrifugación de 10000 rpm 4 min a 20 °C, para precipitar por si hubiera algún sólido en suspensión.

5.2. Oxidación proteica

Los resultados del presente trabajo muestran que no hubo efecto de la temperatura de refrigeración (2 °C y 8 °C) para las muestras a todos los tiempos ($P = 0,983$). Sin embargo, el tiempo de conservación sí que mostró un efecto en la formación de carbonilos proteicos ($P = 0,013$). Por último, no se observó interacción entre el tiempo de conservación y la temperatura ($P = 0,242$).

La evolución del contenido de carbonilos durante el almacenamiento a diferentes temperaturas se muestra en la Tabla 5. Las concentraciones iniciales de carbonilos fueron de 2,21 nmol carbonilos/mg proteína. En el día 4 el valor fue de 1,86 que no difirió del valor de día 8 (1,90 nmol carbonilos/mg proteína), pero estos dos fueron menores que en a día 12 (2,45 nmol carbonilos/mg proteína) y día 1. La evolución de los carbonilos no mostró un patrón claro a lo largo del tiempo de conservación. Este aumento de los carbonilos en las muestras indicaría que las reacciones oxidativas tuvieron lugar durante el almacenamiento a refrigeración.

Tabla 5. Evolución de la oxidación proteica (nmol carbonilos/mg proteína) para las dos temperaturas a lo largo del tiempo.

Temperatura (°C)	Tiempo conservación (días)				EEM	P-valor
	0	4	8	12		
2	2,21 ± 0,56	2,03 ± 0,38	2,05 ± 0,20	2,15 ± 0,40	0,12	0,678
8	2,21 ^{ab} ± 0,56	1,86 ^b ± 0,43	1,90 ^b ± 0,23	2,45 ^a ± 0,47	0,13	0,009

Valores medios ± desviación estándar (n = 11).

EEM: error estándar medio.

^{ab} las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las filas.

En general, en los tejidos musculares no oxidados, el contenido de carbonilos es de 1 nmol/mg proteína mientras que en tejidos oxidados puede oscilar desde 2 hasta 14 nmol/mg proteína, dependiendo de varios factores como la iniciación de la oxidación, el tipo de músculo y la solubilidad de la proteína (Rowe et al., 2004). Por tanto, podríamos decir que la carne analizada tiene un cierto grado de oxidación. Se debe considerar que, al estar envasada al vacío, la oxidación disminuya. Xiao et al. (2011) vieron que, en carne de pollo envasada al vacío, la oxidación proteica y lipídica se reducía significativamente. Zakrys et al. (2012) encontraron diferencias en el contenido de carbonilos en carne de bovino (MAP y vacío), ya que el oxígeno en muestras de carne MAP favorece una mayor formación de enlaces disulfuro y la oxidación de proteínas. Además, Zakrys et al. (2010) y Zakrys et al. (2008) observaron en carne de ternera que la oxidación proteica aumentó con el incremento de oxígeno y el tiempo de conservación. Por tanto, cabe esperar que al aumentar el tiempo de conservación, aumente la oxidación, ya que los carbonilos proteicos se forman principalmente por la interacción entre las proteínas y los aldehídos formados como resultado de la oxidación de los lípidos (Estévez, 2011).

El método usado en este trabajo es el más empleado para medir la oxidación proteica, no obstante el reactivo DNPH no reacciona sólo con los grupos carbonilos de las proteínas sino que también puede reaccionar con los grupos carbonilos de los lípidos, dando lugar a una sobreestimación en la concentración total de carbonilos procedentes de proteínas (Armenteros, 2010). Además, los carbonilos son moléculas que pueden seguir reaccionando y dar lugar a compuestos diferentes como el ácido carboxílico o productos de condensación aldólica, lo cual explicaría que los valores sean menores a día 4 y 8 de conservación. Nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado por Lorenzo y Gómez (2012) y Gómez y Lorenzo (2012) que no encontraron una tendencia clara en el contenido de carbonilos para muestras de potro envasadas al vacío. De hecho, Lorenzo y Gómez (2012) en carne de potro envasada al vacío obtuvieron valores iniciales en similares a los observados en este estudio (2,27 nmol/mg

proteína) y también a día 14 que fueron 2,65 nmol/mg proteína. Así mismo, observaron que durante la conservación el contenido de carbonilos inicialmente aumentaba y disminuía posteriormente. Este comportamiento también fue descrito por otros autores para otras carnes. Gallo et al. (2012) obtuvieron valores similares para carne de pollo con una oxidación máxima a los 6 días de conservación con un valor de 3 nmol carbonilos/mg proteína y luego con una tendencia decreciente. Salminen et al. (2006) observaron en carne de cerdo envasada al vacío que la cantidad de carbonilos variaba a lo largo del tratamiento de 0,4 a 3 nmol carbonilos/mg proteína, donde el valor más alto se observó el día 6 y luego disminuyó. No obstante, hay algún estudio que no encontró diferencias en el contenido de carbonilos a lo largo del tiempo de conservación, como Lagerstedt et al. (2011) que trabajó en filetes de ternera envasados al vacío.

Como se ha comentado, el daño producido por la oxidación proteica, tiene diversas consecuencias funcionales como la disminución de la capacidad de retención de agua, emulsificante, en las propiedades de gelificación, y puede contribuir en parte al deterioro de la calidad de la carne y de productos cárnicos (Xiao et al., 2011).

5.3. Oxidación lipídica

El proceso de enranciamiento es conocido como un serio problema durante el almacenamiento de los productos cárnicos. Según Greene y Cumuze (1982), el valor de TBA que produce olores anómalos en carnes es de 2 mg MA/ kg para un panel sensorial. Otros autores como Papadima et al. (1999), indican que los productos cárnicos con valores de TBA superiores a 1 mg son considerados rancios. Más reciente, Wood et al. (2008) indicaron valores límites de 0,5 mg de MDA/kg de carne.

En la tabla 6 se muestran los valores obtenidos para la oxidación lipídica expresada como mg de MDA/kg de carne, para las diferentes muestras a 2 °C y 8 °C y para los cuatro tiempos de conservación. Se obtuvieron valores muy altos para día 0 de 0,50 mg de MDA/kg de carne. A día 4 hubo una disminución de los valores para las dos temperaturas de refrigeración (0,39 mg de MDA/kg de carne). Los valores de malonaldehído a día 8 se incrementaron respecto al día 4 y fue de 0,44 mg de MDA/kg de carne y, a día 12 volvió a aumentar llegando a valores de 0,48 mg de MDA/kg de carne.

Tabla 6. Evolución de la oxidación lipídica (mg de MDA/kg de carne) para las dos temperaturas a lo largo del tiempo.

Temperatura (°C)	Tiempo conservación (días)				EEM
	0	4	8	12	
2	0,50 ± 0,12	0,39 ± 0,07	0,44 ± 0,08	0,45 ± 0,10	0,03
8	0,50 ± 0,12	0,39 ± 0,05	0,44 ± 0,05	0,49 ± 0,08	0,02

Valores medios ± desviación estándar (n = 11).

EEM: error estándar medio.

Los valores obtenidos no se ajustan al patrón de comportamiento esperado para la oxidación lipídica en carne. En otros trabajos en los que se determina la oxidación lipídica por el mismo método (TBARS) en carne de potro (Gómez y Lorenzo, 2012; Lorenzo y Gómez, 2012; Lorenzo et

al., 2014a) se observó una tendencia creciente en la oxidación respecto el tiempo de conservación con valores iniciales en torno a 0,1 mg de MDA/kg de carne, llegando a valores de 0,38 mg de MDA/kg de carne para día 14

En la Figura 14 y 15 aparece representada la evolución del MDA a lo largo del tiempo de conservación para las muestras conservadas a 2 °C y 8 °C respectivamente. Se observó una alta variabilidad de los datos dentro de un mismo grupo, tanto para las muestras a 2 °C como las de 8 °C. Los valores atípicos para las muestras conservadas a 2 °C fueron el potro número 10 a día 4 y los potros 10 y 11 a día 12. Para las muestras refrigeradas a 8 °C los atípicos fueron los potros número 5 y 10 a día 12.

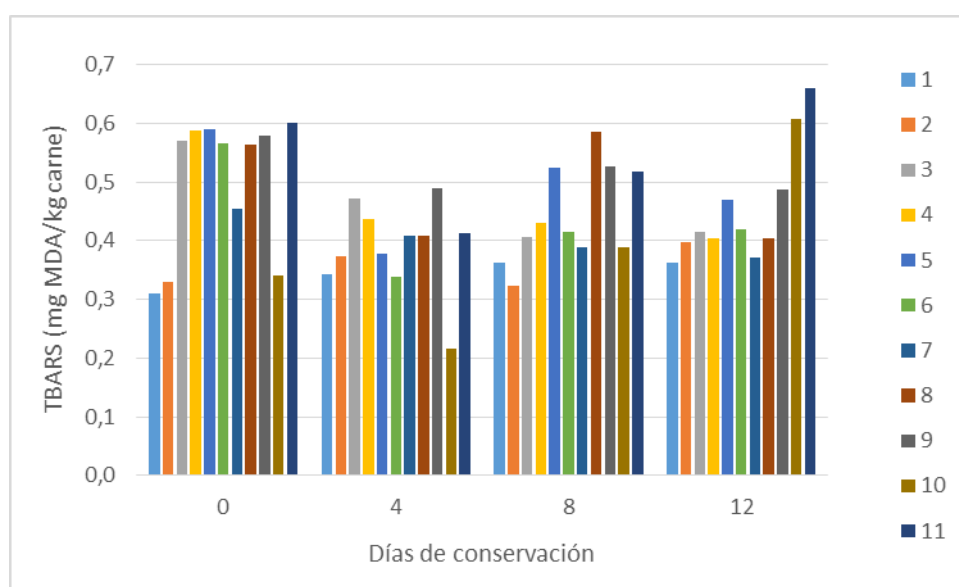


Figura 14. Evolución de la oxidación lipídica para las muestras conservadas a 2 °C.

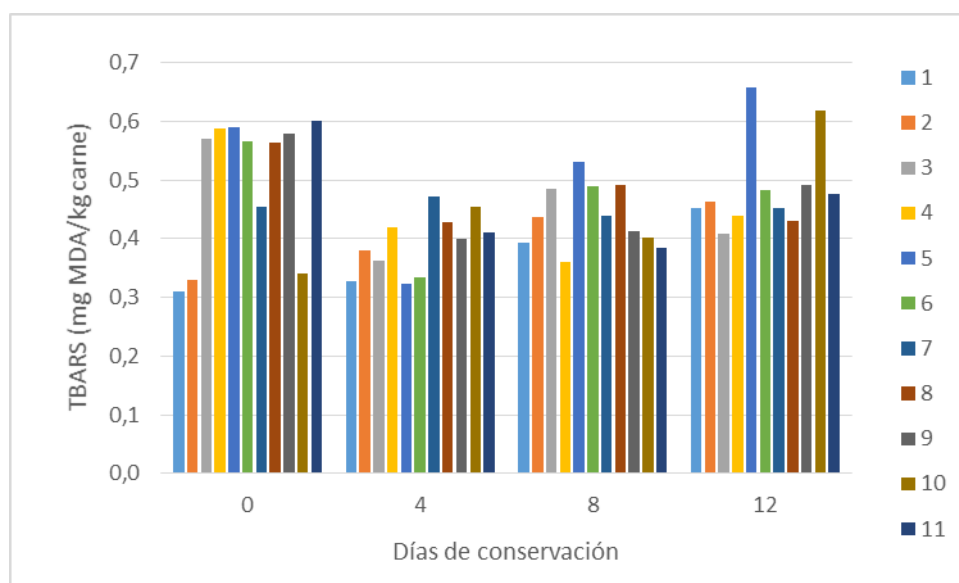


Figura 15. Evolución de la oxidación lipídica para las muestras conservadas a 8 °C.

Por causa de la alta dispersión de los datos, sobre todo para día 0, y por la no homogeneidad de ellos, no se aplicó el análisis estadístico. Con estas figuras (14 y 15) se ve que el comportamiento de la oxidación lipídica para las muestras es muy diferente, por tanto, sería necesario hacer un estudio más profundo. En este experimento, una de las posibles causas de los valores iniciales elevados y del comportamiento observado, podría ser que otras moléculas como aldehídos, sacarosa, etc. hubieran interferido en la cuantificación. Pero, además, se debe considerar que uno de los objetivos del trabajo fue la puesta a punto de la técnica, por esto, se debería seguir trabajando para contrastar estos resultados preliminares y dar unos resultados concluyentes. Otra consideración a tener en cuenta es que la carne de potro es muy rica en PUFA, por la alimentación que han seguido los potros (pasto), también es rica en hierro y en mioglobina, moléculas susceptibles de la oxidación lipídica y que van a acortar su vida útil. También se debe tener en cuenta que la carne de potro está poco estudiada, pero hasta el momento se ha visto que hay mucha variabilidad de un animal a otro, alimentado y criado en las mismas condiciones.

Por otro lado, algunos estudios encontraron interacción entre la oxidación proteica y la oxidación lipídica en carne de potro durante el estudio de la vida útil (Gómez y Lorenzo, 2012; Lorenzo y Gómez, 2012), sin embargo, otros autores (Armenteros et al., 2009) no han encontrado una correlación. Por ello, con unos resultados contrastados, sería interesante estudiar la posible relación entre la oxidación proteica y lipídica.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo y en las condiciones de este experimento, se concluye que:

- Se ha realizado la puesta a punto de la técnica para determinar el contenido de carbonilos proteicos (método del DNPH), optimizando algunos aspectos tales como la reproducibilidad de los datos obtenidos.
- Se ha hecho la puesta a punto del método del TBARS, modificando algunos pasos con el fin de obtener lecturas más precisas.
- El efecto de la temperatura sobre la oxidación proteica de la carne de potro, no ha mostrado diferencias significativas para las muestras almacenadas a 2 °C y a 8 °C para el nivel de significación establecido. Esto implicaría la posibilidad de mantener la carne en los lineales de refrigeración de los establecimientos alimentarias a una temperatura mayor de los 2 °C.
- El efecto del tiempo de conservación en la oxidación proteica de la carne estudiada, ha mostrado un cambio en la cantidad de carbonilos proteicos formados, aunque no se apreció una tendencia creciente. Esto podría deberse a que los carbonilos son moléculas muy reactivas y se pueden transformar en otros productos. Los valores obtenidos mostrarían un cierto grado de oxidación de la carne. No obstante, al final del tratamiento (día 12) no se apreciaron valores muy altos de carbonilos, esto se podría deber a que tenemos las muestras envasadas al vacío, y este tipo de envase reduce la oxidación tanto proteica como lipídica y por tanto aumenta la vida útil en la carne.
- En cuanto a la oxidación lipídica se debería seguir estudiando y profundizar más, ya que los resultados obtenidos, no siguen el patrón esperado y comparándolo con otros estudios de potro, son muy altos a día 0 y los valores tienen una alta variabilidad.

7. REFERENCIAS

- Alzueta, M. J., and M. J. Beriain. 2000. La grasa de la carne de vacuno : virtud o defecto. *Mundo Ganad.*:36–40.
- Armenteros, M., M. Heinonen, V. Ollilainen, F. Toldrá, and M. Estévez. 2009. Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Meat Sci.* 83:104–112.
- Armenteros, M., S. Ventanas, D. Morcuende, M. Estévez, and J. Ventanas. 2012. Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. *Eurocarne* 207:63–73.
- Armenteros, M. 2010. Reducción de sodio en lomo y jamón curados. Efecto sobre la proteólisis y las características sensoriales. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Badiani, A., and M. Manfredini. 1994. The production of horsemeat. *Ital. J. Anim. Sci.* 20:5–43.
- Badiani, A., N. Nanni, P. P. Gatta, B. Tolomelli, and M. Manfredini. 1997. Nutrient Profile of Horsemeat 1. *J. Food Compos. Anal.* 10:254–269.
- Badui, S. 2006. *Química de los alimentos*. 4th ed. Pearson Educación, México.
- Belaunzaran, X., R. J. B. Bessa, P. Lavín, A. R. Mantecón, J. K. G. Kramer, and N. Aldai. 2015. Horsemeat for human consumption - Current research and future opportunities. *Meat Sci.* 108:74–81.
- Berlett, B. S. 1997. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 272:20313–20316.
- Bo, C. Del, P. Simonetti, C. Gardana, P. Riso, G. Lucchini, and S. Ciappellano. 2013. Horse meat consumption affects iron status, lipid profile and fatty acid composition of red blood cells in healthy volunteers. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 64:147–154.
- BON. La carne de potro sana y saludable. Available from: <http://goo.gl/CoAw5h>
- Caprioli, I., M. O'Sullivan, and F. J. Monahan. 2009. Use of sodium caseinate/glycerol edible films to reduce lipid oxidation in sliced turkey meat. *Eur. Food Res. Technol.* 228:433–440.
- Estévez, M., D. Morcuende, S. Ventanas, and J. Ventanas. 2012a. Oxidación de proteínas cárnicas (I): importancia científica y tecnológica. *Eurocarne* 208:56–65.
- Estévez, M., D. Morcuende, and S. Ventanas. 2009. Determination of oxidation. In: L. M. L. Nollet and F. Toldrá, editors. *Handbook of Muscle Foods Analysis*. CRC Press. E.E.U.U. p. 221–239.

- Estévez, M., V. Parra, A. Villaverde, and M. Utrera. 2012b. Oxidación de proteínas cárnicas (II): estrategias antioxidantes. *Eurocarne* 212:88–94.
- Estévez, M. 2011. Protein carbonyls in meat systems: a review. *Meat Sci.* 89:259–79.
- Fàbregas, X. 2002. Producción , calidad y consumo de carnes equinas en España. *Eurocarne* nº110 Octu:1–5.
- FAO. 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat. Food Agric. Organ. United Nations. Faostat. Available from: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E>
- Franco, D., M. Fernández, S. Temperán, L. García, and J. M. Lorenzo. 2011. Calidad de la canal del potro gallego de monte. *Arch. Zootec.* 60:385–388.
- Gallo, M., R. Ferracane, and D. Naviglio. 2012. Antioxidant addition to prevent lipid and protein oxidation in chicken meat mixed with supercritical extracts of *Echinacea angustifolia*. *J. Supercrit. Fluids* 72:198–204.
- Gobierno-Navarra. 2016. Coyuntura agraria. Enero 349.
- Gómez, M., and J. M. Lorenzo. 2012. Effect of packaging conditions on shelf-life of fresh foal meat. *Meat Sci.* 91:513–20.
- Greene, B. E., and T. H. Cumuze. 1982. Relationship between TBA numbers and inexperienced panelist's assessments of oxidized flavor in cooked beef. *J. Food Sci.* 47:52–58.
- Jayathilakan, K., K. Sultana, K. Rdhakrishna, and G. K. Sharma. 2009. Lipid oxidation and its control in meat and meat products - a review.pdf. *Indian Food Ind.* 28:17–31.
- Lagerstedt, A., K. Lundström, and G. Lindahl. 2011. Influence of vacuum or high-oxygen modified atmosphere packaging on quality of beef *M. longissimus dorsi* steaks after different ageing times. *Meat Sci.* 87:101–106.
- Lillig, C. H., C. Berndt, and A. Holmgren. 2008. Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1780:1304–1317.
- Liu, Z., Y. L. Xiong, and J. Chen. 2010. Protein oxidation enhances hydration but suppresses water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *J. Agric. Food Chem.* 58:10697–10704.
- López, F., G. Martínez, and F. Segovia. 2014. Evaluación de la oxidación lipídica mediante el test del TBA : Método de destilación. Univ. Politècnica València.
- Lorenzo, J. M., R. Batlle, and M. Gómez. 2014a. Extension of the shelf-life of foal meat with two

- antioxidant active packaging systems. *LWT - Food Sci. Technol.* 59:181–188.
- Lorenzo, J. M., and M. Gómez. 2012. Shelf life of fresh foal meat under MAP, overwrap and vacuum packaging conditions. *Meat Sci.* 92:610–8.
- Lorenzo, J. M., and M. Pateiro. 2013. Influence of type of muscles on nutritional value of foal meat. *Meat Sci.* 93:630–638.
- Lorenzo, J. M., M. V. Sarriés, A. Tateo, P. Polidori, D. Franco, and M. Lanza. 2014b. Carcass characteristics, meat quality and nutritional value of horsemeat: A review. *Meat Sci.* 96:1478–1488.
- Lund, M. N., M. Heinonen, C. P. Baron, and M. Estévez. 2011. Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 55:83–95.
- Lund, M. N., R. Lametsch, M. S. Hviid, O. N. Jensen, and L. H. Skibsted. 2007. High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. *Meat Sci.* 77:295–303.
- Magrama. 2003. Estudio y Caracterización del Sector Equino en España. :1–298.
- Magrama. 2016. Magrama: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente. Magrama:1–2. Available from: http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/caballo_tcm7-315385.pdf
- Navarro, G., L. Bringas-Alvarado, and R. Pacheco-Aguilar. 2004. Nueva Herramienta para el Estudio de la Oxidación de los Ácidos Grasos. *Av. en Nutr. Acuícola VII*:480–503.
- Oliver, C. N., B. W. Ahn, E. J. Moerman, S. Goldstein, and E. R. Stadtman. 1987. Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* 262:5488–5491.
- ONIBEV. 1979. Catalogue de Classement des Équidés (en carcasse).
- Papadima, S. ., I. Arvanitoyannis, J. . Bloukas, and G. . Fournitzis. 1999. Chemometric model for describing Greek traditional sausages. *Meat Sci.* 51:271–277.
- Rojano, B., C. Gaviria, and J. Sáez. 2008. Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Vitae*:212–218. Available from: [http:](http://)
- Rossier, E. 1993. Horse meat. *Encycl. Food Sci. Food Technol. Nutr.*:3174–3178.
- Rowe, L. J., K. R. Maddock, S. M. Lonergan, and E. Huff-Lonergan. 2004. Influence of early

postmortem protein oxidation on beef quality. *J. Anim. Sci.* 82:785–793.

Sainz, H., A. Sanz, J. Aguado, and V. J. M. Cerdeño. 2016. Alimentación en España 2015. *Mercasa* 18:208.

Salminen, H., M. Estevez, R. Kivikari, and M. Heinonen. 2006. Inhibition of protein and lipid oxidation by rapeseed, camelina and soy meal in cooked pork meat patties. *Eur. Food Res. Technol.* 223:461–468.

Sarriés, M. V., and M. J. Beriain. 2005. Carcass characteristics and meat quality of male and female foals. *Meat Sci.* 70:141–152.

Sarriés, M. V., B. E. Murray, D. Troy, and M. J. Beriain. 2006. Intramuscular and subcutaneous lipid fatty acid profile composition in male and female foals. *Meat Sci.* 72:475–485.

Sarriés, M. V., M. Ruiz Darbonnens, M. J. Beriain Apesteguía, and A. Pérez de Muniáin Ortigosa. 2014. Evolución de la calidad de la carne de potro con el tiempo de conservación. *Navarra Agrar.* septiembre:37–42.

Sell, D. R., C. M. Strauch, W. Shen, and V. M. Monnier. 2007. 2-Aminoadipic Acid Is a Marker of Protein Carbonyl Oxidation in the Aging Human Skin: Effects of Diabetes, Renal Failure and Sepsis. *Biochem. J.* 404:269–77.

Sierra, V. 2010. Evolución post-mortem de parámetros indicativos de calidad en carne de vacuno: efecto de la raza y el gen de la hipertrofia muscular. Universidad de Oviedo.

Soladoye, O. P., M. L. Juarez, J. L. Aalhus, P. Shand, and M. Estevez. 2015. Protein Oxidation in Processed Meat: Mechanisms and Potential Implications on Human Health. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14:106–122.

Tarladgis, B. G., B. M. Watts, M. T. Younathan, and L. Dugan Jr. 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 37:44–48.

Tateo, A., P. De Palo, E. Ceci, and P. Centoducati. 2008. Physicochemical properties of meat of Italian Heavy Draft horses slaughtered at the age of eleven months. *J. Anim. Sci.* 86:1205–1214.

Tenas, J. 2012. Efecto de la inclusión de distintas fuentes de grasa en la dieta y de la congelación sobre la calidad de la carne de cerdo. Universidad de Zaragoza.

Utrera, M., and M. Estévez. 2013. Oxidative damage to poultry, pork, and beef during frozen storage through the analysis of novel protein oxidation markers. *J. Agric. Food Chem.* 61:7987–

7993.

Utrera, M., D. Morcuende, and M. Estévez. 2014. Temperature of frozen storage affects the nature and consequences of protein oxidation in beef patties. *Meat Sci.* 96:1250–1257.

Villaverde, A., J. Ventanas, and M. Estévez. 2014. Nitrite promotes protein carbonylation and Strecker aldehyde formation in experimental fermented sausages: Are both events connected? *Meat Sci.* 98:665–672.

Vuorela, S., H. Salminen, M. Mäkelä, R. Kivikari, M. Karonen, and M. Heinonen. 2005. Effect of Plant Phenolics on Protein and Lipid Oxidation in Cooked Pork Meat Patties. *J. Agric. Food Chem.* 53:8492–8497.

Vyncke, W. 1975. Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L). *Fette Seifen Anstichm* 77:239–240.

Wood, J. D., M. Enser, A. V. Fisher, G. R. Nute, P. R. Sheard, R. I. Richardson, S. I. Hughes, and F. M. Whittington. 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci.* 78:343–358.

Xiao, S., W. G. Zhang, E. J. Lee, C. W. Ma, and D. U. Ahn. 2011. Lipid and Protein Oxidation of Chicken Breast Rolls as Affected by Dietary Oxidation Levels and Packaging. *J. Food Sci.* 76:612–617.

Xiong, Y. L. 2000. Protein Oxidation and Implications for Muscle Food Quality. In: C. F. & C. J. Lopez-B. In E.A. Decker, editor. *Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality*. New York: Wiley. p. 85–111.

Zakrys, P. I., S. A. Hogan, M. G. O’Sullivan, P. Allen, and J. P. Kerry. 2008. Effects of oxygen concentration on the sensory evaluation and quality indicators of beef muscle packed under modified atmosphere. *Meat Sci.* 79:648–655.

Zakrys, P. I., M. G. O’Sullivan, P. Allen, E. E. O’Neill, and J. P. Kerry. 2010. Investigation of the effects of commercial carcass suspension (24 and 48 h) on meat quality in high oxygen modified atmosphere packed beef steaks during chill storage. *Food Res. Int.* 43:277–284.

Zakrys, P. I., M. G. O’Sullivan, E. E. O’Neill, and J. P. Kerry. 2012. The effects of high oxygen modified atmosphere packaging on protein oxidation of bovine *M. longissimus dorsi* muscle during chilled storage. *Food Chem.* 131:527–532.