

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos



TESIS DOCTORAL

Aprovechamiento de derivados de tomate, como fuente de licopeno, en productos cárnicos tradicionales y tratados con radiaciones ionizantes

Use of tomato derivatives as a source of lycopene in conventional and e-beam treated meat products

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María del Carmen Gámez Losada

Directores

M^a Dolores Selgas Cortecero
M^a Luisa García Sanz
Marta María Calvo Rodríguez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**APROVECHAMIENTO DE DERIVADOS DE TOMATE,
COMO FUENTE DE LICOPENO, EN PRODUCTOS
CÁRNICOS TRADICIONALES Y TRATADOS CON
RADIACIONES IONIZANTES**

**USE OF TOMATO DERIVATIVES AS A SOURCE OF
LYCOPENE IN CONVENTIONAL AND E-BEAM
TREATED MEAT PRODUCTS**

Memoria que, para optar al grado de Doctor, con mención honorífica de “Doctorado Europeo”, presenta la Licenciada María del Carmen Gámez Losada



Departamento de Nutrición, Bromatología y
Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

M^a DOLORES SELGAS CORTECERO, Catedrático del Tecnología de los Alimentos y
M^a LUISA GARCÍA SANZ, Profesor Titular de Tecnología de los Alimentos, ambas
profesoras de este Departamento y MARTA MARÍA CALVO RODRÍGUEZ,
Investigador Científico del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición del
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Aprovechamiento de derivados de tomate, como
fuente de licopeno, en productos cárnicos tradicionales y tratados con radiaciones
ionizantes” presentada por María del Carmen Gámez Losada, Licenciada en Ciencia y
Tecnología de los Alimentos, para optar al grado de Doctor con mención honorífica de
“Doctorado Europeo”, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y
Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense
de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben y autorizan su presentación para
que pueda ser juzgada por el tribunal que se nombre a tal fin.

Madrid, a 24 de Abril de 2017.

Las Directoras de la Tesis Doctoral,

M^a Dolores Selgas Cortecero

M^a Luisa García Sanz

Marta María Calvo Rodríguez



Departamento de Nutrición, Bromatología y
Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

El trabajo experimental que ha dado lugar a esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid financiado mediante los proyectos de investigación:

Programa CONSOLIDER-Ingenio 2010, Ref. CSD 2007-00016: “Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables”.

Acción 4: Diseño de productos cárnicos funcionales saludables y nutritivos con especial mención a embutidos y otros productos curados (Acrónimo FUNCIOCA).

Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT). Ref. AGL2007-6366/A4: “Ingredientes funcionales en matrices cárnicas: viabilidad tecnológica, disponibilidad y efecto de la aplicación de tecnologías emergentes”.

Beca predoctoral de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia. Ref. BES-2008-002473.

Ayuda asociada a la beca predoctoral para la realización de una estancia breve en Italia dentro del programa de becarios predoctorales de Formación de Personal Investigador.

Grupo de Investigación “Tecnología de Alimentos de Origen Animal” (TECNOLALIMA). Programa de Creación y Consolidación de Grupos de Investigación Banco Santander Central Hispano-Universidad Complutense (BSCH-UCM). Ref. BSCH-UCM nº 920276 Ref GR3/14.

A mis queridos padres

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que han contribuido al desarrollo de esta tesis y a ti que ahora mismo lo estas leyendo y formas parte de todo esto.

En primer lugar a mis tutoras de la tesis las profesoras M^a Dolores Selgas y M^a Luisa García y la doctora Marta Calvo. En primer lugar agradeceros el haberme seleccionado para optar a la beca FPI con la que pude realizar mis investigaciones y también daros mi más profundo agradecimiento por vuestra enorme paciencia y por vuestro cariño, por vuestros consejos y en general por haber hecho más fácil lo difícil.

Al resto de profesores y personal del Departamento, que siempre me han ofrecido una sonrisa y unas palabras de ánimo, por haberme hecho sentir parte de este gran equipo de trabajo, en especial al Prof. Lorenzo de la Hoz del que guardo un grato y cariñoso recuerdo.

A la Dra. Palozza, por aceptarme en su equipo de trabajo, y haberme guiado y enseñado en el maravilloso mundo de las células. Siempre recordaré sus palabras de ánimo, y su ayuda; descansen en paz. A mi compi de laboratorio Assunta, por haber tenido tanta paciencia conmigo al enseñarme a trabajar con unas técnicas que no conocía. Grazie Assun.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a **Xavi** e **Irene**. Gracias a Xavi por los momentos, las placas, las centrífugas, en general las risas que nos hemos echado. A Irene por haberme ayudado tanto los años que estuvimos juntas, por todos los ánimos que me has dado, por todos los recuerdos que tenemos y tendremos juntas, esta tesis es tan tuya como mía. Me llevo dos grandes amigos del “labo”.

A mis amigas doctoras **Paula y Laura**, siempre me habéis animado mucho, incluso en los momentos de bajón, de esto es imposible, no puedo más.....GRACIAS CHICAS. También a mis amigas no doctoras, por toda la paciencia que habéis tenido conmigo estos últimos meses. Gracias **Sara, Mai, Pili y Ana** por escucharme, por sacarme una sonrisa y por vuestro apoyo.

A mis compañeros de viaje, por estar siempre conmigo aunque algunos ya no estén aquí.

A mis **padres**, por haberme “aguantado” tantos malos humores, tantos malos ratos que al fin ven su fruto. A mi padre por sus ánimos, y la confianza que siempre he sentido que ha depositado en mí. A mi madre, por serlo todo para mí y sentir como tuyas cada una de las palabras que he escrito en esta Tesis.

A **Guillermo**, por compartirlo todo conmigo, por escucharme hablar de licopeno, irradiación, alimentos funcionales...Por aconsejarme, por apoyarme, por el soporte tecnológico, por darme palabras de aliento, por ofrecerme siempre tú ayuda con una sonrisa, por aguantarme y por quererme. Esta tesis también es tuya.

ÍNDICE

	Índice
RESUMEN	1
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Alimentos funcionales	15
1.1.1. Breve reseña histórica	15
1.1.2. Diseño de alimentos funcionales	17
1.1.3. Productos cárnicos funcionales	18
1.1.4. Obtención de compuestos bioactivos a partir de excedentes y de subproductos de la industria alimentaria	21
1.1.5. Declaraciones de salud. Legislación vigente	24
1.2. Carotenoides	27
1.2.1. Propiedades químicas	29
1.2.2. Isomerización y degradación de carotenoides	29
1.2.3. Métodos de extracción y cuantificación de carotenoides	32
1.3. El licopeno	33
1.3.1. Fuentes de licopeno	35
1.3.2. Mecanismo de acción biológica	35
1.3.3. Licopeno y salud	39
1.3.4. Estabilidad del licopeno	41
1.3.5. Metabolismo y distribución del licopeno	42
1.3.6. Biodisponibilidad del licopeno	43
1.3.7. Alimentos enriquecidos en licopeno	45
1.4. Alimentos listos para el consumo	46
1.5. Tratamientos no térmicos utilizados en la industria alimentaria	49
1.5.1. Radiaciones ionizantes	51
1.5.1.1. Legislación relativa al tratamiento de irradiación	52
1.5.1.2. Influencia de la irradiación en los microorganismos	55
1.5.1.3. Influencia de la irradiación en las propiedades físico-químicas de los alimentos	57
1.5.1.4. Ventajas e inconvenientes del uso de radiaciones ionizantes	59
1.5.1.5. Aceptación del consumidor de los alimentos irradiados	60

	Índice
1.6. Productos cárnicos irradiados	61
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	65
3. MATERIAL Y MÉTODOS	71
3.1. Material general de laboratorio y Planta Piloto	73
3.1.1. Material general	73
3.1.2. Material de la Planta Piloto	74
3.1.2.1. Material utilizado para la elaboración de los derivados de tomate	74
3.1.2.2. Material utilizado para la elaboración de los productos cárnicos	75
3.1.3. Material y reactivos utilizados para la cuantificación del licopeno y sus isómeros. Determinación de la actividad antioxidante	75
3.1.4. Reactivos, disolventes y medios de cultivo	76
3.1.5. Material biológico	77
3.2. Métodos	78
3.2.1. Obtención de los derivados de tomate	78
3.2.2. Elaboración de productos cárnicos	79
3.2.2.1. Elaboración de productos cárnicos frescos	79
3.2.2.2. Cocinado de los productos cárnicos frescos	80
3.2.2.3. Elaboración de productos cárnicos madurados	80
3.3. Tratamiento de irradiación	81
3.4. Técnicas analíticas	83
3.4.1. Determinación de la actividad de agua (a_w)	83
3.4.2. Determinación del pH	83
3.4.3. Recuentos microbiológicos	84
3.4.4. Extracción y cuantificación del licopeno	84
3.4.4.1. Extracción del licopeno con disolventes orgánicos	84
3.4.4.2. Cuantificación de licopeno	85
3.4.4.2.1. Método espectrofotométrico	86
3.4.4.2.2. Método cromatográfico (HPLC)	86
3.4.5. Determinación del color	87

3.4.6. Análisis de textura	89
3.4.7. Análisis sensorial	91
3.4.7.1. Preparación de las muestras	91
3.4.7.2. Prueba Hedónica	92
3.4.8. Determinación de la actividad antioxidante del licopeno	95
3.4.8.1. Preparación de los extractos de licopeno a partir de los derivados del tomate	95
3.4.8.2. Ensayos con la línea celular RAT-1	95
3.4.8.3. Cuantificación de las especies reactivas de oxígeno	96
3.4.8.4. Análisis de la expresión de las proteínas indicadoras de estrés celular mediante la técnica de Western blot	97
3.4.8.4.1. Preparación de la muestra	97
3.4.8.4.2. Transferencia de las proteínas indicadoras de estrés celular	97
3.4.8.4.3. Bloqueo de la membrana	98
3.4.8.4.4. Detección de las proteínas indicadoras del estrés celular	98
3.4.8.4.5. Cuantificación de las proteínas indicadoras del del estrés celular	99
3.4.8.5. Cuantificación del factor de transcripción NF- κ B	100
3.4.8.6. Cuantificación de la subunidad p65	101
3.4.9. Accesibilidad del licopeno	101
3.4.10. Análisis estadístico	103
4. RESULTADOS	105
4.1. Irradiation of Ready To Eat sausages containing lycopene	107
4.2. Effect of E-beam treatment on the chemistry and on the antioxidant activity of lycopene from dry tomato peel and tomato powder	119
4.3. Tomato powder low in serum as a source of lycopene to meat products	129
4.4. E-beam treatment to extend the shelf-life of meat products containing low serum tomato powder	137
4.5. <i>In vitro</i> accessibility of lycopene added to Ready To Eat meat products	153

5. DISCUSIÓN INTEGRADORA	163
5.1. Viabilidad tecnológica y sensorial de productos cárnicos enriquecidos con licopeno	168
5.1.1. Obtención de los derivados de tomate e incorporación a los productos cárnicos	168
5.1.2. Características físico-químicas de los productos cárnicos	169
5.1.3. Cambios en la concentración de licopeno en los productos cárnicos	169
5.1.4. Color	172
5.1.5. Textura	174
5.1.6. Calidad sensorial	175
5.2. Capacidad antioxidante del licopeno	177
5.3. Accesibilidad del licopeno	180
6. CONCLUSIONES	183
6. CONCLUSIONS	187
7. BIBLIOGRAFÍA	191

RESUMEN

La industria del procesado del tomate tiene gran peso en la economía española debido a la alta producción de tomates a nivel nacional; sin embargo, genera grandes cantidades de excedentes y residuos ricos en compuestos bioactivos, como el licopeno, poseedor de un gran potencial antioxidante que le confiere efectos beneficiosos para la salud. El aprovechamiento de dichos subproductos como fuente de ingredientes funcionales, supondría una importante reducción en el gasto de las industrias procesadoras de tomate y evitaría graves problemas medioambientales.

En los últimos años se están realizando grandes esfuerzos destinados a mejorar los productos cárnicos existentes y a lanzar al mercado otros nuevos en los que la composición se haya modificado de alguna manera con el fin de que el producto resultante se ciña más a las nuevas orientaciones nutricionales. Una posible vía para poder llevar a cabo esta demanda, sería enriquecer a los productos cárnicos en compuestos bioactivos, convirtiéndolos en alimentos funcionales.

Estos nuevos productos cárnicos deberían adaptarse a las demandas del consumidor y al ritmo de vida de la sociedad actual, lo que lleva consigo la aparición de productos que puedan ser consumidos en poco tiempo, prácticamente sin tratamiento culinario y que, a la vez, sean nutritivos e higiénicamente seguros; estos alimentos son los conocidos como Listos para el Consumo o Ready To Eat (RTE). La preparación de dichos alimentos conlleva manipulaciones posteriores al procesado tradicional que favorecen el riesgo potencial de una contaminación microbiológica. Por este motivo se hace necesario higienizar el producto RTE antes de que llegue al consumidor. Con tal propósito se emplean las tecnologías no térmicas, entre la que se encuentra la irradiación, tecnología segura y avalada por organismos internacionales como: la Food and Agriculture Organization (FAO), la World Health Organization (WHO), la Food and Drug Administration (FDA) y la European Food Safety Authority (EFSA). La aplicación de irradiación conlleva pérdidas mínimas de las características organolépticas y del valor nutritivo. Sin embargo el tratamiento de radiaciones ionizantes y la complejidad de la matriz cárnica pueden comprometer tanto la capacidad funcional del ingrediente añadido como su disponibilidad en el organismo para llevar a cabo la función para la que ha sido diseñado.

Por todo ello, la investigación se ha conducido con un doble objetivo: por una parte diseñar nuevos productos cárnicos funcionales (hamburguesas y salchichones) mediante la incorporación de derivados del tomate (Piel de Tomate Seca, PTS, y Tomate Desuerado y Desecado, TDD) como fuente de licopeno y estudiar su viabilidad como productos RTE

mediante la aplicación de radiaciones ionizantes y por otra, llevar a cabo pruebas encaminadas a conocer si las radiaciones ionizantes comprometen la capacidad antioxidante y la accesibilidad del licopeno procedente de los derivados del tomate estudiados.

La **metodología** empleada de forma resumida fue la siguiente:

Tanto los productos cárnicos enriquecidos como los derivados de tomate se trataron con radiaciones ionizantes (electrones acelerados) en la planta de irradiación IONISOS IBÉRICA S.A. con dosis de 2 y 4 kGy. Se determinaron las características físico-químicas y los atributos del color y textura mediante análisis instrumentales. Las características sensoriales se estudiaron mediante análisis hedónico de los productos cárnicos elaborados. Para el estudio de la capacidad antioxidante del licopeno contenido en los derivados de tomate se empleó un método *in vivo* con la línea celular RAT-1; por una parte se cuantificó de manera directa la cantidad de EROs producidas por las células tratadas con los extractos de licopeno, y por otra parte se estudió la expresión de proteínas y factores de transcripción redox sensibles tales como: ERK, JNK, p38, Nox-4, Cox-2 y el factor NF- κ B. Por último se llevó a cabo el estudio de accesibilidad del licopeno en los productos cárnicos, tanto irradiados como sin irradiar, mediante un método *in vitro* que simulaba el proceso gastrointestinal.

Los **resultados** más relevantes pueden resumirse en los siguientes puntos:

- La cantidad de TDD más adecuada para su incorporación a los productos cárnicos, tanto a nivel tecnológico como sensorial, fue 4 y 1,5% en el caso de los productos frescos y madurados respectivamente. La cantidad de PTS había sido establecida en trabajos previos en 4 y 2% para frescos y madurados respectivamente.

- La adición de PTS y TDD provocó cambios en el color y textura de los productos cárnicos enriquecidos con respecto al lote control. Sensorialmente los lotes peor valorados fueron los que tenían las mayores concentraciones de los derivados de tomate, aunque siempre obtuvieron puntuaciones superiores al límite de aceptabilidad general.

- El tratamiento de irradiación (2 kGy) no modificó significativamente ni el color ni la textura de los productos cárnicos, pero cuando se aplicaron dosis de 4 kGy se observaron cambios sensoriales, sobre todo en olor y sabor, aunque la calidad sensorial mejoró a lo largo del tiempo de almacenamiento. La adición de PTS y TDD a los productos cárnicos podría enmascarar algunas características sensoriales negativas asociadas a la irradiación.

- La aplicación de dosis de irradiación de 2 y 4 kGy amplió la vida útil de los productos cárnicos frescos desde los 5 hasta los 11 y 28 días, respectivamente. En el caso

de los productos cárnicos madurados sus atributos sensoriales se mantuvieron hasta los 120 días.

- La aplicación de electrones acelerados provocó pérdidas en la cantidad de licopeno de los productos cárnicos enriquecidos con TDD de hasta un 15%. En el caso de la PTS no se detectaron pérdidas en las muestras irradiadas. Las diferencias observadas entre ambos derivados podrían estar relacionadas con la resistencia y mayor grosor de las células de la piel de tomate lo que les hace ser menos sensibles al tratamiento de irradiación.

- El licopeno presente en los derivados del tomate presentó una importante actividad antioxidante, siendo mayor en la PTS que en el TDD. La aplicación de electrones acelerados potenció la actividad antioxidante del licopeno y favoreció su isomerización, lo que en términos biológicos supone una mayor capacidad antioxidante.

- Ni la irradiación ni el tipo de derivado de tomate añadido influyeron en la accesibilidad del licopeno, sin embargo sí lo hizo el tipo de producto cárnico. Así, en los madurados la accesibilidad fue mayor debido a que poseen un mayor contenido en grasa, lo que estimula la absorción del licopeno.

- El consumo de los productos cárnicos aquí diseñados contribuiría a incrementar la ingesta diaria de licopeno. Así, 100 g de hamburguesa con TDD aportaría entre 4,3-11,7 mg de licopeno dependiendo de la cantidad añadida; y el consumo de 100 g de salchichón con PTS o TDD aportaría entre 1,2-2.1 mg, respectivamente.

Como conclusión general podría decirse que los productos cárnicos aquí diseñados constituyen una nueva vía para aumentar el consumo de licopeno en la dieta, incluso cuando se presentan en formato RTE. De acuerdo con el Reglamento (UE) N° 1924/2006 los productos desarrollados podrían ser considerados como fuente de licopeno, encontrándonos en consecuencia, con nuevos alimentos adecuados para vehicular en la dieta este antioxidante.

SUMMARY

The industrial transformation of tomato has great effect on the Spanish economy due to the extent of its cultivation, but in general terms it generates large quantities of surplus and waste that are rich in bioactive compounds such as lycopene, a compound which possesses great antioxidant potential that has beneficial effects to health. The use of these tomato byproducts as a source of functional ingredients would entail a significant reduction in the expenditure of tomato processing industries and would avoid serious environmental problems.

In recent years, great efforts have been made to improve existing meat products and to introduce new ones on the market in which the composition has been modified in some way so that the resulting product is more in line with the new nutritional guidelines. One possible way to carry out this demand would be to enrich meat products in bioactive compounds, turning them into functional foods.

These new meat products should be adapted to the demands of the consumer and to the lifestyle of the present society, which would lead to the appearance of products that can be consumed in a short time, practically without culinary treatment, while being nutritious and hygienically safe. These foods are known as Ready to Eat (RTE). Their manufacture implies a manipulation that could be associated with the potential risk of microbiological contamination.

For that reason, it is necessary to apply an additional treatment to guarantee the microbiological quality before it reaches the consumer. One of the best options is the use of non-thermal technologies, such as the irradiation treatment which is a safe technology and is endorsed by Food and Agriculture Organization (FAO), World Health Organization (WHO), Food and Drug Administration (FDA), and European Food Safety Authority (EFSA); in addition it entails minimal losses of organoleptic and nutritional value. However, both the application of ionizing radiation and the complex meat matrix could compromise the functional capacity of the added ingredient and its availability in the organism to carry out the function for which it was designed.

Therefore, the research has been conducted with a double objective: on the one hand to design new functional meat products (hamburgers and dry fermented sausages) by incorporating tomato derivatives (Dry Tomato Peel, DTP, and Low Serum Tomato Powder, LSTP) as a source of lycopene and to study its viability as a RTE product using E-beam irradiation; on the other hand to carry out tests aimed to study whether ionizing radiations compromise the antioxidant ability and accessibility of lycopene from tomato derivatives.

The **methodology** used was summarized as follows:

Both meat products and tomato derivatives were treated with accelerated electrons in the IONISOS IBÉRICA plant at doses of 2 and 4 kGy. Physical-chemical characteristics, color and texture attributes were determined through instrumental analysis. Sensory properties were studied through hedonic analysis of processed meat products. To study the antioxidant capacity of lycopene contained in tomato derivatives, an *in vivo* method was used with the RAT-1 cell line; on the one hand the amount of EROs produced by the cells treated with lycopene extracts was directly quantified, and on the other hand the expression of sensible redox proteins such as ERK, JNK, p38, Nox-4, Cox-2 and transcription factor NF- κ B. Finally, the accessibility study of lycopene was carried out on both irradiated and non-irradiated meat products by an *in vitro* method, which simulated the gastrointestinal process.

The **most relevant results** are summarized as following:

- The amount of LSTP most suitable for incorporation into meat products technologically and sensorially was 4 and 1.5% for fresh and dry fermented sausages respectively. The amount of DTP was determined in previous works in 4 and 2% respectively.

- The incorporation of DTP and LSTP caused changes in the color and texture of the enriched meat products with respect to the control batch. Sensorially, the lowest punctuations corresponded to the batches with the highest tomato derivative concentrations, but their scores were always higher than the general acceptability limit.

- The irradiation treatment (2 kGy) did not modify the color or texture of the meat products, but when 4 kGy doses were applied sensorial changes were observed, mainly in smell and taste, although the sensorial quality improved throughout the storage time. The addition of PTS and TDD to meat products could mask some negative sensory characteristics associated with irradiation.

- The irradiation treatment extended the shelf-life of hamburgers from 5 to 11 and 28 days at doses of 2 and 4 kGy respectively. The sensory characteristics of sausages were maintained up to 120 days.

- The application of E-beam treatment caused losses of the amount of lycopene of meat products with LSTP up to 15%. In the case of the DTP no losses were detected in the irradiated samples. These differences between DTP and LSTP could be related to the resistance and greater thickness of tomato peel cells which makes them less sensitive to irradiation treatment.

- Lycopene present in tomato derivatives had an important antioxidant activity, being higher in DTP than in LSTP. This activity was enhanced by the irradiation treatment due to the isomerization of lycopene, which in biological terms supposes a greater antioxidant capacity.

- Neither the irradiation nor the type of tomato derivative added influenced the accessibility of lycopene, however the type of meat product did. Dry fermented sausages had higher values of accessibility due to its higher fat content, which stimulates the absorption of lycopene.

- The consumption of meat products with tomato derivatives would contribute to increase the daily intake of lycopene. Thus, 100 g of fresh meat products with LSTP would provide between 4.3-11.7 mg of lycopene depending on the amount added; and 100 g of dry fermented sausages with DTP or LSTP would contribute between 1.2-2.1 mg, respectively.

As a **general conclusion**, it could be said that the products designed could be considered a new way to increase the consumption of lycopene in the diet, even when it was presented as RTE. According to Regulation (EU) N° 1924/2006 developed products could be considered as a source of lycopene, finding us consequently, with new foods suitable to provide this antioxidant in the diet.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alimentos funcionales

1.1.1. Breve reseña histórica

Desde la Prehistoria, sin ser consciente de ello, el hombre sabía que hay una relación estrecha entre la alimentación y la salud. Bien es cierto que comía para alimentarse, no para nutrirse, pero sabía que algunas comidas les hacían sentir bien y que algunas plantas curaban. De hecho, en algunos restos arqueológicos se ha comprobado que la incidencia de enfermedades carenciales en las sociedades cazadoras-recolectoras era muy baja.

Sin embargo con el descubrimiento del fuego, de la agricultura, del pastoreo y el refinamiento de algunos alimentos comenzaron a aparecer enfermedades carenciales y ya se referencian por escrito intoxicaciones de origen alimentario (Moreno, 2000).

Las primeras referencias que hablan de la relación dieta-salud aparecen en la Grecia clásica cuando se introduce el término “*díaita*”, nuestra actual Dietética, para referirse al “conjunto de hábitos del cuerpo y del alma que constituyen la actividad vital del hombre”. Pitágoras, (584-504 a. C.) considerado el padre de la Dietética, preconizaba un régimen alimentario basado en miel, pan de mijo o torta de cebada y verdura cruda o cocida, con el que pretendía alcanzar objetivos morales, no enfermar y que no se modificase el peso corporal. A finales del siglo V a. C., la Dietética perdió el sentido moral y se potenció la importancia de la salud. Los preceptos médicos de esta época se deben a Hipócrates (460-377 a. C.) quien escribió: “deja que la comida sea tu medicina y la medicina será tu comida”. Entendía la salud como un equilibrio entre lo que nutre (los alimentos) y lo que desgasta (el ejercicio). No existía una dieta ideal, sino que debía ser diseñada de acuerdo a las características de cada individuo y de su entorno.

Los postulados hipocráticos tuvieron vigencia hasta el alto medievo. Desde el siglo XII hasta el XVI, se mantuvo en Occidente una nueva corriente de pensamiento cuyos principios básicos eran la necesidad y la uniformidad de los alimentos. A finales del siglo XVIII, el químico francés Lavoisier y el físico Laplace se interesaron por los fenómenos químicos que acaecen en el ser vivo y determinaron que “la respiración es una combustión”. Posteriormente, establecieron que la producción de calor en cualquier animal, incluyendo al hombre, obedece a las mismas leyes que el resto de los fenómenos de la naturaleza (Mikelsen, 1967).

La inclusión de los alimentos en las ciencias modernas se produjo a finales del siglo XIX y principios del XX. Así, en 1842, Liebig clasificó los alimentos en tres tipos: combustibles, estructurales y reguladores (Moreno, 2000).

Una de las contribuciones más importantes originadas en el siglo XX referente a la dieta fue el concepto de “dieta equilibrada”, definida por James y col. (1988) como “una mezcla apropiada de alimentos que proporciona los requerimientos mínimos de nutrientes y otros componentes necesarios para el crecimiento y mantenimiento del peso corporal, con el fin de prevenir enfermedades causadas por sus deficiencias y reducir el riesgo de las asociadas a excesos”.

Hoy en día esta idea se ha superado y se ha introducido con fuerza el término “nutrición óptima” en el sentido de que la dieta no solo es importante como aporte de los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades metabólicas, sino que también puede jugar un papel importante en la reducción del riesgo de padecer determinadas enfermedades (Diplock, 1999; Roberfroid, 2000).

La sociedad actual tiene más información en materia de nutrición y, por tanto, es más exigente; sus expectativas son obtener de los alimentos efectos beneficios para la salud y así tener una mayor calidad de vida (Diplock, 1999). En este contexto apareció el concepto de alimento funcional (Hasler, 1998; Arai, 2000).

El término “alimento funcional” surgió por primera vez en Japón, en la década de los 80 se hablaba de ellos como “productos fortificados con un compuesto especial que poseen ventajas fisiológicas” (Hardy, 2000; Kwak y Jukes, 2001; Stanton y col., 2005). A partir de ese momento se desarrollaron muchas definiciones hasta llegar a 1994, año en el que el Instituto de Medicina de la Academia Nacional de las Ciencias en Estados Unidos presentó una de las definiciones más ampliamente aceptadas; los definió como “aquellos en los que las concentraciones de uno o más ingredientes han sido manipulados para ensalzar su contribución a una dieta saludable” (Food and Nutrition Board, 1994).

En 1996, se desarrolló en Europa la Acción Concertada FUFOSE, coordinada por el Internacional Life Sciences Institute (ILSI) y se alcanzó de forma consensuada la siguiente definición “un alimento puede ser denominado alimento funcional si se demuestra de forma satisfactoria que afecta de forma beneficiosa a una o más funciones del organismo, más allá de los efectos nutricionales propios, de manera que sea relevante para ellos mejorar el estado de salud y/o disminuir el riesgo de enfermedad”. Así mismo se estableció que un alimento funcional no debe ser ni un medicamento ni un complemento dietético, debe formar parte de un patrón normal de alimentación y se han debido demostrar sus

efectos beneficiosos en cantidades en las que se consuma de forma habitual en una dieta (Diplock, 1999).

Más recientemente, en 2007, el Food Quality and Standards Service (AGNS) y la Food and Agriculture Organization (FAO) los definieron como “aquellos alimentos que están destinados a ser consumidos como parte de una dieta convencional y que contienen componentes biológicamente activos que ofrecen la posibilidad de mejorar la salud o de reducir el riesgo de patologías crónicas” (AGNS/FAO, 2007). Hoy en día es una de las definiciones más aceptadas.

1.1.2. Diseño de alimentos funcionales

El diseño de un alimento funcional es un proceso complejo ya que no solo hay que tener en cuenta cuál es el efecto fisiológico que estamos buscando y cómo lo podemos conseguir, también hay que considerar que el alimento sea lo más parecido posible al homólogo convencional. Para ello se han desarrollado diferentes estrategias (Ashwell, 2002):

- Eliminación de algún componente que se encuentre de forma natural en el alimento y que puede causar algún perjuicio al consumidor, como grasa, proteínas del gluten o colesterol.

- Adición o modificación de la cantidad de un componente presente en el alimento, como la adición de calcio a la leche o de ácido fólico a los cereales del desayuno.

- Sustitución de un componente por otro; por ejemplo utilizar sustitutos de grasa o azúcar en los alimentos hipocalóricos o de sal común en los hiposódicos.

- Alteración de la biodisponibilidad con el claro ejemplo de la adición de fitoesteroles para reducir la absorción de colesterol.

Independientemente de la estrategia seguida, el efecto beneficioso debe demostrarse científicamente y tiene que ser relevante desde una perspectiva clínica/fisiológica/biológica. Por ello, el desarrollo de los alimentos funcionales debe ir acompañado de numerosos y rigurosos estudios que permitan conocer si actúan de la forma en la que se espera (Olmedilla y Granado, 2004). Con este fin hoy en día se dispone de diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* cada vez más efectivos que permiten comprobar no solo su eficacia biológica sino además, su posible toxicidad.

Por último, la industria de los alimentos debe tener en cuenta la opinión y expectativas de los consumidores frente a un nuevo alimento funcional ya que si asumen

que los alimentos son una fuente de salud, asumirán también que se refuerce su valor nutritivo con compuestos bioactivos como minerales, vitaminas y otros (Siró y col., 2008).

1.1.3. Productos cárnicos funcionales

Históricamente el consumo de carne, más que el de otros alimentos, se ha asociado al grado de desarrollo de un país. Desde el punto de vista nutricional, la carne es rica en proteínas (20-25%) de alto valor biológico y además contiene minerales y vitaminas de gran relevancia para el organismo (Chan, 2004).

Su contenido en grasa, sobre todo en las carnes rojas, es lo que genera más controversia al haberse relacionado su consumo con la aparición de ciertas enfermedades, como las cardiovasculares, la obesidad y algunos tipos de cáncer (Ruusunen y Puolanne, 2005; Valsta y col., 2005). Autoridades sanitarias como la World Health Organization (WHO) han propuesto un límite de ingesta de grasa total de no más del 30% del total de las calorías ingeridas según género y rango de edad (WHO, 2009). Hay alguna evidencia de menor morbi-mortalidad en vegetarianos, aunque no está claro si es debido a la exclusión de la carne de la dieta o, como parece más probable, a componentes dietéticos o factores del estilo de vida (Jiménez-Colmenero y col., 2012).

Además, el consumo de la carne y sus derivados ha disminuido en los últimos años de una forma llamativa debido a los escándalos sanitarios en los que se han visto envueltos, como carnes con dioxinas, contaminadas con antibióticos, el caso de las vacas locas o la reciente crisis en la que productos cárnicos procesados han sido declarados cancerígenos.

Por ello, la industria cárnica y diferentes grupos de investigadores han focalizado sus esfuerzos en la producción de carnes más saludables, que aumenten sus cualidades positivas y disminuyan las negativas. Este objetivo se puede conseguir por varias vías:

1. Modificación de la composición de la carne

La modificación de la composición puede hacerse mediante la selección de razas y líneas genéticas o cambiando la alimentación de los animales (Fernández-Ginés y col., 2005).

La mejora genética ha sido una herramienta muy importante en la modificación de la composición de la carne. Tomando como ejemplo el ganado porcino, los objetivos de selección genética han evolucionado desde introducir cambios en caracteres propios de la canal, hasta hacerlo en la composición de la carne, sobre todo en modificar la composición lipídica. Así, se han conseguido animales con carne más magra, con menos grasa infiltrada y

más proporción (no necesariamente cantidad) de ácidos grasos insaturados procedente de los piensos (Barroeta y Cortinas, 2004). Introduciendo en el pienso de los animales compuestos ricos en ácidos grasos poliinsaturados como el aceite de linaza (Santos y col., 2016), soja (González y col., 2014) o semillas oleaginosas enteras (Mapiye y col., 2013), se ha conseguido disminuir el contenido en grasa y aumentar el porcentaje de éstos ácidos grasos en la carne y los productos cárnicos. También se ha adicionado minerales como selenio al pienso animal consiguiendo carne con un contenido 10 veces superior al que tiene *per se* (García-Íñiguez de Ciriano y col., 2010; Zhang y col., 2010). Finalmente, mediante técnicas de ingeniería genética se han desarrollado cerdos (Lai y col., 2006; Tang y col., 2014) o conejos transgénicos (Zhang y col., 2016) con carnes ricas en ácidos grasos poliinsaturados n-3.

2. Incorporación de compuestos bioactivos

Una de las estrategias más importantes y quizás la más utilizada para el desarrollo de productos cárnicos funcionales, es la incorporación de un ingrediente o nutriente de una importancia relevante para la alimentación humana y que ese alimento en concreto no contiene o lo está en cantidades mínimas. Algunos de ellos se presentan a continuación:

- Ácidos grasos poliinsaturados n-3. Mediante la adición de aceites de origen vegetal como aceites de oliva (López-López y col., 2011), de girasol (Mora-Gallego y col., 2016), de lino (Hoz y col., 2003; Alejandre y col., 2016), de pescado (Cáceres y col., 2008; Marchetti, 2014), de nuez (Ayo y col., 2007) y algas (Gupta y Abu-Grannam, 2011); se ha conseguido incrementar la cantidad de estos ácidos grasos en la carne y los productos cárnicos. En la actualidad, y para minimizar las posibles pérdidas de dichos ácidos grasos, muy susceptibles a la oxidación, se pueden incorporar asociados a algún agente antioxidante o protegidos mediante técnicas de encapsulación o mediante nuevas formas de emulsificación como las emulsiones múltiples (Salcedo-Sandoval y col., 2013; Jiménez-Colmenero, 2013).

- Prebióticos. Son ingredientes no digeribles de los alimentos cuyo efecto beneficioso se basa en una estimulación selectiva del crecimiento y/o de la actividad de una o varias bacterias en el colon (Fontecha, 2008). Han sido incorporados con éxito a diferentes alimentos, entre ellos los productos cárnicos. Así García y col. (2007) incorporaron fibras procedentes de frutas a productos cárnicos cocidos, Menegas y col. (2013) y Keenan y col. (2014) añadieron inulina a productos cárnicos madurados y Angiolillo y col. (2015) adicionaron fructooligosacáridos a productos cárnicos frescos.

- Probióticos. El término de probiótico hace referencia a los microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas, tienen efectos beneficiosos para la salud

(FAO/WHO, 2002; Arihara, 2006) pero no deben inducir cambios físico-químicos, tecnológicos o sensoriales en los alimentos a los que se incorporan (Reyes-Gavilán y col., 2015). La elección de un probiótico no es fácil ya que se debe tener en cuenta su supervivencia a lo largo del tracto gastrointestinal y su posible antagonismo con otras bacterias entéricas (Jayamanne y Adams, 2006). Los más utilizados pertenecen a los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* (Vuyst y col., 2008); *L. casei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* y *B. infantis* son algunas de las especies más utilizadas en la industria cárnica (Krishnakumar y Gordon, 2001; Reyes-Gavilán y col., 2015). Los productos cárnicos madurados son los candidatos más adecuados a la adición de probióticos, ya que para su elaboración no se necesitan tratamientos térmicos (Vuyst y col., 2008). Autores como Vuyst y col. (2008), Khan y col. (2011) y Jimenez-Colmenero y col. (2012) han utilizado con éxito *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, y *L. plantarum* en este tipo de productos cárnico.

- Vitaminas y minerales. Se han incorporado a productos cárnicos vitaminas como la E (Harm y col., 2003) o ácido fólico (Galán y col., 2010, 2011a, 2011b) a productos cárnicos frescos y cocidos con resultados tecnológicos y sensoriales favorables. También se han adicionado minerales como el calcio (Soto y col., 2016), selenio (García-Iñíguez de Ciriano y col., 2010) y zinc (Bou y col., 2004) en todos los casos con buenos resultados.

- Antioxidantes. Su importancia a nivel fisiológico radica en ser compuestos capaces de reducir e inhibir la síntesis o de reaccionar con las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs). Las EROs incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos, que se forman de manera natural como resultado del metabolismo normal del oxígeno. Las EROs son muy importantes por su efecto negativo en procesos metabólicos cuya repercusión puede llegar a afectar negativamente a la salud. El desequilibrio metabólico produce lo se conoce como estrés oxidativo que puede alterar la funcionalidad celular y contribuir, en consecuencia, al desarrollo de enfermedades degenerativas como algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurológicas (Viuda-Martos y col., 2014). Para evitar o minimizar posibles situaciones de estrés oxidativo, las plantas y animales mantienen complejos sistemas de múltiples tipos de compuestos antioxidantes, cuyo papel es neutralizar los radicales libres y, por lo tanto, retrasar o prevenir la oxidación de diferentes sustratos como son lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, evitando así daños moleculares que, en muchos casos, son irreversibles.

Por ello, en la industria alimentaria cada vez está más extendido el uso de antioxidantes, ya sean procedentes de fuentes naturales como las vitaminas E y C (Coronado y col., 2002), o sintéticos como butilhidroxianisol (BHA, E-320),

butilhidroxitolueno (BHT, E-321), *ter*-butilhidroquinona (TBHQ, E-319) y los ésteres de ácido gálico, como el galato de propilo (GP, E-310). También se han obtenido numerosos extractos naturales ricos en compuestos fenólicos (Novelli y col., 2014), como los extractos de romero (Smeti y col., 2013; Bermejo y col., 2014), de tomillo (Van Haute y col., 2016), de melisa (García-Iñíguez de Ciriano y col., 2010), ajo (Revilla y col., 2015), soja (Kruk y col., 2014) o de cítricos (Contini y col., 2014) con notable éxito. Dentro de los antioxidantes naturales, cabe destacar también a los carotenoides; son compuestos responsables del color de un gran número de alimentos vegetales y animales (zanahorias, naranjas, tomates, yema de huevo), presentan una notable actividad antioxidante y alguno de ellos son precursores de la vitamina A. Al ser motivo de estudio de esta Tesis, se hablará más extensamente de ellos en apartados posteriores.

Por último es importante también tener en cuenta que un consumo muy elevado de antioxidantes es perjudicial, pues su actividad pasaría a ser pro-oxidante con sus consiguientes peligros para la salud humana (Stahl y col., 2002).

A modo de resumen de lo comentado anteriormente se detallan algunos compuestos bioactivos y extractos que han sido adicionados a productos cárnicos (**Tabla 1**).

1.1.4. Obtención de compuestos bioactivos a partir de excedentes y de subproductos de la industria alimentaria

La Agencia Europea de Medio Ambiente (AEMA) ha puesto de manifiesto el grave problema que supone la generación continua de residuos, pues puede producir consecuencias irreparables a largo plazo. Su manejo inadecuado puede conllevar problemas ambientales, debido a la contaminación del aire, del agua subterránea o superficial y del suelo.

La legislación actual (Ley 22/2011) exige a las industrias hacerse cargo de la eliminación de estos residuos lo que supone un elevado coste económico. Habitualmente estos subproductos se destinan a la alimentación animal pero actualmente se están invirtiendo muchos esfuerzos en investigar su potencial utilización en la industria alimentaria, lo que podría reducir los costos industriales junto con la consiguiente contribución a la protección del medio ambiente (Lario y col., 2004). Uno de los enfoques que se ha dado a este problema es la obtención de compuestos bioactivos.

Tabla 1. Ejemplos de ingredientes funcionales adicionados a productos cárnicos

Compuestos bioactivos	Producto cárnico	Referencia
Antioxidantes procedentes del romero	Productos cárnicos madurados	Coronado y col., 2002 Martínez y col., 2006 Bermejo y col., 2014
Ácidos grasos poliinsaturados procedentes de aceite de soja	Productos cárnicos madurados	Muguerza y col., 2003
Fibra dietética de diversas fuentes	Productos cárnicos cocidos y madurados	Eim y col., 2008 Sáyago-Ayerdi y col., 2009 Schmiele y col., 2015
Fructooligosacáricos	Productos cárnicos madurados	Salazar y col., 2009
Probióticos	Productos cárnicos madurados	Jiménez-Colmenero y col., 2012
Antioxidantes procedentes del té verde	Productos cárnicos madurados	Neffe-Skocińska y col., 2015
Calcio	Productos cárnicos madurados	Soto y col., 2016
Antioxidantes procedentes de la uva	Productos cárnicos frescos	Carpenter y col., 2007 Tournour y col., 2016
Zinc	Productos cárnicos frescos	Bou y col., 2004
Ácidos grasos poliinsaturados n-3	Productos cárnicos frescos	Bermejo y col. 2014
Ácidos grasos monoinsaturados procedentes de aceite de oliva	Productos cárnicos frescos	Venkata-Reddy y col., 2015
Ácidos grasos poliinsaturados procedentes de aceite de girasol	Productos cárnicos frescos	Verma y col., 2016
Antioxidantes procedentes de cebolla	Productos cárnicos cocidos	Tang y Cronin, 2007
Ácidos grasos poliinsaturados procedentes de algas	Productos cárnicos cocidos	López-López y col., 2009
Ácido fólico	Productos cárnicos cocidos	Galán y col., 2011b
Vitamina E	Productos cárnicos cocidos	Jiménez-Colmenero y col., 2012

A continuación se describe el aprovechamiento de algunos subproductos derivados de los residuos y excedentes de diferentes industrias alimentarias:

1. Subproductos de la industria pesquera

De los subproductos de la industria pesquera se pueden obtener compuestos bioactivos como proteínas procedentes de los restos del procesado de filetes de pescado, a partir de las cuales se desarrolló el surimi; aceites obtenidos de las vísceras de los pescados procesados; colágeno procedente de la piel y raspas; quitosano y quitina, obtenidos a partir de los caparzones de crustáceos; mucopolisacáridos obtenidos a partir de los cartílagos o escualeno procedente del hígado de tiburón (Bucio, 2015).

2. Subproductos de la industria cárnica

Entre los subproductos que pueden producirse se encuentran la sangre de la que se extrae el plasma para utilizarlo como ingrediente funcional en productos cárnicos (Toldrá y col., 2012) o también se pueden extraer proteínas como la trombina y el fibrinógeno y utilizarlas como ingredientes alimentarios (Parés y col., 1998); grasa, que puede usarse para el consumo humano o incluso para la fabricación de biodiesel (Pascacio y col., 2016) y huesos y piel, para extraer el colágeno y obtener gelatina (Toldrá y col., 2012). Recientemente Vendrell (2016) ha estudiado el uso de la pezuña del jamón como fuente de péptidos bioactivos.

3. Subproductos hortofrutícolas

Según el World Processing Tomato Council (WPTC, 2015), España ocupa el segundo lugar en producción de frutas y hortalizas dentro de la Unión Europea, por detrás de Italia. La industria hortofrutícola española tiene un gran peso en la economía, debido en gran medida a la exportación, principalmente a los países del centro y norte de Europa. La exportación española de frutas y hortalizas frescas totalizó 6.971.473 toneladas en el primer semestre del año (2015). Según Mercasa (2016) la producción mundial de tomate en 2015 fue de 170 millones de toneladas, en Europa de 17,7 y en España, de 5 millones, siendo la octava productora a nivel mundial.

Las conservas de tomate constituyen el 35,4% de las ventas de las conservas vegetales en España. Este tipo de industrias genera un gran volumen de residuos al año (unas 45.000 toneladas) consistente principalmente en pieles y semillas (Bravo, 2012). Su eliminación conlleva un elevado coste y debido a la exigencia actual de conductas medioambientales adecuadas, es necesario introducir otras vías de aprovechamiento. Por ello, desde hace unos años, se ha puesto especial énfasis en la recuperación, reciclado y utilización de residuos originados en cualquiera de las etapas de transformación en la industria de derivados vegetales tanto por cumplir la legislación vigente como por motivos meramente económicos.

Los primeros autores que propusieron la utilización de los residuos de la industria del tomate fueron Stewart y Tomhave en 1931, indicando que por su alto contenido fibra resultaban recomendables como alimento para el ganado vacuno. Hoy en día se siguen utilizando para la alimentación de animales de abasto y mascotas (Viuda-Martos y col., 2014; Yuangklang y col., 2015). Se utilizan también como abono y compostaje, mezclado con otros residuos de frutas y verduras, reduciendo así el gasto en abonos químicos. Así mismo, se utiliza como medio de cultivo para bacterias y hongos o como sustrato de reacciones fermentativas (Berganza y col., 2005).

Otra posible vía de aprovechamiento de los subproductos de la industria hortofrutícola en general y la tomatera en particular, es su utilización en alimentación humana, aprovechando su contenido en compuestos bioactivos como por ejemplo la fibra dietética, soluble e insoluble (Farris y col., 2009; Rojas-Graü y col., 2009; Sánchez-Zapata y col., 2010). El aceite que se extrae de las semillas del tomate tiene un 75% de ácidos grasos insaturados, especialmente ácido linoleico, esencial para el organismo humano. Igualmente, se pueden obtener vitaminas y compuestos antioxidantes que podrían resultar beneficiosos para la salud. En el tomate se encuentra el licopeno, un carotenoide que se puede usar como colorante en alimentos y bebidas pero fundamentalmente se utiliza por su potente efecto antioxidante, lo que hace que su consumo se haya extendido ampliamente entre los consumidores.

En la **Tabla 2** se muestran algunos pigmentos obtenidos a partir de vegetales y otros sintéticos permitidos por la Unión Europea.

Por lo anteriormente expuesto y teniendo en cuenta que la industria del tomate genera una gran cantidad de residuos, aproximadamente un 15% con respecto de la producción total, y que en la industria procesadora del tomate este porcentaje es de un 4% (Valle y col., 2006), el aprovechamiento y transformación de estos residuos supone una alternativa atractiva no solo para reducir costes sino para la obtención de compuestos bioactivos, entre los que destaca el licopeno.

1.1.5. Declaraciones de salud. Legislación vigente

La incorporación en el mercado de nuevos productos alimenticios que se ofrecen como beneficiosos para la salud ha hecho necesario establecer un marco de referencia legal con normativas reguladoras.

Tabla 2. Pigmentos obtenidos a partir de vegetales y mediante síntesis química, permitidos por la Unión Europea como colorantes alimentarios

Pigmento	Fuente	Color	Código alimentario
Curcumina	Raíz de cúrcuma	Amarillo limón	E-100
Clorofilas	Hojas	Verde	E-140
α, β y γ-caroteno	Zanahoria, aceites vegetales	Naranja rojizo	E-160a
Bixina y norbixina	Bija	Naranja	E-160b
Capsantina y capsorrubina	Pimiento rojo	Naranja rojizo	E-160c
Licopeno	Tomates rojos	Rojo	E-160d
β-apo-8'-carotenal	Síntesis química	Naranja	E-160e
Éster etílico del ácido β-apo-8'-carotenoico	Síntesis química	Naranja	E-160f
Luteína	Verduras verdes	Amarillo	E-161b
Cantaxantina	Hongos	Rojo	E-161g
Betanina	Remolacha roja	Rojo	E-162
Antocianinas	Piel de uvas negras	Azul-Morado	E-163

De: Reglamento (UE) N° 1129/2011.

Las declaraciones de salud son la forma en la que se comunica al consumidor las propiedades de un alimento funcional. Su evolución ha sido tan compleja como la propia definición de alimento funcional.

Así, en el informe FUFOSE se describieron cuatro categorías diferentes de declaraciones (Diplock, 1999):

- Relacionadas con las guías dietéticas: se centran en patrones generales de ingestas de alimentos de forma sana y equilibrada.

- Relacionadas con el contenido en nutrientes: hacen referencia al contenido de algún nutriente usando expresiones como “fuente de”.

- Declaraciones que comparan el contenido en nutrientes entre dos o más alimentos, como por ejemplo “tiene bajo contenido en grasa y alto en ácido fólico”.

- Aquellas que describen las funciones de un nutriente, como por ejemplo el ácido fólico consumido por mujeres gestantes disminuye el riesgo de defectos del tubo neural en el feto.

Años más tarde, la FDA (2002) las clasificó en 4 categorías. En la categoría A figura el nivel más alto de evidencias científicas. En la B, aquellas cuyo nivel científico es moderado: “...aunque hay evidencias científicas soportando esta declaración, no son concluyentes”. Las categorías C y D corresponden a niveles bajos o muy bajos de evidencia científica (ADA Reports, 2004).

Con el fin de establecer directrices comunes hacia el uso de declaraciones de salud en el etiquetado y comercio de alimentos, en 2006 el Parlamento Europeo emitió el Reglamento (UE) N° 1924/2006. En él, se armonizan las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas de los Estados miembros relativas a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables. Este Reglamento manifiesta de forma explícita las declaraciones de salud deben ser verdaderas, científicamente válidas y claras para el consumidor, y las define como, cualquier mensaje o representación que no sea obligatorio con arreglo a la legislación comunitaria o nacional, incluida cualquier forma de representación pictórica, gráfica o simbólica, que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee unas características específicas. Se contemplan varios tipos:

- “Declaración nutricional”: afirma, sugiere o da a entender que un alimento posee propiedades nutricionales beneficiosas específicas.

- “Declaración de propiedades saludables”: afirma, sugiere o da a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes y la salud.

- “Declaración de reducción del riesgo de enfermedad”: afirma, sugiere o da a entender que el consumo de una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un factor de riesgo de aparición de una enfermedad humana.

En 2009, la Food and Drugs Administration y el Center for Food Safety and Applied Nutrition (FDA/CFSAN, 2009) agruparon las declaraciones de salud en cuatro categorías:

1. Relacionadas con las guías dietéticas.

2. Relacionadas con el contenido en nutrientes.
3. Sobre la estructura o la función en el organismo.
4. Relacionadas con la disminución del riesgo de padecer enfermedades.

Así mismo, estableció que las declaraciones de salud no pueden hacer referencia al tratamiento o cura de enfermedades. Si lo hicieran, se considerarían como medicamentos y no alimentos (Lupton, 2009).

En 2010, se puso en marcha el proyecto Bioclaims, financiado por la Comisión Europea y orientado a la búsqueda de nuevos biomarcadores que puedan utilizarse para acreditar de manera precisa los efectos saludables de los alimentos y por otra parte, para regular la publicidad engañosa de los productos con supuestas propiedades beneficiosas para la salud. De este modo, los anuncios de alimentos saludables sólo se podrán aplicar o emplear si sus afirmaciones están sustentadas en una evidencia científica rigurosa, acreditada por el Panel de Nutrición de la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA, 2011).

En el año 2012, la Unión Europea emitió el Reglamento (UE) N° 432/2012 en el que se establece un registro de las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables relativas a los alimentos y en el que se recogen las declaraciones autorizadas y las condiciones de uso aplicables a las mismas. Este registro inicial ha sido posteriormente ampliado en tres ocasiones mediante los Reglamentos (UE) N° 536/2013, N° 851/2013 y N° 1018/2013.

1.2. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides. Se sintetizan de forma natural en los cloroplastos de las células vegetales, concretamente en los tilacoides. Son responsables de la mayoría de los colores amarillos, anaranjados y rojos presentes en los alimentos vegetales, así como de los colores de varios alimentos de origen animal; por ejemplo la astaxantina es el pigmento responsable del color rosa del salmón. Su nombre proviene de la zanahoria (*Daucus carota*) ya que fue la hortaliza de la que se aislaron por primera vez (Badui, 2006). Los carotenoides son sintetizados también por hongos, levaduras, algas y bacterias (Das y col., 2007). En la **Tabla 3** se recogen las concentraciones de algunos carotenoides presentes en alimentos de origen vegetal.

Tabla 3. Contenido de carotenoides ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) en algunos alimentos de origen vegetal

Alimento	Luteína/ Zeaxantina	β - criptoxantina	Licopeno	α - caroteno	β - caroteno
Zanahoria	0-2097			530-35833	1161-64350
Tomate	44-740		21-622735		36-2232
Espinacas	2047-20300				840-24070
Lechuga					48-3120
Plátano	0-37			0-157	0-92
Pimiento rojo	148-390	199-1460		0-62	120-3280
Albaricoque	0-141	28-231		0-37	140-6939
Melocotón	9-120	12-510		0-9	30-1480
Sandía	0-40	62-457	2300-7200	0-1	44-324
Naranja	0-240	14-1395		0-400	0-500
Pera	1910				520
Mango		17-317		10-124	109-1021
Brócoli	707-3300				291-1750
Pepino	490-840				112-270

De: Olmedilla y col. (2001)

El hombre y los animales no pueden sintetizarlos *de novo* y deben consumirlos en la dieta. El 95% de los carotenoides que ingerimos provienen de las frutas y hortalizas y el otro 5% de alimentos de origen animal como moluscos, crustáceos, peces, hígado, lácteos y huevos (Bravo, 2012).

De los aproximadamente 700 carotenoides presentes en la naturaleza, solo unos 50 están presentes en nuestra dieta (Meléndez-Martínez y col., 2004). No obstante, solo seis (β -caroteno, β -criptoxantina, α -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina) representan más del 95% de los presentes en sangre (Maiani y col., 2009). Se distribuyen en los distintos tejidos de manera no uniforme; por ejemplo en los testículos el licopeno es el mayoritario mientras que la luteína y zeaxantina lo son en la retina y el cristalino (Olmedilla y col., 2003). Como se ha indicado anteriormente los vegetales aportan la mayor parte de los carotenoides que ingerimos, siendo diferentes dependiendo de cada producto. La

concentración también es muy variable ya que depende de muchos factores como la variedad, el cultivar, el clima, la época de recolección, etc.

Al ser pigmentos, los carotenoides se pueden utilizar como colorantes alimentarios, bien para devolver su aspecto original a alimentos cuyo color se ha visto afectado por el procesado, o bien para hacer más apetecibles visualmente a algunos alimentos.

Además de su ya mencionado poder antioxidante (Viuda-Martos y col., 2014), se ha demostrado que los carotenoides, como el β - caroteno, son potenciadores de la respuesta inmune tanto en animales como en humanos (Chew y Park, 2004) y además, algunos son precursores de la vitamina A como el β - y el α -caroteno y la β -criptoxantina.

1.2.1. Propiedades químicas

Desde el punto de vista químico, los carotenoides son tetraterpenos constituidos por unidades múltiples de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos. Los grupos funcionales de oxígeno más comunes son los grupos hidroxilo y epoxi. También se encuentran los grupos carbonilo (CHO y CO), carboxilo (COOH), carbometoxilo (CO₂Me) y metoxilo (OCH₃) (Carranco y col., 2011). De acuerdo con su estructura química, los carotenoides pueden clasificarse en carotenos y xantófilas. Los carotenos son carotenoides no oxigenados mientras que las xantófilas son carotenoides oxigenados.

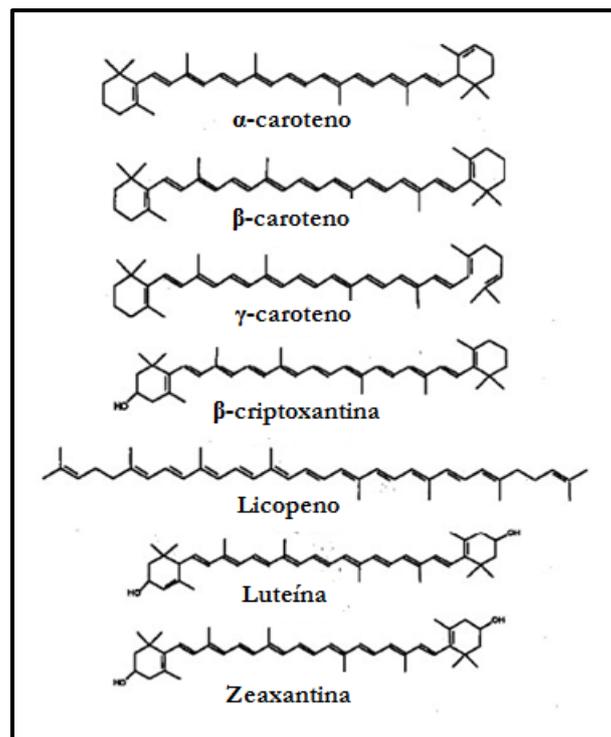
Su característica estructural es un conjunto de dobles enlaces conjugados que les confiere la propiedad de absorber energía lumínica en la región visible del espectro y por ende una elevada capacidad colorante. El color es estable durante años a temperatura ambiente y en contacto con el aire, por lo que tienen un gran potencial como posibles colorantes alimentarios (Mortensen, 2006). Pero la principal característica que les confiere el poseer un elevado número de dobles enlaces conjugados es su gran potencial antioxidante. En la **Figura 1** se muestran la estructura y denominación de los principales carotenoides.

1.2.2. Isomerización y degradación de carotenoides

Debido a la presencia de dobles enlaces, los carotenoides presentan isomería geométrica, todo-*trans/cis* o también conocida como E/Z. En la naturaleza la mayor parte de los carotenoides se suelen encontrar en la forma todo-*trans* (95%) que estructuralmente

son moléculas largas, lineales y rígidas; las formas *cis* son menos lineales y rígidas y están más replegadas, ocupando menos espacio. Esta diferente estructura determina sus propiedades biológicas y químicas; así, los isómeros *cis*, se solubilizan con más facilidad por lo que se absorben y transportan mejor a nivel celular (Böhm y col., 2002). Además, los isómeros *cis* presentan menor intensidad de color, menor punto de fusión, menor coeficiente de extinción molar y diferentes valores máximos de absorción en el espectro ultravioleta-visible que la forma todo-*trans*.

Figura 1. Estructura y denominación de los principales carotenoides



De: Meléndez-Martínez y col. (2004)

El proceso de isomerización de la forma todo-*trans* a los isómeros *cis* se produce con un aporte externo de energía como luz, calor, etc. La reacción es reversible pero está claramente inclinada al paso de las formas *trans* a las *cis* (Meléndez-Martínez y col., 2004). Además los carotenoides también pueden degradarse, fundamentalmente debido a procesos oxidativos. Conocer los factores que influyen en la degradación e isomerización de los carotenoides es importante desde el punto de vista nutricional ya que su pérdida, además de producir cambios de color en el alimento, conlleva una disminución de su valor nutritivo. Tales factores son:

- Oxidación. Es la causa principal de la degradación de los carotenoides ya que su alto grado de insaturación los hace muy vulnerables. Los carotenoides están protegidos en los tejidos vegetales, pero cualquier operación (corte, picado, triturado) que rompa la integridad celular, provocará que los carotenoides estén expuestos al oxígeno. Los procesos oxidativos implican reacciones de epoxidación, formación de apocarotenoides (carotenoides de menos de 40 átomos de carbono) e hidroxilación, obteniéndose finalmente compuestos de bajo peso molecular similares a los que aparecen como consecuencia de la oxidación de ácidos grasos (Meléndez- Martínez y col., 2004).

- Temperatura. La influencia de la temperatura en la estabilidad de estos pigmentos es clara, siempre actúa como acelerador de la degradación siguiendo una cinética de primer orden, es decir cuanto mayor es la temperatura, mayor es su destrucción. Además cuando la temperatura es muy elevada (190°C) se pueden llegar a formar productos de degradación, como en el caso del β -caroteno del que, por degradación térmica, se forma ioneno, tolueno, *m*-xileno y 2,6-dimetilnaftaleno (Palacios, 2014).

- Procesado de alimentos. Los carotenoides son especialmente sensibles al pH y a la luz (Jáuregui y col., 2011). En el caso del pH, es necesario tener en cuenta que aunque los carotenoides son relativamente resistentes a valores de pH extremos, los ácidos y álcalis pueden provocar isomerizaciones *cis/trans* de ciertos dobles enlaces, reagrupamientos y desesterificaciones. Por ello es importante el control del pH en procesos de elaboración tanto de zumos como de vegetales fermentados, pues dichos alimentos cuentan con una acidez inherente que podría provocar la pérdida de algunos carotenoides, como por ejemplo la violaxantina en el zumo de mango (Meléndez-Martínez y col., 2004). Sin embargo, algunas tecnologías utilizadas en el procesado de alimentos, como las altas presiones, no afectan de manera significativa a los niveles de carotenoides, siempre que se realice a ciertas temperaturas y presiones; de hecho la aplicación de 500 MPa, 2-12 min a 20-25°C puede llegar a mejorar la extracción del licopeno debido a la rotura de los tejidos vegetales como ha descrito Martínez-Hernández y col. (2016).

- La luz. La incidencia de la luz induce su degradación e isomerización. Estas reacciones tienen mucha importancia en la industria alimentaria ya que los carotenoides pierden, además de su función biológica de provitamina A, su color característico. Por ejemplo, Shi y col. (2003) describieron cómo la cantidad de licopeno del puré de tomate disminuía proporcionalmente a la intensidad y la duración de la luz aplicada.

Las condiciones óptimas de almacenamiento de carotenoides se convierten en un perfecto aliado para evitar o cuanto menos minimizar su degradación. Se ha establecido que

las condiciones más óptimas son en oscuridad, congelación, con antioxidantes y en exclusión de oxígeno (vacío, envases impermeables al oxígeno, atmósfera inerte). Mientras que la isomerización de las formas *trans* a las formas *cis*, ocurren típicamente durante el procesado, durante el almacenamiento se favorece la re-isomerización de *cis* a *trans*, debido al estado relativamente inestable de los isómeros *cis* frente al *trans* (Martínez-Hernández y col., 2016).

1.2.3. Métodos de extracción y cuantificación de carotenoides

Su localización en el interior de las células vegetales dificulta su extracción ya que es necesario no solo romper la pared celular sino también las membranas de los tilacoides. Al ser liposolubles, los carotenoides se extraen con disolventes orgánicos como acetona, éter de petróleo, hexano, cloroformo, diclorometano, etanol y metanol (Valduga y col., 2009). Con frecuencia se optimiza usando combinaciones de varios de ellos.

La extracción de carotenoides es delicada ya que durante el proceso se producen pérdidas debidas a su degradación producidas, como ya se ha indicado, por la presencia de oxígeno, luz, calor, etc. Por ello, es recomendable que se lleve a cabo en condiciones de oscuridad y/o en una atmósfera inerte. Además es aconsejable utilizar antioxidantes como el butilhidroxitolueno o el quinol (Lim y col., 2002; Park y col., 2007).

Para optimizar la extracción de carotenoides, se han utilizado fluidos supercríticos, que al tener propiedades híbridas entre un líquido y un gas poseen una importante capacidad para disolver solutos, miscibilidad con gases permanentes, alta difusividad y baja viscosidad, lo que les hace muy adecuados para muchos procesos de extracción de compuestos y cada vez son más utilizados en la industria alimentaria. Se han valorado las condiciones más adecuadas para optimizar la extracción de licopeno y tanto Shi y col. (2009) como Egydio y col. (2010) fijaron dichas condiciones en 75-80°C y 46 MPa con CO₂ supercrítico. La mejor capacidad antioxidante se ha observado cuando la temperatura desciende a 40°C (Egydio y col., 2010).

Otras técnicas empleadas son la extracción con microondas, llegándose a recuperar hasta un 99% del licopeno (Shi y Le Maguer, 2000; Huang y col., 2008). También se ha extraído licopeno con ultrasonidos (Huang y col., 2008) con buenos resultados.

La cuantificación se realiza tradicionalmente mediante espectrofotometría y colorimetría (Aranda-Ruiz y col., 2012). Pero, aunque estos métodos proporcionan una rápida evaluación del contenido en licopeno, es la cromatografía líquida de alta resolución

(HPLC) la que permite una mayor versatilidad, selectividad, sensibilidad y fiabilidad. El HPLC es la mejor opción para identificar y cuantificar los isómeros *cis* y *trans* del licopeno; dicha identificación se realiza por la forma del espectro y la longitud de onda de máxima absorción, características de cada carotenoide (Anguelova y Warthesen, 2000).

1.3. El licopeno

El licopeno es un pigmento de color rojo presente principalmente en frutas y verduras. Su función en las plantas es absorber la luz durante la fotosíntesis para protegerlas contra la fotosensibilización producida por acción de la luz solar. Los primeros autores que lograron extraer licopeno a partir del tomate fueron Willstätter y Escher (1910).

Cuando no se conocían todos los beneficios saludables de su consumo se usaba como colorante, pues aportaba a los alimentos un intenso color rojo (Shi y Le Maguer, 2000). En la actualidad se sabe que el licopeno, al igual que el resto de los carotenoides, es capaz de combatir al estrés oxidativo debido a su gran potencial antioxidante, por lo que hoy en día es objeto de numerosos estudios encaminados a conocer y definir sus efectos beneficiosos sobre la salud.

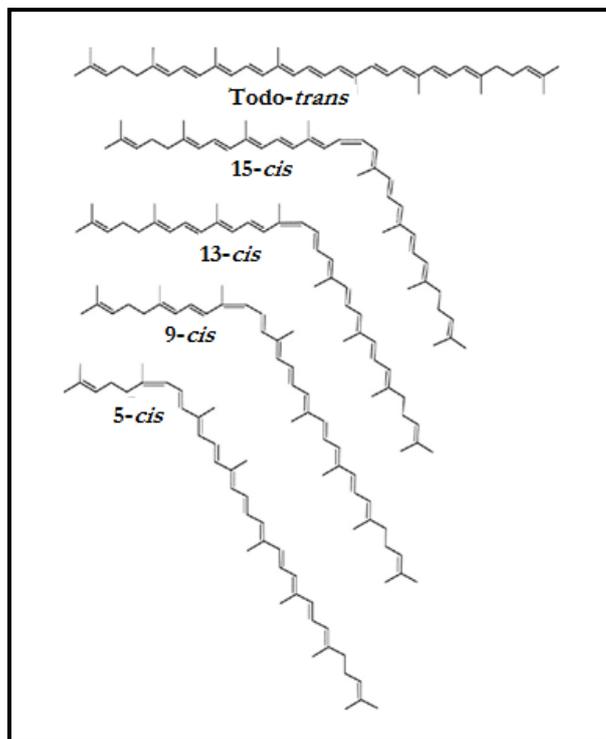
Este pigmento se sintetiza exclusivamente por plantas y por algunos microorganismos como *Dunaliella salina*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Haematococcus pluvialis*, y *Blakeslea trispora* (Mehta y col., 2003; Raja y col., 2007). El descubrimiento de los genes implicados en la síntesis de este carotenoide, ha hecho posible que microorganismos que no eran productores de licopeno puedan serlo gracias a técnicas de ingeniería genética (Hernández-Almanza y col., 2016). Mediante la incorporación de un plásmido que lleva el gen responsable de la síntesis de licopeno algunos microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* (Bahieldin y col., 2014), *Yarrowia lipolytica* (Matthäus y col., 2014) y *Escherichia coli* (Huang y col., 2015) son capaces de sintetizar licopeno.

La fórmula molecular del licopeno es $C_{40}H_{56}$ consistente en una cadena alifática formada por cuarenta átomos de carbono con trece dobles enlaces de los cuales once son conjugados, lo que provoca que el licopeno pueda tener 2048 configuraciones electrónicas diferentes; no obstante solo 72 isómeros son más estables estructuralmente. Entre los isómeros *cis* predominan 5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis* y 15-*cis* (Kessy y col., 2013) cuyas estructuras se muestran en la **Figura 2**.

La presencia de once dobles enlaces le hace ser muy reactivo frente al oxígeno y los radicales libres (Shi y LeMaguer, 2000; Wilcox y col., 2003; Vitale y col., 2010; Cruz-

Bojórquez y col., 2013). Esta capacidad antioxidante, que supera al β -caroteno, α -caroteno y α -tocoferol (Palozza y col., 2012) confiere al licopeno sus efectos beneficiosos e incluso preventivos frente a numerosas enfermedades (Cruz-Bojórquez y col., 2013; Viuda-Martos y col., 2014).

Figura 2. Estructura química de los isómeros todo-*trans* y algunos *cis* del licopeno



De: Agarwal y Rao (2000)

Tanto las características físico-químicas como la biodisponibilidad de los isómeros no son las mismas. Los isómeros *cis* presentan menores puntos de fusión y menor intensidad de color que el isómero todo-*trans*. Además son más polares y más liposolubles que el isómero todo-*trans* (Srivastava y Srivastava, 2015). En cuanto a la biodisponibilidad, las formas *cis* son más biodisponibles, debido probablemente a que los isómeros *cis* ocupan menos espacio en comparación con el isómero lineal todo-*trans* (**Figura 2**). Este hecho evitaría la agregación y formación de cristales de los isómeros *cis* en las gotas lipídicas, facilitando así su incorporación a las micelas durante el proceso de digestión gastrointestinal. También es posible que la configuración *cis* pueda unirse de forma más favorable a los transportadores de membrana responsables de la absorción de los carotenoides en el borde en cepillo de las células epiteliales intestinales (During y Harrison, 2005; Reboul y col., 2005).

Además de su mayor biodisponibilidad, se ha descrito que las formas *cis* tienen mayor capacidad antioxidante (Strati y Oreopoulou, 2016).

1.3.1. Fuentes de licopeno

La principal fuente de licopeno en la dieta es el tomate, aunque también se encuentra en concentraciones elevadas en otros alimentos como la sandía o la guayaba. No obstante, el contenido de licopeno varía significativamente en los tomates dependiendo de la variedad (**Tabla 4**) del grado de madurez y de las condiciones estacionales, entre otros factores.

Tabla 4. Contenido de licopeno en diferentes variedades de tomate

Variedad de tomate	Licopeno (mg/kg)
Durina	64,98
Pera	63,37
Canario	49,44
Remate	42,96
Daniella	36,32
Senior	32,24
Rambo	31,97
Ramillete	31,49
Liso	18,60

De: Martínez-Valverde y col. (2002)

En la **Tabla 5** se muestra el contenido en licopeno de diferentes productos derivados del tomate y de distintos vegetales.

1.3.2. Mecanismo de acción biológica

El licopeno puede actuar mediante mecanismos no oxidativos y oxidativos. Se ha descrito que la actuación simultánea de ambos mecanismos puede contribuir a reducir el riesgo de algunos tipos de cáncer (Agarwal y Rao, 2000).

Tabla 5. Contenido de licopeno en diversas fuentes alimenticias

Producto	Contenido en licopeno (mg/100g)	Referencia
Kétchup	1,9-26,2	Lugasi y col. (2003)
Zumo de tomate	7,13	Odriozola-Serrano y col. (2008)
Salsa de tomate	26,18	Østerlie y Lerfall (2005)
Puré de tomate	27,39	Yildiz y Baysal (2007)
Pulpa de tomate	28,64	Huang y col. (2008)
Calabaza	3,8-4,6	Periago y col. (2001)
Pomelo	3,36	Periago y col. (2001)
Zanahoria	0,75-0,78	Rao y Rao (2007)
Albaricoque	0,05	Rao y Rao (2007)
Papaya	0,11-0,53	Rao y Rao. (2007)
Guayaba	0,8-1,8	Rao y Rao (2007)
Sandía	2,30-7,20	Rao y Rao (2007)

Como mecanismos de acción no oxidativos se pueden citar:

- Control del crecimiento celular. Es capaz de detener el crecimiento de células tumorales mediante el bloqueo de la transición de la fase G1 a la S del ciclo de división celular (Stahl y col., 2000).
- Disminución de la expresión de citoquinas. Es el caso de la interleucina 6, implicada en el desarrollo de cáncer (Agarwal y Rao, 2000; Giri y col., 2001; Pollak, 2001).
- Inhibición de un factor de crecimiento de la insulina (IGF-1). La alteración en la actividad del IGF-1 estimula la proliferación y la resistencia apoptótica en las células. Diversos estudios han demostrado que concentraciones IGF-1 total relativamente altas están asociadas a un mayor riesgo de ciertos tipos de cáncer. El licopeno es capaz de disminuir niveles elevados de IGF-1 en sangre (Renehan y col., 2004).
- Mejora de la comunicación intercelular. El licopeno y sus metabolitos mejoran la comunicación intercelular al favorecer el aumento de los niveles de conexina (Heber y Lu, 2002).
- Mejora de la respuesta inmune. La depresión del sistema inmune está relacionada con situaciones de estrés oxidativo celular. El licopeno es capaz de mejorar la respuesta inmune al inhibir o reducir el estrés celular (Chew y Park, 2004).

- Finalmente, el licopeno puede actuar como regulador de las uniones intercelulares gap, de la expresión génica y la función hormonal e inmune (Agarwal y Rao, 2000).

Pero el mecanismo de acción más importante es su actividad como antioxidante ligada a sus 11 dobles enlaces conjugados (Meléndez-Martínez y col., 2004), lo que le confiere una capacidad secuestrante de oxígeno singlete que es 10 veces superior a la del α -tocoferol (Palozza y col., 2012). Participa, en consecuencia, en la modulación de rutas redox o atenuando reacciones de oxidación, particularmente la peroxidación lipídica y el daño oxidativo del ADN.

Como consecuencia del transporte de electrones, la actuación de determinadas enzimas y debido también a las reacciones redox que ocurren en el organismo en el interior de la célula (normalmente a nivel de las mitocondrias), se producen una serie de compuestos como el superóxido (O_2^-), el hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), así como los oxiradicales (O_2 singlete y doblete) que se engloban bajo la denominación conjunta de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Viuda-Martos y col., 2014).

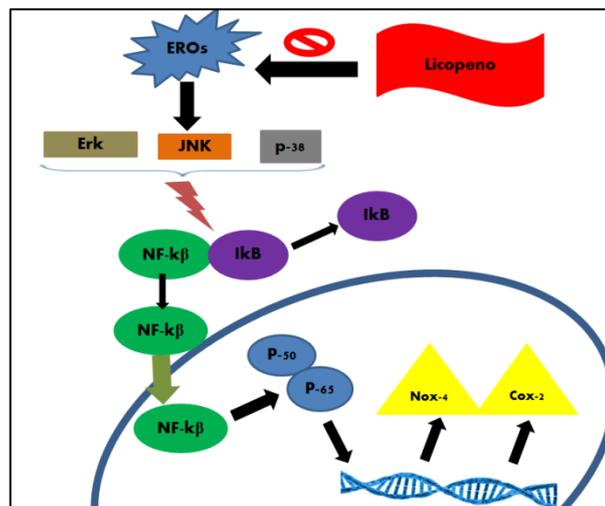
Las EROs regulan varios procesos celulares, como: la secreción y acción de la insulina, la producción de hormonas de crecimiento, citocinas, factores de transcripción o la regulación de los transportadores y canales de iones. Sin embargo, las EROs también resultan nocivas cuando se producen en grandes cantidades dañando las estructuras celulares e induciendo la muerte celular. Si los niveles de estos compuestos son elevados, se produce el estrés oxidativo, que supone un daño irreversible a moléculas como el ADN, proteínas y lípidos e incluso puede provocar muerte celular temprana.

Las EROs son capaces de activar una cascada de señalización celular en la que se ven implicadas un gran número de proteínas, entre las que destacan MAP-quinasas (Mitogen Activated Protein Kinases), factor $NF-\kappa\beta$ (Factor Nuclear Potenciador de las Cadenas Ligeras κ de las Células β Activadas), Nox-4 (NADPH Oxidasa 4) y Cox-2 (Ciclooxigenasa 2), lo que permite utilizarlas como indicadoras del mencionado estrés oxidativo celular (**Figura 3**).

Las MAP-quinasas constituyen una familia de proteínas que desempeñan un papel fundamental en la regulación de una amplia variedad de funciones celulares, llevando mensajes desde el citoplasma al núcleo de la célula y desencadenando procesos de apoptosis, de transcripción, traducción y síntesis de ácidos nucleicos (Yang y col., 2003). Estas quinasas se clasifican en tres grandes subgrupos: las quinasas reguladas por factores extracelulares o ERK (Extracellular Regulated Kinases), las quinasas del producto

temprano de expresión c-JUN o JNK (c-JUN Amino Terminal Kinases) y una quinasa de peso molecular aproximado de 38 kD o p38 (Raman y col., 2007). Todas tienen en común que para poder activarse necesitan ser fosforiladas, y la activación se produce cuando hay una elevada concentración de EROs en el medio celular (Jackson y col., 2007). Otros factores que pueden provocar su activación son situaciones de hipo e hiperosmolaridad, luz ultravioleta, agentes genotóxicos, mediadores inflamatorios, y otros procesos en los que se produce muerte celular anormal (Sarkar y col., 2009).

Figura 3. Esquema de la cascada de proteínas inducidas por estrés celular



El factor de transcripción nuclear NF- κ B está constituido por un conjunto de homo y heterodímeros, entre los cuales se encuentran las subunidades p50 y p65. Es un factor fundamental en la relación entre inflamación crónica y desarrollo de cáncer. Contribuye en gran medida a la formación de tumores al impedir la apoptosis de las células epiteliales (Covarrubias y col., 2010). Está presente en el citoplasma de todas las células de los mamíferos de manera inactiva debido a la asociación con un grupo de proteínas inhibitorias denominado IkB y que incluye a IkBa, IkBb, IkBeard y IkBg (Shen y Tergaonkar, 2009). Su activación se provoca a partir de una amplia gama de estímulos tales como el factor de necrosis tumoral, luz ultravioleta, interleuquina 1, citoquinas, radicales libres, productos virales y bacterianos y las MAP-quinasa. Una vez activo, el factor se transloca al núcleo, donde desencadena la expresión de ciertas proteínas involucradas en situaciones de estrés celular, entre las que se encuentran Nox-4 y Cox-2 (Simone y col., 2011).

Las proteínas Nox-4 y Cox-2 se expresan en situaciones de estrés celular y contribuyen a la formación de EROs intracelulares (Palozza y col., 2012).

El licopeno es capaz de inhibir la fosforilación de las MAP-quinasas evitando así posteriores procesos de sobreproducción de EROs y otros procesos redox intracelulares (Palozza y col., 2012).

1.3.3. Licopeno y salud

Cada vez existen más estudios epidemiológicos que sugieren que el consumo de licopeno reduce notablemente la incidencia de algunas patologías como enfermedades cardiovasculares (ECV), algunos tipos de cánceres y otras enfermedades descritas a continuación.

Licopeno y ECV

El licopeno juega un papel muy importante en la prevención de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Low Density Lipoproteins, LDL), proceso que lidera la formación de la placa de ateroma y la aparición de cuadros inflamatorios (Kong y col., 2010).

Además, es capaz de reducir los niveles de colesterol, triglicéridos y LDL (Alshatwi y col., 2010). Ried y Fakler (2011) determinaron que la ingesta de licopeno necesaria para lograr dichos efectos se sitúa en torno a los 25 mg al día. Igualmente, Sesso y col. (2004) estudiaron la relación entre la concentración de licopeno plasmático y el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, concluyendo que con concentraciones plasmáticas de licopeno superiores a 16,5 µg/dl dicho riesgo disminuía.

Licopeno y cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial (Desai y col., 2008). Numerosos estudios epidemiológicos sugieren que la ingesta de frutas y verduras, algunas de ellas ricas en licopeno, se asocia al menor riesgo de padecer esta enfermedad (Giovanucci y col., 2002; Skuladottir y col., 2006). Kim y col. (2002) estudiaron el efecto del licopeno frente a la línea celular tumoral *LnCap* observando que su viabilidad disminuía al adicionarles concentraciones crecientes de licopeno, desde 10^{-4} hasta 10^{-6} M. Palozza y col. (2010) realizaron estudios con la misma línea celular tratada con diferentes concentraciones de licopeno, observando que no solo fue capaz de detener el ciclo generativo de estas células tumorales sino también de inducir su apoptosis.

Se han realizado estudios de la acción del licopeno frente a distintos tipos de cáncer; algunos de ellos se citan a continuación:

- Cáncer de próstata: Ansari y Gupta (2003) y Wei y Giovannucci (2012) constataron que la suplementación de la dieta con licopeno provocaba la disminución en los niveles de PSA (Prostatic Specific Antigen) en pacientes con esta enfermedad. En aquellos que presentaban tumores benignos de próstata, induce una progresiva inhibición de la enfermedad así como una mejora de sus síntomas (Schwarz y col., 2008).

- Cáncer de colon: Tang y col. (2008) demostraron que el licopeno es capaz de inhibir significativamente la proliferación de las células tumorales de colon de la línea celular HT-29. Estos mismos autores (Tang y col., 2011) establecieron que el licopeno podría actuar como quimioprotector frente al desarrollo del cáncer colorrectal. Huang y col. (2015) observaron el efecto positivo de nanopartículas con licopeno en la inhibición del crecimiento de líneas celulares de cáncer de colon.

- Cáncer de mama: El licopeno es probablemente el carotenoide que más se ha asociado a la prevención del cáncer de mama (McMillan y col., 2002; Ko y Moon, 2015). Gloria y col. (2014) estudiaron la acción del licopeno frente a celulares tumorales de cáncer de mama, observando que podía inhibir la proliferación celular y estimular su apoptosis.

Licopeno y osteoporosis

La osteoporosis es una enfermedad sistémica esquelética que se caracteriza por una disminución de la masa ósea y su progresivo deterioro, lo que facilita la fractura ósea (Basu y col., 2001; Lean y col., 2005). Estudios recientes apoyan el hecho de que el licopeno tiene un papel protector frente a la degeneración ósea (Rao y Rao, 2013; Ardawi y col., 2016).

Licopeno y diabetes

Aunque no haya tantos estudios como en el caso de las anteriores enfermedades, hay trabajos que apoyan una relación positiva entre la ingesta de licopeno y la reducción del riesgo de padecer diabetes tipo II. Así, Kong y col. (2010) observaron que las personas que ingerían grandes cantidades de frutas y verduras, tenían menor riesgo de padecer dicha enfermedad que las que las consumían en menor cantidad. Similares resultados fueron obtenidos por Wang y col. (2006), Kuhad y col. (2008) y Li y col. (2009). Por otra parte, Upritchard y col. (2000) y Li y col. (2009) comprobaron que las personas con diabetes tipo II con los niveles más bajos de licopeno en sangre presentaban los peores cuadros y las mayores complicaciones.

1.3.4. Estabilidad del licopeno

El licopeno, al igual que el resto de los carotenoides, es un compuesto muy lábil y muy sensible a la degradación e isomerización.

Efecto de la oxidación

La degradación del licopeno es mayor cuanto más expuesto esté a agentes oxidantes; de hecho, el licopeno es muy estable cuando está en el fruto pero muy lábil cuando se extrae y purifica. La oxidación se acelera con la temperatura, la presencia de metales y luz y se retrasa cuando hay otros antioxidantes presentes.

Para evitar las posibles pérdidas debidas a la oxidación se han utilizado varios métodos como la encapsulación (Goula y Adamopoulos, 2012), la microencapsulación por atomización (Rocha y col., 2012), el envasado en atmósferas protectoras o a vacío (Martínez-Hernández y col., 2016) o mediante la adición a los alimentos de agentes antioxidantes como extractos de romero (Omer y col., 2014).

Efecto de la temperatura

Los primeros trabajos en este campo fueron los de Mondelise y Berk, quienes estudiaron en 1954 la degradación del licopeno en puré de tomate y observaron que las mayores pérdidas (30%) se producían a 100°C en presencia de oxígeno; en cambio sólo se perdía un 5% cuando el calentamiento se producía en ausencia de oxígeno (Shi y col., 2008).

El licopeno es un compuesto termolábil y su degradación sigue una cinética de primer orden (Lee y Chen, 2002). Estos autores demostraron que a 50°C comienza la isomerización y a 100-150°C la degradación era prácticamente total. Sin embargo, Mayer-Miebachr y col. (2005) estudiaron la estabilidad del licopeno en zanahorias tratadas a diferentes temperaturas (25-140°C) y observaron que la isomerización comenzaba a 100°C.

Es difícil comparar los datos obtenidos en los diferentes estudios debido a que son muy numerosos los factores (composición del alimento, temperatura, presencia/ausencia de oxígeno) que pueden influir en la estabilidad del licopeno durante su procesado térmico y almacenamiento; independientemente de la temperatura, las pérdidas son mayores cuanto más prolongado sea el calentamiento (Shi y LeMaguer, 2000). El efecto es contrario cuando la temperatura está por debajo de los 0°C; en este caso cuanto menor sea la temperatura, mejor es la conservación del licopeno. Por ejemplo el contenido en licopeno en tomate congelado a -30°C es un 43% mayor que a -20°C (Martínez-Hernández y col., 2016).

Efecto de la luz

La intensidad de la luz induce la degradación e isomerización del licopeno y además esta relación es directamente proporcional aunque las pérdidas son menos relevantes que en el caso de la temperatura (Shi y LeMaguer, 2000).

Shi y col. (2008) aplicaron diferentes intensidades de pulsos de luz a puré de tomate durante 12 días a 5°C. La cantidad de licopeno total y de licopeno todo-*trans* no se vio modificada, pero sí se produjo una pérdida significativa de isómeros *cis*, que son más vulnerables al efecto de la luz (Martínez-Hernández y col., 2016).

Efecto del almacenamiento

El efecto del almacenamiento sobre el licopeno va a depender de las condiciones en las que se realice (oscuridad, temperatura...), pero indudablemente el factor que más contribuye es la presencia de oxígeno (Shi y Le Maguer, 2000). El contenido de agua también influye en la estabilidad de licopeno y así, la pérdida de licopeno es menor en tomates desecados (Martínez-Hernández y col., 2016).

Las condiciones óptimas de almacenamiento en consecuencia son: en oscuridad, a vacío, en temperaturas de congelación y con un bajo contenido de agua.

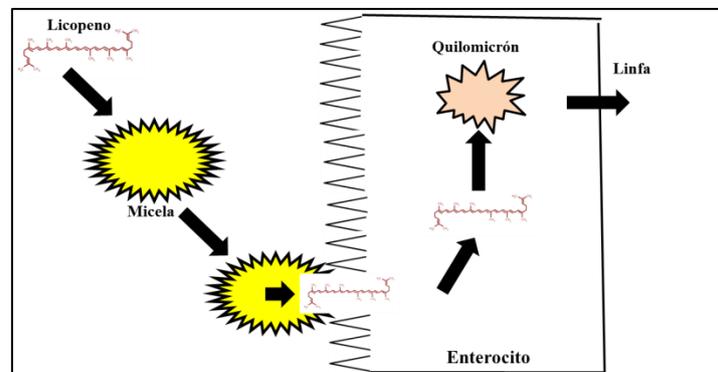
1.3.5. Metabolismo y distribución del licopeno

Cuando un alimento entra en la boca, lo primero que ocurre es la masticación. En este momento tiene lugar la fragmentación de la matriz alimentaria y la acción de un complejo sistema enzimático que provoca la rotura total del alimento. Cuando llega a la parte alta del intestino, los componentes grasos del alimento, como el licopeno, se incorporan a las micelas lipídicas junto con ésteres de retinilo, triglicéridos, fosfolípidos y ésteres del colesterol gracias a la acción de la bilis (Parada y Aguilera, 2007). Las micelas alcanzan la mucosa intestinal y pasan al interior del enterocito por un proceso de difusión pasiva (Honest y col., 2011). En su interior, el licopeno se empaqueta en los quilomicrones, los cuales son secretados vía linfática a la sangre (**Figura 4**).

Al tratarse de una molécula liposoluble, el comportamiento del licopeno y su transporte en el organismo es similar al de la grasa. El licopeno es transportado por la sangre a los diferentes tejidos y órganos (Cruz-Bojórquez y col., 2013). Este transporte se realiza en primer lugar por los quilomicrones y la fracción VLDL (Very Low Density Lipoprotein) y finalmente por las lipoproteínas HDL (High Density Lipoproteins) y LDL, con picos séricos máximos a las 24 y 48 horas de la ingestión (Bravo, 2012). La lipasa

pancreática facilita la difusión pasiva del licopeno desde el quilomicrón al interior de los tejidos y órganos diana.

Figura 4. Absorción y transporte del licopeno



En cuanto a la distribución del licopeno en el organismo, la concentración más alta se registra en los testículos (diez veces superior al resto de tejidos), seguidos de la glándula adrenal, hígado, próstata, mama, páncreas, piel, colon, ovario, pulmón, estómago, riñón, tejido adiposo y cuello uterino (Siler y Goralczyk, 2004; Erdman, 2005). Este carotenoide también puede encontrarse en heces y orina (Zaripheh y col., 2003).

La vida media del licopeno en sangre es alta, entre 12 y 33 días, pero tras un proceso oxidativo, se detecta en sangre algunos metabolitos procedentes de su degradación principalmente el 1,2-epóxido de licopeno y el 5,6-epóxido de licopeno y en menor proporción el 1,2,5,6-diepóxido de licopeno, 1,2,5',6'-diepóxido de licopeno, 5,6,5',6'-diepóxido de licopeno y 1,2,1',2'-diepóxido de licopeno (Kong y col., 2010).

1.3.6. Biodisponibilidad del licopeno

Como se mencionó anteriormente, el organismo humano es incapaz de sintetizar carotenoides por lo que debe obtenerlos a partir de los alimentos. En este sentido, es importante tener en cuenta que el 85% del licopeno ingerido a través de la dieta procede del tomate (Agarwal y Rao, 2000); el resto suele obtenerse de otros vegetales con menor contenido en este carotenoide. Por ello, es importante conocer la disponibilidad del licopeno ingerido y los factores de los que depende.

La biodisponibilidad del licopeno es un proceso complejo que puede verse afectado por un considerable número de factores que se resumen en el acrónimo SLA-MANGHI: Species of caroteno, molecular Linkage, Amount of carotene in a meal, food Matrix,

Absorption modifiers, Nutrient status of the host, Genetic factors, Host-related factors and Interactions (Abourashed, 2013).

Quizás uno de los factores que más influye es la composición y la matriz del alimento en el que se encuentre; así, la grasa y la fibra dietética pueden influir en su liberación y posterior absorción a nivel intestinal (Parker, 1996). La presencia de grasa estimula en el intestino delgado la secreción de sales biliares, lipasa pancreática y fosfolípidos los cuales favorecen la absorción de licopeno (Unlu y col., 2007; Yonekura y Nagao, 2007; Honest y col., 2011). Brown y col. (2004) determinaron que la concentración de licopeno en sangre tras ingerir una ensalada con tomate y aceite era mayor que cuando se ingería la misma ensalada sin aceite.

La presencia de fibra, sobre todo la soluble, aumenta la viscosidad en el tracto gastrointestinal e interacciona con los ácidos biliares, disminuyendo la liberación del licopeno desde la micela. En este sentido, Fernández-García y col. (2012) determinaron que la elevada presencia de fibra podría reducir la absorción del licopeno hasta un 40%. También se ha descrito que los esteroides vegetales y algunos fármacos interfieren de manera negativa en la incorporación del licopeno a las micelas (Boileau y col., 2002; Borel, 2003; Srivastava y Srivastava, 2015).

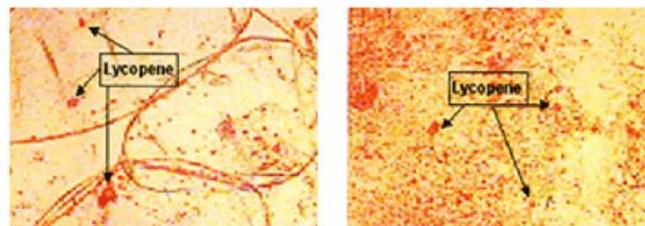
El procesado de los alimentos también tiene una notable influencia en la biodisponibilidad del licopeno debido a que operaciones como el triturado, la homogeneización o el calentamiento favorecen la ruptura de la célula y facilitan la liberación del licopeno de la matriz en la que se encuentra (Van het Hof y col., 2000). Por ello, el tomate procesado (triturado, sopas, salsas) contiene una mayor cantidad de licopeno disponible. En la **Figura 5** se muestra dos imágenes microscópicas de tomate fresco (izquierda) y zumo de tomate (derecha); en esta última, se observa que las membranas celulares se han perdido y el licopeno aparece disperso en el medio.

Vallverdú-Queralt y col. (2013) compararon la biodisponibilidad del licopeno del tomate fresco frente al tomate tratado con campos eléctricos pulsados de intensidad moderada (35 kV/cm). Observaron que la biodisponibilidad del tomate aumentaba hasta un 20% después del tratamiento con los pulsos, lo que se justificaría por un aumento de la permeabilidad celular que favorecería una extracción más eficiente del licopeno.

Svelander y col. (2010) utilizaron un modelo de digestión *in vitro* estático basado en el propuesto por Garret y col. (1999) para estudiar la biodisponibilidad del licopeno y observaron que era casi 5 veces mayor en el tomate que había sido cocinado durante un largo periodo de tiempo a baja temperatura que en el fresco. Además, como se ha

mencionado anteriormente, el cocinado favorece procesos de isomerización del licopeno dando lugar a un mayor contenido de formas *cis*, de mayor biodisponibilidad (Failla y col., 2008).

Figura 5. Imágenes microscópicas de células en el tomate (izquierda) y en el zumo de tomate (derecha)



De: http://www.lycocard.com/index.php/lyco_pub/tomatoes/

Martínez-Tomás y col. (2012) estudiaron la bioaccesibilidad del licopeno usando un modelo de digestión *in vitro* estático en una sopa de vegetales y frutas, obteniendo valores de bioaccesibilidad de un 43%. Goñi y col. (2006) obtuvieron un porcentaje de bioaccesibilidad similar, en torno a un 40%, en frutas y verduras. En estudios *in vivo*, los resultados publicados muestran valores inferiores a los que se acaban de citar. Así, Failla y col. (2008) estudiaron la biodisponibilidad del licopeno en ratas alimentadas con pienso suplementado, obteniendo un 1,85% de licopeno disponible. El estudio de biodisponibilidad de licopeno en humanos es complicado, pues es difícil distinguir el licopeno en plasma procedente de la ingesta del procedente de las reservas existentes en el organismo. Por ello, los estudios realizados no son muy numerosos. Tang y col. (2005) obtuvieron una biodisponibilidad de licopeno de un 1,2% en hombres y mujeres en edades comprendidas entre 45 y 60 años los cuales tomaron una solución oral enriquecida en licopeno durante 10 días, sin embargo la cantidad de licopeno plasmática en dichos pacientes se triplicó cuando el licopeno iba disuelto en aceite.

1.3.7. Alimentos enriquecidos en licopeno

En la actualidad, el licopeno se ha convertido en un compuesto bioactivo muy atractivo para su incorporación a los alimentos bien directamente o en forma de tomate procesado. Benakmoum y col. (2008) añadieron piel de tomate a diferentes tipos de aceites. En este sentido hay que mencionar un aceite de oliva virgen extra ecológico enriquecido

con este carotenoide, el denominado *aceiterol*. Sahin y col. (2008) enriquecieron huevos mediante la incorporación de licopeno al pienso de las gallinas. Dehghan-Shoar y col. (2010) añadieron licopeno procedente de tomate a snacks extrusionados y Rizk y col. (2014) incorporaron piel de tomate a helados. Nour y col. (2015) añadieron tomate desecado a pan e Isik y Topkaya (2016) adicionaron pulpa de tomate a galletas crackers. Kim y col. (2016) han trabajado con tomate en polvo añadiéndolo a galletas tipo cookie y a pan bagel.

Así mismo, se han adicionado distintos derivados del tomate a los productos cárnicos con distintos fines, como disminuir o evitar la adición de nitritos (Deda y col., 2007; Eyiler y Oztan, 2011), enriquecer al producto cárnico en licopeno (García y col., 2009), evitar la oxidación lipídica (Mercadante y col. 2010), mejorar su apariencia (Candogan, 2002), incrementar la vida útil (Sánchez-Escalante y col., 2003) e incluso se ha conseguido reducir y/o enmascarar los olores y sabores anómalos en productos RTE tratados con radiaciones ionizantes (Selgas y col., 2009). En la **Tabla 6** se muestran derivados de tomate que se han adicionado a distintos productos cárnicos.

1.4. Alimentos listos para el consumo

Los hábitos alimentarios de nuestra sociedad, sobre todo en las grandes ciudades, han ido cambiando de forma paralela al aumento del ritmo de vida. Las grandes distancias y la vida actual impiden tener una alimentación reposada y tradicional por lo que los consumidores demandan, cada vez más, comidas rápidas de preparar o de consumo inmediato pero que a la vez sean sanos y nutritivos. La industria alimentaria ha tenido que adaptarse a esta nueva demanda y ha desarrollado un nuevo tipo de alimentos que se consumen de forma inmediata, con un procesado mínimo y que apenas exigen una preparación culinaria. Normalmente se presentan en pequeñas porciones o raciones individuales (lonchas, filetes, piezas pequeñas...) que se presentan al consumidor en envases domésticos de uso fácil y rápido, unidos y/o familiares.

Estos alimentos se exponen en los lineales de los supermercados en vitrinas refrigeradas para alargar su vida útil y se envasan normalmente a vacío o en atmósferas modificadas. Son los llamados alimentos listos para el consumo o RTE (Ready To Eat).

Tabla 6. Productos cárnicos enriquecidos con derivados del tomate como fuente de licopeno

Derivado de tomate	Producto cárnico	Referencia
Puré de tomate	Hamburguesas de vacuno	Candogan (2002)
Zumo de tomate	Embutidos cocidos	Yilmaz y col. (2002)
Extracto de tomate (Lyc-O-Mato)	Hamburguesas de vacuno	Sánchez-Escalante y col. (2003)
Tomate seco y pasta de tomate	Carne picada	Østerlie y Lerfall (2005)
Pasta de tomate	Salchichas	Deda y col. (2007)
Piel de tomate	Embutidos madurados	Calvo y col. (2008)
Tomate en polvo	Hamburguesas de cerdo	Kim y col. (2008, 2013)
Piel de tomate	Hamburguesas de vacuno	García y col. (2009)
Tomate en polvo en aceite de oliva	Carne de cerdo picada	Kim y col. (2009)
Piel de tomate	Hamburguesas de vacuno	Selgas y col. (2009)
Tomate en polvo	Hamburguesas de cerdo	Kang y col. (2010)
Tomate en polvo	Salchichas	Eyiler y Oztan (2011)
Pasta de tomate	Carne de pollo picada	Alves y col. (2012)
Pasta de tomate	Embutidos cocidos	Doménech-Asensi y col. (2013)
Tomate en polvo	Empanada de cerdo	Kim y col. (2013)
Polvo de pulpa de tomate	Rollitos de cerdo	Hayes y col. (2013)
Pulpa de tomate	Salchichas y jamón cocido	Savadkoohi y col. (2014)
Tomate en polvo fermentado	Carne de cerdo picada	Bartkiene y col. (2015)
Fibra procedente de pulpa de tomate	Hamburguesa de ternera	Namir y col. (2015)
Extracto de jugo de tomate	Carne de cordero	Andrés y col. (2016)
Piel de tomate	Embutidos cocidos	Wang y col. (2016)

La FDA (2009) define los alimentos RTE como: “alimentos de origen vegetal o animal, crudos o parcialmente cocinados que han recibido el tratamiento adecuado para asegurar la letalidad de microorganismos patógenos de acuerdo con una variación de las condiciones de procesamiento concedidas por una autoridad reguladora...Elaborados de tal forma que no necesitan preparación adicional para conseguir su seguridad alimentaria...Se encuentran preparados de tal forma que facilitan su consumo directo o bien son comestibles tras una preparación adicional que mejore su palatabilidad o estética por razones gastronómicas o culinarias”.

La importancia que han adquirido actualmente estos productos se pone en evidencia simplemente al echar un vistazo a cualquier supermercado y observar la gran variedad de productos de origen vegetal y animal que se exponen a la venta. Entre estos alimentos encuentran un lugar especial los productos cárnicos.

Sin embargo, el proceso de elaboración de los alimentos RTE lleva consigo operaciones como troceado, loncheado y otras manipulaciones que favorecen el riesgo de una contaminación por microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolítica*, *Aeromonas hydrophyla*; y parásitos como *Toxoplasma gondii*. Estos microorganismos podrían sobrevivir e incluso desarrollarse durante el almacenamiento en refrigeración y llegar al consumidor en condiciones de provocar una toxiinfección alimentaria; por otro lado su crecimiento puede ser mayor por un aumento incontrolado de la temperatura de almacenamiento, algo que, desgraciadamente ocurre con más frecuencia de lo deseable (Zhu y col., 2004).

La contaminación de alimentos es un importante problema de salud pública. A pesar de que en los países industrializados, gracias a la aplicación rigurosa de los procesos tecnológicos y a los altos controles de higiene, las enfermedades vehiculadas por alimentos han disminuido drásticamente, se estima que de un 5 a un 10% de la población sufre, al menos, un episodio de enfermedades de transmisión alimentaria (Coral y col., 2016). Este problema es especialmente importante en los grupos más vulnerables como niños, personas de tercera edad y enfermos inmunodeprimidos.

Por ello se hace necesario realizar un tratamiento posterior al envasado que asegure la destrucción de los posibles microorganismos alterantes o patógenos que hubieran podido llegar al alimento y así garantizar su seguridad desde un punto de vista sanitario. En muchas ocasiones no es posible aplicar las tecnologías clásicas para la higienización de estos alimentos, sobre todo la aplicación de calor, pues puede conllevar la pérdida de características organolépticas propias del alimento y su valor nutritivo. Sin embargo existen

una serie de tecnologías no térmicas de conservación de alimentos que pueden ser muy útiles para lograr la higienización de los productos RTE sin alterar su calidad global.

1.5. Tratamientos no térmicos utilizados en la industria alimentaria

A continuación se mencionan algunos de los tratamientos no térmicos que se utilizan o se están introduciendo en la industria alimentaria para lograr la higienización de los alimentos.

Altas presiones hidrostáticas

En este proceso se aplica sobre el alimento una presión que se transmite de forma adiabática, es decir, uniforme y al mismo tiempo sin importar la forma o el tamaño del alimento (Chawla y col., 2011). La inactivación microbiana se debe a un aumento en la permeabilidad de la membrana celular, la inhibición de reacciones que producen energía y la desnaturalización de enzimas esenciales para el desarrollo celular (Buzrul, 2014). El aumento de la temperatura en el alimento es mínima, 3°C/100 MPa (Rendueles y col., 2011) por lo que las formas esporuladas sólo se inactivan cuando se combinan varios procesos (presión, calor, temperatura, bioconservantes) para que haya un efecto sinérgico (Zhou y col., 2010; Peleg y col., 2012).

Aunque se ha trabajado en un rango de presión de 100 a 1000 MPa, de forma comercial se utilizan entre 100 y 600 MPa con el que se consigue la destrucción microbiana manteniendo la calidad sensorial (Aymerich y col., 2008; Garriga y Aymerich, 2009). Se ha demostrado que a temperatura ambiente la aplicación de 400 a 600 MPa durante 2-10 min es eficaz para lograr la inactivación de patógenos (Simonin y col., 2012). Won y col. (2015) estudiaron el efecto higienizante de las altas presiones en zumo de fresa, concluyendo que las características sensoriales y la cantidad de vitaminas de los zumos tratados con altas presiones eran mejores que los que recibieron tratamientos térmicos. Actualmente se utilizan las altas presiones en productos cárnicos loncheados destinados a la exportación.

Campos magnéticos oscilantes

En esta técnica se somete al alimento a un campo magnético cuya intensidad varía entre 5 y 50 teslas y su frecuencia entre 5 y 500 kHz. Los campos magnéticos provocan la muerte de los microorganismos mediante la ruptura del ADN y la desnaturalización proteica (Grigelmo-Miguel y col., 2011). Se aplican a zumos, mermeladas, frutos tropicales, soluciones azucaradas y yogures (Herrero y Romero de Ávila, 2006).

Pulsos eléctricos

La aplicación de pulsos cortos (microsegundos) a una intensidad eléctrica entre 10-80 kV/cm provoca la expansión de los poros de la membrana celular y la formación de otros nuevos (electroporación) aumentando su permeabilidad y produciendo la muerte celular. La desventaja de esta técnica es la pérdida de vitaminas e inactivación de enzimas (Herrero y Romero de Ávila, 2006) y la formación de radicales libres altamente reactivos (Lado y Yousef, 2002). Su efectividad se ha demostrado en leche desnatada (Sharma y col., 2014), zumos de frutas y huevo líquido (Barbosa-Cánovas, 2008); pero se necesitan más estudios para optimizar este tratamiento (McHugh y Toepfl, 2016).

Pulsos lumínicos

El tratamiento consiste en aplicaciones sucesivas de pulsos de luz con una duración muy corta (1 a 20 flashes/s) lo que aumenta la intensidad de la energía transmitida (Ohlsson, 2000). Se pueden alcanzar temperaturas momentáneas en el alimento de 50-100°C, pero sin ningún aumento de la temperatura global (Ohlsson, 2000). El principal mecanismo de acción es impedir el desdoblamiento de la doble hélice del ADN durante la división celular (Sinha y Häder, 2002; Wang y col., 2006). Se ha aplicado con buenos resultados en productos cárnicos RTE (Hierro y col., 2011). Una variante es el tratamiento con luz UV continua para la esterilización de alimentos líquidos; se aplica en vinos, zumos y cervezas (Bintsis y col., 2000).

Antimicrobianos naturales

Muchos de los antimicrobianos naturales proceden de las plantas y han demostrado un notable potencial contra el crecimiento de microorganismos tanto alterantes como patógenos (Bajpai y col., 2012). Entre estos compuestos antimicrobianos destacan los aceites esenciales de las plantas, o compuestos aromáticos como los fenilpropanoides (Jayasena y Jo, 2013). Pueden provocar daños en la membrana celular causando la formación de poros y permitiendo su paso al citoplasma donde pueden interactuar con proteínas, inhibir la síntesis de compuestos necesarios para el metabolismo y/o, por su carácter ácido, afectar la homeostasis celular (Valtierra-Rodríguez y col., 2010; Gyawali y Ibrahim, 2014). Sin embargo, en la actualidad muchos de estos compuestos no son atractivos comercialmente ya que pueden provocar cambios de las propiedades organolépticas de los alimentos y algunas veces tienen un espectro antimicrobiano limitado (Zhou y col., 2010).

Otros compuestos con actividad antibacteriana son las bacteriocinas (Salazar-Marroquín, 2016), la lactoperoxidasa y la lactoferrina, estas últimas presentes en el suero

lácteo. Todas ellas presentan un efecto bactericida frente un amplio espectro de bacterias y pueden usarse para la conservación de alimentos. En este sentido, Bravo y col. (2014) demostraron su efectividad en una combinación de lactoperoxidasa y lactoferrina con el tratamiento de altas presiones en jamón curado para inactivar *Salmonella* y *Listeria*.

1.5.1. Radiaciones ionizantes

La posibilidad de utilizar las radiaciones ionizantes para la descontaminación de alimentos se planteó poco después del descubrimiento de la radioactividad por Henry Becquerel en 1895. En 1896 se publicó el primer artículo que sugería utilizar la irradiación como posible tecnología higienizante en alimentos. En 1921 el Departamento de Agricultura de Estados Unidos propuso el uso de rayos X como herramienta útil para eliminar *Trichinella* en cerdo (Schwartz, 1921).

El efecto de la radiación supone la emisión de la energía suficiente para que una partícula cargada, normalmente un electrón, salga de su orbital dejando al átomo con deficiencia electrónica. Cada ionización produce una energía de 33 eV. Los electrones liberados llegan a otros átomos que los reciben quedando ionizados. La sucesión de estos fenómenos dan lugar a una cascada de ionizaciones que origina un conjunto de partículas ionizadas altamente inestables (Brewer, 2004).

Las radiaciones clasificadas como ionizantes incluyen los rayos X, rayos gamma (γ), los protones, los neutrones, las partículas alfa (α) y los haces de electrones acelerados.

Los rayos X son ondas electromagnéticas penetrantes que se originan en el interior de un tubo de vacío mediante el bombardeo con rayos catódicos (electrones de alta velocidad) de un electrodo de un metal pesado. A mayor energía, mayor poder de penetración; dicho poder de penetración aumenta con el número atómico del material sobre el que inciden y con la energía que lleven los electrones. Sin embargo, su poder de penetración a veces no es suficiente para el tratamiento de alimentos con un espesor alto y en la actualidad su empleo en la industria alimentaria no es rentable debido al elevado coste y a su baja eficacia.

Los rayos gamma provienen del cobalto radioactivo ^{60}Co o del ^{137}Cs . El ^{60}Co se obtiene por activación neutrónica del ^{59}Co . Tiene un elevado poder de penetración aunque la dosis absorbida por el material irradiado disminuye exponencialmente al aumentar el espesor del mismo, siendo la penetración inversamente proporcional a la densidad media

del producto irradiado. Su alta disponibilidad y su bajo riesgo medioambiental han hecho que hayan sido utilizados en la industria alimentaria (Aliste y col., 2000).

Los protones y las partículas alfa tienen poco poder de penetración, por consiguiente estas radiaciones no resultan prácticas para ser utilizadas en alimentos (Suárez, 2001). Se desaconseja el uso de los neutrones por dejar radioactividad residual en los alimentos.

Sin embargo, la irradiación de alimentos con haces de electrones acelerados (rayos β) presentan una gran ventaja y es que no utiliza ninguna fuente radioactiva y que la radiación se emite sólo cuando el acelerador de electrones está en marcha. Su poder de penetración varía en función de la energía del electrón pero es relativamente bajo 5-10 cm, por lo que es necesario distribuir el alimento en capas delgadas (8 cm como máximo) o aplicar un tratamiento bilateral o disponer de un sistema de volteo (Satin, 2002; Brewer, 2004). Normalmente resulta más ventajoso usar energías de hasta 10 MeV, pero en algunos casos, como la irradiación de granos o fluidos se pueden usar niveles menores (5 MeV) ya que se puede controlar el espesor de la capa para optimizar la penetración de la radiación (Cleland, 2006). Actualmente son los electrones acelerados los que presentan mayor interés en la conservación e higienización de alimentos (García-Márquez, 2015).

En la actualidad y siguiendo los criterios de la World Health Organization (WHO, 1988) los tratamientos de irradiación se clasifican según la dosis en:

Baja (hasta 1 kGy). Retrasa los procesos fisiológicos como maduración y envejecimiento de frutas frescas y vegetales. Controla la proliferación de insectos y parásitos.

Media (hasta 10 kGy). Reduce los microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos. Se utiliza básicamente para extender la vida útil de algunos alimentos.

Alta (superior a 10 kGy). Se aplica para la destrucción de bacterias esporuladas. No se utiliza de forma comercial y solo se emplea en situaciones concretas como la preparación de dietas estériles para hospitales o en vuelos espaciales.

1.5.1.1. Legislación relativa al tratamiento de irradiación

La efectividad de la irradiación en la conservación de los alimentos fue comprobada por primera vez en Estados Unidos en 1943, irradiando carne picada de vacuno con rayos X. Su uso como tecnología descontaminante de alimentos se vio impulsado con la creación

de un acelerador de electrones, que podía ser apagado o encendido según necesidad (Koch y Eisenhower, 1965).

En Europa el uso de irradiación para la conservación de alimentos fue aprobado en 1981 por un Comité mixto de Expertos de la FAO, que estableció que la irradiación (<10 kGy) de alimentos no presentaba ningún riesgo toxicológico o nutricional siempre que se hayan llevado a cabo buenas prácticas de fabricación e irradiación. Posteriormente la Unión Europea emitió dos Directivas con el fin de armonizar la legislación relativa a este tema. La primera de ellas es la Directiva 1999/2/CE relativa a la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios y de ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. En la segunda se regulan los productos alimenticios que pueden tratarse con radiaciones ionizantes y las dosis máximas que se pueden emplear (Directiva 1999/3/CE). Según dicha Directiva se pueden aplicar tratamientos de irradiación a hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales con una dosis máxima de 10 kGy.

En Estados Unidos la irradiación de alimentos se utiliza para tratar las carnes rojas, especialmente la carne picada, con el fin de reducir la contaminación por *E. coli* 0157:H7. Por citar un ejemplo en Estados Unidos el uso de la radiación ionizante en productos cárnicos está aprobada a una dosis máxima de 3 kGy para carne procedente de aves de corral, 4,5 kGy para carne refrigerada y 7 kGy para carne congelada (FDA, 2012).

En el 2003 esta tecnología fue promovida por la FAO y plasmada en el *Codex Alimentarius* y a partir de entonces ha sido bien aceptada en 50 países, sobre todo en los Estados Unidos, Egipto, China y en toda América Latina (Aymerich y col., 2008).

En Europa, aunque no está muy extendido su uso, hay países que permiten la irradiación de alimentos. En la **Tabla 7** se recogen los alimentos que pueden ser irradiados en los distintos países de la Unión Europea.

El 4 de abril de 2001 se aprobó en España el Real Decreto 348/2001 que regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes.

En cuanto al etiquetado de los alimentos irradiados, cada país establece sus propias normas. En Europa debe mencionarse en la etiqueta que el producto o sus ingredientes han sido irradiados, dicha etiqueta deberá llevar una declaración escrita indicativa del tratamiento cerca del nombre del alimento. Existe un símbolo internacional, denominado radura (**Figura 6**) aprobado para identificar en el etiquetado los alimentos que han sido sometidos a un proceso de irradiación. En España, el Real Decreto 348/2001, indica que cuando los productos se vendan en envases individuales, debe figurar la mención “irradiado

o tratado con radiaciones ionizantes” y, en el caso de los que se vendan a granel, esta mención aparecerá al lado del recipiente que los contenga. La misma denominación debe aparecer cuando se utilice un ingrediente sometido a este tratamiento.

Tabla 7. Alimentos e ingredientes alimentarios cuya irradiación está permitida en algunos países de la Unión Europea

País	Alimento
Bélgica	Patatas, cebolla, ajo, ancas de rana y gambas
Francia	Hierbas aromáticas, cebolla, ajo, hortalizas secas, frutos secos, cereales, harina de arroz, goma arábica, aves, pollo, ancas de rana, sangre, gambas congeladas, clara de huevo y caseína
Italia	Patatas, cebolla y ajo
Holanda	Legumbres, hortalizas secas, frutos secos, cereales, goma arábica, pollo, ancas de rana, gambas y clara de huevo
Reino Unido	Patata, cebolla, ajo, hortalizas, fruta, cereales, aves de corral, pescados y marisco
España	Hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales

De: Comisión Europea (2000)

Figura 6. Símbolo de radura



En Abril del 2007, la FDA publicó una propuesta para revisar sus reglamentaciones de etiquetado aplicable a los alimentos que han sido aprobados para su irradiación. La propuesta consiste en que sólo serán etiquetados los alimentos en los que la irradiación haya causado un cambio en sus propiedades organolépticas, nutricionales o funcionales (FDA, 2007). En noviembre de 2012 la FDA recoge cronológicamente los productos alimentarios que se han autorizado y las dosis permitidas (FDA, 2012).

1.5.1.2. Influencia de la irradiación en los microorganismos

Los mecanismos de inactivación de microorganismos por la irradiación se deben fundamentalmente a la aparición de lesiones en el material genético y en los lípidos de la membrana celular. Las moléculas de ADN microbiano son el principal objetivo de la irradiación, aunque también se ven afectadas la síntesis de ADN y ARN, las enzimas y la propia membrana celular (Huq y col., 2015). A su vez se produce la ionización del entorno del microorganismo, sobre todo del agua, lo que induce la formación de radicales libres, algunos de los cuales son oxidantes, favoreciendo la interacción directa e indirecta con diversos componentes celulares, como membranas y enzimas. Puede ser que estas interacciones tengan acción letal por sí mismas pero en la mayoría de los casos no lo son a menos que coexista un daño en el material genético (AESAs, 2004).

La cinética de destrucción microbiana frente al tratamiento de irradiación se ajusta a una cinética de primer orden y el parámetro que define la muerte es el valor D_{10} (dosis necesaria para reducir la población bacteriana a un 10% de la población inicial).

En la **Tabla 8**, se muestran los valores D_{10} de algunos microorganismos presentes en alimentos de origen animal tratados con irradiación.

La sensibilidad microbiana frente a la irradiación difiere con las especies y también con las cepas, pudiendo ordenarse, de más a menos resistente: virus > esporas bacterianas > bacterias Gram positivas > bacterias Gram negativas > mohos y levaduras > parásitos. Los virus son los que requieren mayores dosis de radiación para su inactivación, habiéndose descrito tratamientos de hasta 16 kGy (Salvá-Vila, 2008) y los parásitos los que menores dosis necesitan, por ejemplo *Toxoplasma gondii* puede ser inactivado de carne cruda con una dosis de 0,5 kGy y *Trichinella spiralis* con 0,3 kGy (Cammarata, 2010).

Las esporas bacterianas presentan una elevada resistencia a la irradiación debido posiblemente a su bajo contenido en humedad, inferior al 10%, frente al 70% que presentan las formas vegetativas (Dickson, 2004); por ejemplo en mortadela fueron necesarias dosis de 10 kGy para inactivar esporas de *Clostridium botulinum* (Dutra y col., 2016). En cuanto a las bacterias, las Gram positivas presentan valores D_{10} comprendidos entre 0,4 y 1 kGy, frente a los 0,1-0,4 kGy obtenidos para las Gram negativas (Cabeza y col., 2007; Cabeza y col., 2009; Cabeza y col., 2010; Cambero y col., 2012). La bacteria más sensible a la irradiación es *Pseudomonas putida* y las dosis de irradiación más elevadas son para *Clostridium sporogenes*, *Moraxella* spp., *Acinetobacter* spp., y *Deinococcus radiodurans* (Monk y col., 1995).

Tabla 8. Dosis de reducción decimal de bacterias en alimentos de origen animal

Microorganismo	D ₁₀ (kGy)
Células vegetativas	
<i>E. coli</i> O157:H7	0,23-0,35
<i>Vibrio spp.</i>	0,03-0,12
<i>Salmonella</i>	0,3-0,8
<i>Lactobacillus spp.</i>	0,3-0,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,26-0,6
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,27-1,0
<i>Bacillus cereus</i>	0,17
<i>Campylobacter jejuni</i>	0,08-0,20
<i>Clostridium botulinum</i>	0,41
<i>Clostridium perfringens</i>	0,59-0,83
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,04-0,21
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,14-0,19
<i>Moraxella phenylpyruvica</i>	0,63-0,83
<i>Streptococcus faecalis</i>	0,65-1,0
Microorganismos esporulados	
<i>Bacillus cereus</i>	1,6
<i>Clostridium botulinum</i> tipo A y B	1,0-3,6
<i>Clostridium botulinum</i> tipo E	1,25-1,40
<i>Clostridium sporogenes</i>	1,5-2,2

De: Farkas (2006)

Dentro de los microorganismos patógenos asociados a los productos RTE, es importante destacar que la radiorresistencia *Listeria* y *Salmonella* spp. es muy similar, habiéndose publicado valores D₁₀ máximos en carne de 1 y de 0,8 kGy respectivamente (Farkas, 2006). También es importante destacar en productos RTE a *E. coli* O157:H7, la cual es más sensible que las bacterias anteriores dosis de 0,72 kGy son suficientes para eliminar su presencia en jamón ibérico (Cambero y col., 2012).

En cualquier caso es necesario optimizar al máximo los tratamientos con radiaciones ionizantes buscando siempre un equilibrio entre la dosis adecuada para reducir

los patógenos y los posibles efectos secundarios adversos, como la modificación de las propiedades sensoriales, la pérdida de nutrientes o la generación de los fenómenos oxidativos.

1.5.1.3. Influencia de la irradiación en las propiedades físico-químicas de los alimentos

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAN, 2005) informó que el consumo de alimentos irradiados es seguro siempre que este tratamiento se realice con dosis inferiores a 10 kGy. Posteriormente, se emitió otro informe específico para carne y productos cárnicos donde indica que dosis entre 1 y 10 kGy son seguras para su uso en carne sin cocinar, refrigerada y no refrigerada y sus derivados (AESAN, 2013).

Aunque la irradiación sea segura no hay que olvidar que, produce cambios químicos, nutritivos y organolépticos que se comentan a continuación.

Cambios químicos

Cuando un compuesto se irradia, los átomos y/o las moléculas se ionizan (*efecto primario*) y se forman radicales libres. Dichos radicales dan lugar a reacciones secundarias de dimerización, recombinación o captura de electrones generándose compuestos que no estaban presentes en la composición inicial (*efecto secundario*) cuya formación y desaparición continúa en el alimento hasta la formación de compuestos estables (Ordóñez y col., 1998).

Al conjunto de estos dos procesos se le denomina radiólisis y depende de la dosis de irradiación absorbida, de la composición del alimento y de las condiciones del procesado. Una de las reacciones más significativas es la radiólisis del agua, que da lugar a compuestos altamente reactivos como radicales hidroxilo, dióxido de hidrógeno o hidrógeno atómico. Un factor a tener en cuenta en este sentido es la temperatura a la que se encuentra el alimento durante el proceso de irradiación, ya que cuando el producto está congelado, los compuestos reactivos formados quedan atrapados en su interior, pero cuando el alimento se descongela, se liberan pudiendo producir cambios en el alimento (Dickson, 2004).

La irradiación de las proteínas provoca su desnaturalización y la aparición de aminoácidos libres, compuestos carbonilo, amonio y peróxido. Los aminoácidos aromáticos y los azufrados son los más sensibles, experimentando modificaciones en su estructura anular y dando lugar a nuevos compuestos que pueden utilizarse como marcadores de alimentos irradiados (Suárez, 2001; Marchioni, 2006).

La irradiación de lípidos acelera el proceso de oxidación lipídica. Los compuestos que se generan durante la irradiación son principalmente alcanos y alquenos, ésteres, peróxidos y óxidos de colesterol. Su formación se potencia si la radiación y posterior almacenaje tienen lugar en presencia de oxígeno. Por ello es importante que los alimentos irradiados que posean un alto contenido en lípidos sean almacenados a vacío (Ohlsson, 2000). Algunos de los compuestos que se forman han sido propuestos como indicadores de irradiación, en este sentido, las alquil-ciclobutanonas que, a pesar de que se producen a baja concentración, su presencia es concluyente para saber si un alimento ha sido irradiado o no (Directiva 1999/2/CE; Zanardi y col., 2007; Barba y col., 2010).

La irradiación produce la rotura de los carbohidratos de alto peso molecular en pequeñas unidades, favoreciendo un aumento de los azúcares reductores, lo que facilita el desarrollo de las reacciones de pardeamiento (Fan y Sokorai, 2008). Marchioni (2006) observó un ablandamiento en frutas y verduras debido a la ruptura de las pectinas y almidones.

Pérdida de vitaminas

El orden decreciente de sensibilidad de las vitaminas hidrosolubles a la irradiación es el siguiente: tiamina, ácido ascórbico, piridoxina, riboflavina, ácido fólico, cobalamina y ácido nicotínico y el de las liposolubles es: vitamina E, A, K y D. De todos modos, las pérdidas de vitaminas radiosensibles no suelen superar el 15% valores similares a los que se producen cuando se aplican los métodos tradicionales de conservación (EFSA, 2011). Las pérdidas de vitaminas se pueden minimizar controlando las condiciones de almacenamiento (Grolichová y col., 2004; Ahn y col., 2013).

Cambios organolépticos

A dosis mayores de 10 kGy se pueden ver comprometidas algunas características sensoriales del producto como el sabor, el color y la textura. Además pueden aparecer sabores u olores típicos a irradiado, debido a la formación de radicales libres a partir de los lípidos y proteínas presentes en el alimento (AESAs, 2005).

En el caso del olor el cambio es mayor inmediatamente después del proceso de irradiación pues aparece un aroma típico, que se va perdiendo a lo largo del tiempo de almacenamiento o durante el cocinado. Parece ser que durante la irradiación a dosis superiores a 1,5 kGy se generan compuestos azufrados que son responsables de este olor característico a irradiado (Yan y col., 2006). Patterson y Stevenson (1995) identificaron este compuesto azufrado como el dimetilsulfuro. Este compuesto es muy volátil, por tanto se evapora y se libera rápidamente una vez que el envoltorio se abre (Brewer, 2009).

El color del producto también puede verse afectado, aunque el efecto es diferente según la especie animal. Por ejemplo en el caso de la ternera se produce un oscurecimiento posterior al tratamiento debido a que la que la mioglobina presente en la carne reacciona con los radicales libres formados durante el proceso de irradiación formando metamioglobina. En el caso del pollo y el cerdo, la carne toma un color rosado tras el tratamiento de irradiación debido a la formación de carboximioglobina (Nam y Ahn, 2002).

Con el objetivo de minimizar la formación de olores y sabores anómalos durante el proceso de irradiación algunos autores recomiendan: irradiar productos congelados (Diehl, 1995), añadir antioxidantes como la vitamina E (Romero y col., 2005) o el ácido ascórbico (Giroux y col., 2001) y envasar el producto a vacío (Du y col., 2000) o en atmósferas modificadas (Loaharanu, 2003; Lacroix y Lafortune, 2004).

Es primordial elegir cuidadosamente la dosis que nos permita alcanzar la seguridad microbiológica y que a su vez no produzca cambios importantes en las características sensoriales de los productos cárnicos, que llevarían a rechazar el alimento irradiado por parte del consumidor.

1.5.1.4. Ventajas e inconvenientes del uso de las radiaciones ionizantes

La irradiación es uno de los métodos de conservación de alimentos más estudiado pero también uno de los menos aceptados por parte de los consumidores. Posiblemente sea debido a que se asocia la radiación de alimentos con el término “radioactivo”. Es necesario informar al consumidor de las ventajas que presenta este método de conservación frente a otros ya instaurados. Entre otras se podrían citar:

- La irradiación puede evitar o remplazar el uso de tratamientos químicos.
- Es un tratamiento muy versátil ya que puede aplicar en alimentos presentados en envases pequeños o a granel, congelados o a temperatura ambiente. Se puede aplicar en envases con distintos tipos de plástico (PE, PET, PVC), papel o cartón (Calderón, 2000).
- No produce residuos tóxicos en los alimentos, ni los hace radioactivos (Cammarata, 2010).
- A las dosis en las que se aplica a los alimentos mantiene la frescura y la calidad nutricional por lo que se obtienen alimentos con la apariencia de alimentos frescos (Narvaiz, 2015).
- Es una tecnología que puede ser combinada con otros métodos (Roberts, 2014).

Por el contrario, no todos los alimentos son adecuados para ser tratados por irradiación. La leche por ejemplo adquiere un sabor desagradable y en general, la carne, el pollo y el pescado, solo admiten determinadas dosis para que las características organolépticas no se vean alteradas. Por otra parte no desactiva enzimas ni toxinas. Tampoco es apropiado el uso de la irradiación en alimentos con alto contenido en grasas, pues se forman compuestos como óxidos de colesterol. Por último una de las mayores desventajas de este método, es el elevado coste de la instalación requerida para su empleo, más alto que el de otros métodos (Cammarata, 2010).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que, a pesar de las desventajas que se le atribuyen, la irradiación de alimentos se ha utilizado durante más de 40 años, sin haber sido asociada con algún riesgo para la salud de los consumidores (Rossi y col., 2009).

1.5.1.5. Aceptación del consumidor de los alimentos irradiados

En algunos estudios realizados al respecto, se refleja la desconfianza del consumidor a la irradiación de los alimentos (Rossi y col., 2009). Dicha desconfianza del consumidor se debe a la relación que establece entre el término irradiación con “nuclear”. El resultado es que la irradiación de alimentos se ha venido considerando como una tecnología de último recurso y ha quedado relegada a ser aplicada cuando todas las demás fallaban y se tenía que recurrir a las radiaciones ionizantes para superar el problema. El caso más emblemático quizás sea el de las hierbas aromáticas y especias, cuya descontaminación no era posible mediante las tecnologías convencionales y antes de la década de 1980 se recurrió al óxido de etileno para su descontaminación pero, al prohibirse el uso de ese agente bactericida (Directiva 1986/355/CEE), la única opción que quedaba era la irradiación.

A pesar de que el Comité Científico de la Alimentación Humana (CCAH) expresó su opinión favorable sobre la irradiación de frutas, hortalizas, cereales, tubérculos amiláceos (patatas), condimentos y especias, pescados, moluscos, carnes frescas de ave, queso camembert de leche cruda, ancas de rana, caseína/caseinatos, clara de huevo, copos de cereales, harina de arroz y productos sanguíneos (AESAN, 2013); en España hasta el momento solo se puede irradiar hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales.

Así el uso de la irradiación en productos cárnicos no está muy extendido en la mayoría de países, actualmente solo existen 50 alimentos o productos alimenticios irradiados comercializados en 60 países (Singh y col., 2016). Además, la AESAN (2013)

concluye en el caso de la carne: “no parece existir un efecto adverso de la radiación ionizante sobre las características nutricionales de la carne no refrigerada, a dosis máximas de 4,5 kGy. En dosis superiores a 10 kGy tampoco parece haber cambios nutricionales, en comparación con alimentos esterilizados por calor”. La difusión de esta información ayudaría a los consumidores a cambiar su actitud negativa y sus temores hacia los alimentos irradiados en general y se podría comenzar a trabajar de una forma más amplia con la irradiación. La prueba palpable del éxito de la educación de la población en materia de irradiación de alimentos, está en Estados Unidos y Canadá, donde la aceptación de los productos irradiados ha aumentado rápidamente tras campañas de educación e información sobre irradiación de alimentos (Morehouse y Komolprasert, 2004).

1.6. Productos cárnicos irradiados

La carne presenta un elevado contenido en nutrientes y en agua, por ello proporciona un entorno excelente para el crecimiento y multiplicación de microorganismos patógenos, lo que le hace ser un alimento con una vida útil muy corta (Feng y col., 2016). La eficiencia de la irradiación en carne fresca y productos cárnicos listos para consumir ha sido demostrada en diversos artículos científicos; algunos de ellos se recogen en la **Tabla 9**.

Existen estudios que aseguran que los efectos adversos de la irradiación de productos cárnicos son muy bajos en comparación con otros métodos de conservación, pero durante la irradiación de carne y productos cárnicos se producen algunos cambios de calidad que han limitado la adopción de esta tecnología por la industria de la carne; por ejemplo se ha reportado formación de olores desagradables descritos como “metálico” o “quemado” que se sospecha es causada principalmente por una degradación radiolítica de cadenas laterales de aminoácidos (Ahn y Lee, 2006) o cambios de color, aunque éstos pueden variar dependiendo de factores tales como la dosis, especie animal, tipo de músculo y el tipo de empaquetado (Lee y Ahn, 2005).

También se ha descrito la pérdida de agua y cambios en textura que podrían ser debidos a destrucción en la membrana de las fibras musculares y desnaturalización de proteínas del músculo, así como, pérdida de nutrientes como algunas vitaminas sensibles a la irradiación como la B₁ y C (Ahn y Lee, 2006).

Tabla 9. Recopilación de trabajos realizados sobre irradiación de carne y productos cárnicos

Producto cárnico	Dosis de irradiación (kGy)	Referencia
Pechuga pollo	0-4	Al-Bachir y Mehio, 2001
Pechuga pollo	1-1,8	Lewis y col., 2002
Pechuga pollo	2,2-2,9	Yoon, 2003
Pechuga pavo	0; 1; 2	Zhu y col., 2004
Pepperoni	5; 10; 20	Kim y col., 2005
Jamón cocido	1; 2,5	Cabeza y col., 2007
Salchichones	1; 2,5	Cabeza y col., 2009
Hamburguesas de ternera	Hasta 20	Park y col., 2010
Carne de ternera	Hasta 15	Stefanova y col., 2011
Pollo	0,3	Xiao y col., 2011
Salchichones	2-4	Galán y col., 2011a
Mortadelas	2-4	Galán y col., 2011b
Carne de cerdo	1,2	García-Márquez y col., 2012
Carne de cerdo	1,2	García-Márquez y col., 2013
Carne de avestruz	0,5-4	Jouki y Yazdi, 2014
Carne de pavo	1,5-4,5	Feng y col., 2016
Salchichones	2,5-10	Ham y col., 2017

Además la irradiación puede generar sustancias químicas oxidativas, como radicales hidroxilo capaces de oxidar lípidos de la carne, especialmente en sistemas líquidos y dado que en la carne existe un 75% o más de agua, la oxidación inducida por la irradiación no es despreciable (Chen y col., 2012). Para intentar paliar los efectos adversos de la irradiación sobre los productos cárnicos se han adicionado diferentes aditivos, algunos de ellos se recogen en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Aditivos añadidos a productos cárnicos irradiados

Aditivo	Carne	Resultado	Referencia
Extracto de romero	Pavo	Disminuye los niveles de TBARS en carne irradiada	Fan y col., 2004
Nitrito	Pavo	Disminuye los niveles de TBARS en carne irradiada	Fan y col., 2004
Sésamo	Pavo	Disminuye los niveles de TBARS y los olores en carne irradiada	Lee y Ahn, 2005
Té verde	Pollo	Los catadores no encuentran diferencias entre la carne irradiada y la no irradiada	Rababah y col., 2005
Extractos de ajo y cebolla	Ternera	El ajo y la cebolla enmascaran los olores típicos a irradiado	Yang y col., 2011
Tocoferol	Pollo	Reduce la oxidación lipídica en carne irradiada	Yim y col., 2015

Consideraciones finales

En la sociedad actual, resulta evidente la importancia de los productos cárnicos funcionales dentro del sector cárnico. Hoy en día, la incorporación de compuestos bioactivos es la estrategia más importante en su desarrollo y entre los de mayor interés en la actualidad se encuentran los antioxidantes que al reducir o minimizar el estrés oxidativo a nivel celular, contribuyen a la reducción del riesgo de enfermedades tan relevantes como las cardiovasculares, enfermedades neurológicas degenerativas y algunos tipos de cáncer. Uno de los antioxidantes más importantes es el licopeno, un carotenoide que se encuentra principalmente en el tomate que es una de las hortalizas de mayor producción en España.

Tanto los científicos como los profesionales de la salud y las organizaciones de consumidores están cada vez más implicados en el aprovechamiento y la optimización de los recursos naturales y de los derivados de procesamiento de los alimentos. En este sentido, la industria del tomate genera una elevada cantidad de residuos y excedentes con un alto valor potencial como fuente de compuestos bioactivos y cuya eliminación supone un coste adicional en la industria procesadora.

El trabajo que se presenta es una contribución en esta línea y trata del aprovechamiento y la utilización de los residuos de la industria del tomate, ricos en licopeno, mediante su incorporación a los productos cárnicos convencionales. Sin

embargo, su preparación como alimentos RTE se perfila como una vía muy interesante ya que contribuye a abrir un abanico de posibilidades de nuevos productos que aportan un valor añadido a los ya existentes y mejoran la imagen que los productos cárnicos tienen en la sociedad actual, potenciando así su consumo.

En esta línea, el equipo de investigación en el que se ha desarrollado el presente trabajo ha formulado con anterioridad productos cárnicos funcionales enriquecidos en licopeno mediante la incorporación de piel de tomate seca y desarrolló la patente: “Productos cárnicos y de la pesca enriquecidos en licopeno mediante la adición de piel de tomate” (Calvo y col., 2007). Dicha invención describe el procedimiento de fabricación de productos cárnicos y de la pesca, frescos, cocidos y madurados, enriquecidos en licopeno mediante la adición de piel de tomate seca y molida procedente del subproducto de la industria de fabricación de productos derivados del tomate y del excedente agrícola de la producción de tomate fresco.

Así mismo, se estudió la viabilidad tecnológica y sensorial de productos cárnicos enriquecidos, tanto frescos (hamburguesas) como madurados (salchichones), a los que se incorporaban diferentes cantidades de piel de tomate seca.

Como resultado de dichas investigaciones, se publicaron los siguientes trabajos en revistas científicas:

1. Calvo, M. M., García, M. L., & Selgas, M. D. (2008). Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel. *Meat Science*, 80, 167-172.
2. García, M. L., Calvo, M.M., & Selgas, M. D. (2009). Beef hamburgers enriched in lycopene using dry tomato peel as an ingredient. *Meat Science*, 83, 43-48.
3. Selgas, M. D., García, M. L., & Calvo, M. M. (2009). Effects of irradiation and storage on the physico-chemical and sensory properties of hamburgers enriched with lycopene. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1983-1989.

Con estos antecedentes, y gracias al Ministerio de Educación y Ciencia que me otorgó una ayuda predoctoral de Formación de Personal Investigador de referencia BES-2008-002473, me incorporé al mencionado equipo de investigación para continuar con el estudio iniciado. El trabajo que aquí se presenta recoge las investigaciones realizadas con tal fin.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La industria del tomate representa un gran peso en la economía española; es la segunda a nivel mundial por detrás de Italia (Mercasa, 2016). El problema que conlleva este tipo de industria es la generación de gran cantidad de residuos y excedentes. La legislación actual (Ley 22/2011) obliga a las industrias a hacerse cargo de la eliminación de dichos residuos. Sin embargo, algunos de ellos son ricos en compuestos bioactivos, entre los que se encuentran los carotenoides y, entre ellos, el licopeno. Una posible alternativa al aprovechamiento tradicional de los subproductos y excedentes de la industria del tomate es la obtención de los mencionados compuestos bioactivos para su utilización en la industria alimentaria.

El licopeno es un pigmento natural sintetizado exclusivamente por plantas y microorganismos. Posee una elevada acción antioxidante que le confiere numerosos efectos saludables frente a muchas enfermedades como las cardiovasculares, hipertensión, alzheimer, enfisema pulmonar, infertilidad masculina, osteoporosis y algunos tipos de cáncer (Rao y Rao, 2007).

Por otra parte, la carne y los productos cárnicos son uno de los alimentos más abundantes de la dieta de los países desarrollados. En la actualidad, en el sector cárnico se está innovando para conseguir lanzar al mercado nuevos productos en los que su composición se haya modificado de alguna manera con el fin de que el producto resultante se ciña, cada vez más, a las nuevas orientaciones nutricionales. Para ello se han desarrollado diferentes estrategias entre las que se encuentran disminuir el contenido graso, la reducción de los niveles de colesterol o la adición de compuestos saludables como: fibra, ácidos grasos poliinsaturados o compuestos con propiedades antioxidantes como el licopeno. Estas estrategias han dado lugar al desarrollo de productos cárnicos funcionales o más saludables, que cada vez tienen una mayor aceptación en la sociedad actual.

Es importante tener en cuenta, además, que existe una creciente demanda de productos preparados o semipreparados que pueden ser consumidos en poco tiempo y prácticamente sin tratamiento culinario. Estos alimentos son los conocidos como Listos para el Consumo o Ready To Eat (RTE). Su preparación conlleva operaciones como el loncheado o el troceado, que favorecen el riesgo potencial de una contaminación microbiológica. Por este motivo, se hace necesario higienizar el producto RTE antes de que llegue al consumidor. Para ello se ha impuesto el uso de tecnologías no térmicas de conservación que permitan asegurar la calidad microbiológica del alimento sin apenas modificar las características sensoriales que le son propias. La aplicación de radiaciones

ionizantes se presenta como una alternativa eficaz para conseguir este objetivo y alargar la vida útil de los alimentos.

Por todo ello, resulta muy atractivo e interesante desarrollar nuevos productos cárnicos enriquecidos en licopeno, cuyas características tecnológicas y sensoriales se asemejen lo más posible al producto cárnico convencional. Así mismo, teniendo en cuenta las nuevas tendencias de consumo, resulta de interés su transformación en productos RTE.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los productos cárnicos son matrices complejas en las que coexisten nutrientes de distinta naturaleza entre los que se pueden establecer múltiples y a veces complejas interacciones. Dichas interacciones o incluso el procesado del alimento puede provocar la pérdida de la capacidad funcional del ingrediente adicionado. Dado que se pretende añadir un compuesto con propiedades antioxidantes, el licopeno, a un producto que va a ser sometido a radiaciones ionizantes; se considera que es de interés conocer cómo afecta la irradiación a la capacidad antioxidante de ese carotenoide. Además se considera que es importante saber cuál es la cantidad de licopeno que estaría disponible para realizar la función para la que ha incorporado.

Por lo anteriormente expuesto, el **objetivo** de este trabajo es diseñar nuevos productos cárnicos funcionales mediante la incorporación de derivados del tomate (piel de tomate seca y tomate desuerado y desecado) como fuente de licopeno y estudiar su viabilidad como productos RTE mediante la aplicación de radiaciones ionizantes. Así mismo, se pretende conocer el efecto de la irradiación en el potencial antioxidante de los derivados de tomate incorporados y la accesibilidad del licopeno a partir de los productos cárnicos diseñados.

Para ello se han planteado los siguientes **objetivos parciales**:

- Desarrollar productos cárnicos enriquecidos en licopeno mediante la incorporación de derivados del tomate (piel de tomate seca y tomate desuerado y desecado) procedentes de subproductos y excedentes de la industria tomatera.
- Estudiar la viabilidad tecnológica de dos derivados de tomate como ingrediente funcional en productos cárnicos frescos y madurados, tanto convencionales como RTE.
- Evaluar los posibles cambios en las características sensoriales y en los parámetros físico-químicos de los productos cárnicos provocados por la adición del ingrediente funcional, por el tratamiento de irradiación o por la combinación de ambos.
- Conocer la vida útil de los productos cárnicos diseñados y los cambios en la concentración de licopeno a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Justificación y objetivos

- Estudiar la influencia de la irradiación en la isomerización y degradación del licopeno contenido en los derivados del tomate estudiados; analizar cómo influye este tratamiento en la capacidad antioxidante del licopeno.

- Estimar la cantidad de licopeno que quedaría disponible para su absorción tras la digestión gastrointestinal de los productos cárnicos diseñados, tanto convencionales como RTE.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material general de laboratorio y Planta Piloto

3.1.1. Material general

El material de vidrio empleado fue de tipo Pyrex. El utilizado para la extracción y conservación del licopeno fue de color ámbar.

Las pipetas automáticas utilizadas fueron Pipetman® P de Gilson de 20, 200, 1000 y 5000 µl (Wisconsin, Estados Unidos).

El agua destilada se obtuvo de un destilador Millipore Elix Essential 3 (Massachusetts, Estados Unidos) que proporciona agua con una resistividad del orden de 15 MΩ.

Las pesadas se realizaron en granatarios monoplato Kern 440-35N (Stuttgart, Alemania) y en una balanza analítica Sartorius 2443 (Hannover, Alemania).

Las muestras se almacenaron en refrigeradores Philco (Tokio, Japón) y Fagor (Guipúzcoa, España) y en arcones congeladores Liebherr (Bulle, Suiza).

El hielo triturado se obtuvo de una máquina de hielo Scotsman AF-100 (Illinois, Estados Unidos).

La homogenización de las muestras para análisis químico se realizó en un homogenizador Polytron PT 10-35 (Taquara, Brasil).

Los agitadores magnéticos dotados de calefactor fueron Selecta-Agimatic N (Rothenberg, Alemania) y Thermolyne-Nuova II (Barcelona, España).

El pH se midió con un pH-metro Crison Mod. 2001. El calibrado se llevó a cabo con soluciones de pH 7 y 4. Todo de Crison Instruments (Barcelona, España).

La determinación de la a_w se llevó a cabo en un higrómetro de punto de rocío Decagón CX-1 (Washington, Estados Unidos).

La temperatura en el interior de las muestras se midió con un termómetro digital Testo Mod.735 (Munich, Alemania).

La homogeneización de las muestras para los análisis microbiológicos se realizó en un Stomacher 400 (Colworth, Reino Unido). Se utilizaron bolsas de plástico estéril con filtro de Sterilin Limited (Birmingham, Reino Unido).

Las esterilizaciones se realizaron en un autoclave Selecta Autotester 43-G (Barcelona, España).

La incubación de microorganismos se efectuó en estufas Heraeus Mod. B-6200 (Hanau, Alemania) programadas a la temperatura deseada.

Durante el estudio de bioaccesibilidad se homogeneizaron las muestras en un homegeneizador UltraTurrax T18 Basic IKA (Staufen, Alemania).

La agitación de las muestras se realizó en un incubador orbital Infors AG CH-4103 (Bottmingen, Suiza).

La centrifugación de las muestras se llevó a cabo en un equipo Sorvall RC-5B (Newtown, Estados Unidos) equipado con rotores GSA, GS3 y S600.

La evaporación de los disolventes orgánicos se hizo utilizando un rotavapor Büchi R-200 (Flawil, Suiza).

La cuantificación de licopeno se hizo en un espectrofotómetro UV-Vis Hitachi U-200 (Tokyo, Japón).

El color de las muestras se determinó con un colorímetro digital Minolta Chroma Meter CR-400 (Minolta Co., Osaka, Japón). La calibración se hizo con una placa de color blanco y otra rosa cuyas coordenadas eran: $L^* = 96,94$, $a^* = 0,16$, $b^* = 2,02$ y $L^* = 44,88$, $a^* = 25,99$, $b^* = 6,67$ respectivamente.

Para el estudio de la textura se utilizó un texturómetro Stable Micro System Mod. TA.XT 2i/25 (Surrey, Reino Unido). Para realizar el Análisis de Perfil de Textura (APT) las muestras se colocaron sobre una plataforma de aluminio Mod. HDP/90. Para la compresión se utilizó una sonda cilíndrica de 25 mm de diámetro Mod. P725.

La dosis de irradiación recibida por las muestras se determinó con dosímetros de triacetato de celulosa CTA-125 (Fuji, Japón).

3.1.2. Material de la Planta Piloto

3.1.2.1. Material utilizado para la elaboración de los derivados de tomate

Para separar la piel del tomate se utilizó una máquina tomatera Palumbo Pavi TX (Pamigliano D'Arco, Italia).

La liofilización de los derivados del tomate se llevó a cabo en un liofilizador Virtis FM12XL (Milán, Italia).

Para triturar las muestras de los derivados del tomate liofilizados se utilizó un robot de cocina Thermomix Vorwerk Mod. TM31 (Madrid, España).

El envasado a vacío se hizo en una envasadora Vapta Mod. Euvac (Humanes de Madrid, España).

Para el envasado al vacío se usaron bolsas laminadas de baja permeabilidad a los gases ($35 \text{ cm}^3/24 \text{ h m}^2$ bares para el oxígeno y $150 \text{ cm}^3/24 \text{ h m}^2$ bares para el dióxido de carbono) suministradas por Plastiñi (La Rioja, España).

3.1.2.2. Material utilizado para la elaboración de los productos cárnicos

La picadora usada en la elaboración de los productos cárnicos fue una Fals Co. 10 Grinder (Barcelona, España).

La mezcla de la carne con las especias o con los derivados del tomate se realizó en una amasadora Mainca RX (Barcelona, España).

La embutición de los productos cárnicos se realizó en una embutidora Cato (Sabadell, España) de 70 l de capacidad.

La mezcla de especias para los productos cárnicos madurados fue Salavi® (Anvisa, Arganda del Rey, España).

Se utilizaron tripas artificiales de 55 mm de diámetro de Betex-Pack S.A. (San Sebastián de los Reyes, España).

La maduración de los productos cárnicos se hizo en una cámara climática Binder KBF Mod. 115-720 (Tuttlingen, Alemania).

El loncheado se llevó a cabo en una loncheadora Beckers Italy DOM (Treviglio, Italia).

El cocinado de las hamburguesas se realizó en una plancha de cocina Princess 102300 (Georgia, Estados Unidos) previamente calentada a 180°C .

3.1.3. Material y reactivos utilizados para la cuantificación del licopeno y sus isómeros. Determinación de la actividad antioxidante

Para la cuantificación del licopeno y sus isómeros se usó un equipo de HPLC de Merck-Hitachi (Darmstadt, Alemania) con un horno de columna de la marca JASCO (Grob-Umstadt, Alemania) y un detector UV-visible fotodiodo array Mod. L-7450 de Merck-Hitachi (Darmstadt, Alemania). La inyección de las muestras se llevó a cabo por medio de un inyector Dionex (Baviera, Alemania) con un loop de 20 μl .

Las columnas utilizadas para cuantificar el licopeno total fueron una columna C_{30} Trentec Stability (250 x 4,6 mm, de 5 μm de tamaño de partícula) (Rutesheim, Alemania) y una pre-columna C_{18} ProntoSil 120-5-C18 H (10 x 4 mm, 5 μm) (Leonberg, Alemania). Para la cuantificación de los isómeros se utilizó la misma pre-columna, pero la columna

empleada fue una C₃₀ en fase reversa (250 x 4,6 mm y 5 µm de tamaño de partícula) de YMC Europa (Dinslaken, Alemania).

El citofluorímetro utilizado para la cuantificación de las EROs fue de Millipore Corp. Mod. 2300/2350 (Massachusetts, Estados Unidos).

Para el Western-blot se utilizó un equipo de electroforesis Sequi-Gen GT System, Bio-Rad (California, Estados Unidos) y geles de poliacrilamida Mini-Protean II de Bio-Rad (California, Estados Unidos).

Para cuantificar las proteínas presentes en la membrana de nitrocelulosa se utilizó un densitómetro Bio-Rad GS-800 (California, Estados Unidos).

La columna de bio-gel usada para purificar la sonda de ADN fue de MicroBIO-Spin (California, Estados Unidos).

El gel obtenido en el ensayo de movilidad reducida fue revelado por fosfofluorescencia en el equipo STORM 840 y la intensidad de las bandas fue cuantificada por el software Image QuaNT, ambos de Molecular Dynamics (California, Estados Unidos).

3.1.4. Reactivos, disolventes y medios de cultivo

Los reactivos utilizados fueron suministrados por las firmas Panreac (Barcelona, España) y Sigma-Aldrich (Oregón, Estados Unidos).

Los medios de cultivo fueron de Oxoid (Hampshire, Reino Unido).

El medio utilizado para el crecimiento de la línea celular RAT-1 fue Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (100 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de penicilina y suplementado con suero fetal 10% p/v y glutamina 2mM) de Sigma Aldrich (Oregón, Estados Unidos).

Los disolventes utilizados en cromatografía líquida fueron de “grado HPLC” y el proveedor fue Bioscan (Gliwice, Polonia).

El compuesto metil *ter*-butil éter (MTBE) utilizado como disolvente en el HPLC fue de Sigma-Aldrich (Oregón, Estados Unidos).

El reactivo fluorescente diacetoximetilester (C-2938) utilizado para la cuantificación de las EROs fue de Molecular Probes (Oregon, Estados Unidos).

El tetrahidrofurano utilizado para la obtención de los extractos de los derivados de tomate fue de Sigma-Aldrich (Oregón, Estados Unidos).

La membrana de nitrocelulosa (162-0147) a la que se transfirieron las proteínas fue de Bio-Rad (California, Estados Unidos). La membrana de transferencia usada para la

determinación de la subunidad p65 fue de Millipore Corporation (Massachusetts, Estados Unidos).

Las membranas de transferencia fueron reveladas por quimioluminiscencia con el kit ECL (Enhanced Chemiluminescence) Western Blotting Analysis System de Amersham (Bucks, Reino Unido).

3.1.5. Material biológico

Las enzimas utilizadas en el estudio de accesibilidad del licopeno fueron: α -amilasa (EC 232-565-6), pepsina (EC 232-629-3), pancreatina porcina (EC 232-468-9), lipasa pancreática (EC 232-619-9), colipasa (EC 259-490-1), colesterol esterasa (EC 232-808-6), fosfolipasa A2 (EC 232-637-7); todas ellas de Sigma-Aldrich (Oregón, Estados Unidos).

La línea celular utilizada fue RAT-1, de American Type Culture Collection (Maryland, Estados Unidos).

En la electroforesis se utilizó la proteína C1992 de Sigma Aldrich (Oregón, Estados Unidos) como control.

Para la cuantificación proteica, previa al Western-blot, se utilizó albúmina bovina (EC 232-936-2) de Sigma-Aldrich (Oregón, Estados Unidos).

Para el desarrollo del Western-blot se utilizaron los anticuerpos primarios monoclonales anti-p38 (clone C-20, Cat. N° SC-535), anti p-p38 (clone D-8, Cat. N° 7973), anti-ERK1/2 (clone K-23, Cat. N° SC-94), anti p-ERK1/2 (clone E-4, Cat. N° SC-7383), anti-JNK (clone C-17, Cat. N° SC-474), anti-p-JNK (clone G-7, Cat. N° SC-6254), anti-Nox-4 (clone N-15, Cat. N° SC-21860), anti-Cox-2 (clone C-20, Cat N° 1745), anti-p65 (clone 49. Ser 311, Cat. N° SC-135769) y los anticuerpos policlonales anti-hsp 70 (clone K-20, Cat N° SC-1060 cabra) y el anti-hsp 90 α (clone C-20, Cat. N° SC-8262 cabra). Todos ellos fueron de Santa Cruz Biotechnology (California, Estados Unidos).

Los anticuerpos secundarios anti-Ig G de conejo y de ratón marcados con peroxidasa fueron de Amersham Pharmacia Biotechnology (Chicago, Estados Unidos).

La enzima polinucleótido quinasa y la sonda de ADN (5'-AGTTGAGGGACTTTCAGGC-3') utilizadas durante el estudio de movilidad electroforética fueron de Sigma-Aldrich (Oregón, Estados Unidos).

3.2. Métodos

3.2.1. Obtención de los derivados de tomate

El trabajo se ha realizado con dos derivados de tomate: piel de tomate seca (PTS) y tomate desuerado y desecado (TDD). Los tomates se adquirieron en un comercio local utilizando la variedad “pera”. La obtención de dichos derivados se efectuó varias veces a lo largo de la realización de la parte experimental de la presente Tesis para evitar la degradación del licopeno durante el almacenamiento.

La PTS se obtuvo siguiendo el método descrito por Calvo y col. (2008). Para ello, los tomates se lavaron con agua y se separó su piel utilizando una máquina tomatera. En la **Figura 8** se muestra una imagen de la piel de tomate obtenida.

Figura 8. Piel de tomate



Posteriormente, se liofilizó y trituró la piel en un robot de cocina Thermomix hasta conseguir un tamaño de partícula de 0,025-0,05 mm. El polvo obtenido se introdujo en frascos topacio con tapón de rosca para mantener las muestras en oscuridad y se almacenó a -30°C hasta su uso.

Con el fin de obtener el TDD, los tomates lavados se trituraron en un robot de cocina Thermomix; a continuación, se centrifugaron a 7000 g durante 15 min a 5°C. El sedimento resultante se liofilizó, trituró y posteriormente se almacenó tal como se ha descrito para la PTS. En la **Figura 9** se muestra un resumen del proceso de obtención de los derivados de tomate.

Figura 9. Esquema del proceso de obtención de los derivados de tomate

3.2.2. Elaboración de productos cárnicos

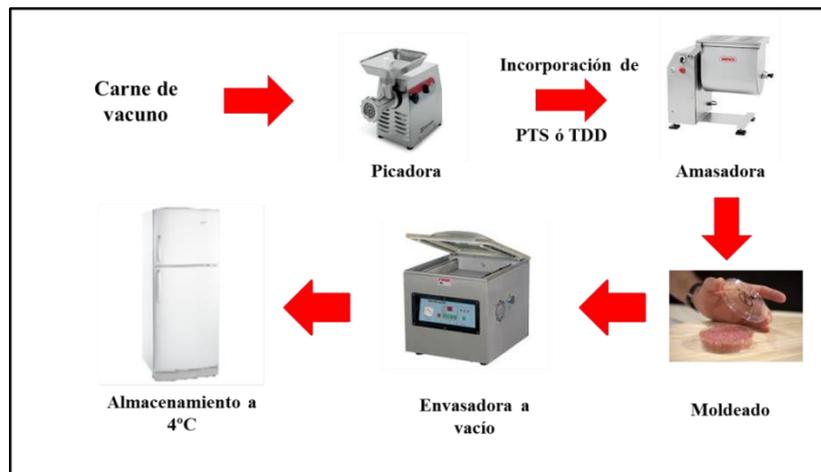
La elaboración de productos cárnicos se llevó a cabo en la planta piloto del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

3.2.2.1. Elaboración de productos cárnicos frescos

Como modelo de este tipo de producto se utilizó la hamburguesa y para su elaboración se utilizó carne de vacuno adquirida en un comercio local. El picado de la carne se realizó en una picadora, a la que se le acopló una placa con orificios de salida de 3 mm. Una vez picada a la carne se le añadieron distintas cantidades, entre 1 y 6% (p/p) de la piel de tomate seca o del tomate desuerado y desecado. La carne y los derivados del tomate se mezclaron en una amasadora a baja velocidad (90 rpm) durante 5 min hasta conseguir una distribución homogénea. En todas las fabricaciones se elaboró un lote sin derivados de tomate al que se denominó control. Todos los lotes se elaboraron por triplicado.

Posteriormente se tomaron porciones de 60 g y se moldearon en una placa Petri; de esta manera se obtuvieron hamburguesas de 1 cm de altura y 9 cm de diámetro. Tras el moldeado, se introdujeron en bolsas de plástico, se envasaron a vacío y se almacenaron en refrigeración (4°C) hasta su uso protegiéndolas de la luz con papel aluminio. En la **Figura 10** se muestra un esquema del proceso de elaboración de los productos cárnicos frescos.

Figura 10. Esquema del proceso de elaboración de los productos cárnicos frescos



3.2.2.2. Cocinado de los productos cárnicos frescos

Las hamburguesas se cocinaron sobre una plancha de cocina durante 2 min por cada lado. Este tratamiento fue el necesario para conseguir en el interior una temperatura de 60°C, considerada suficiente para alcanzar el grado de “hecho” (Thornberg, 2005). La temperatura interior de las hamburguesas se midió con un termómetro digital dotado de una sonda.

3.2.2.3. Elaboración de productos cárnicos madurados

Como modelo de producto cárnico madurado se eligió el salchichón. Para su fabricación se siguió una fórmula tradicional con la siguiente composición: 15% de papada, 80% de carne magra de cerdo y 5% de especias. La mezcla de especias contiene: sal, dextrosa, dextrina, especias, proteína de leche, potenciador de aromas, emulsionantes, antioxidantes, nitritos y ácido ascórbico.

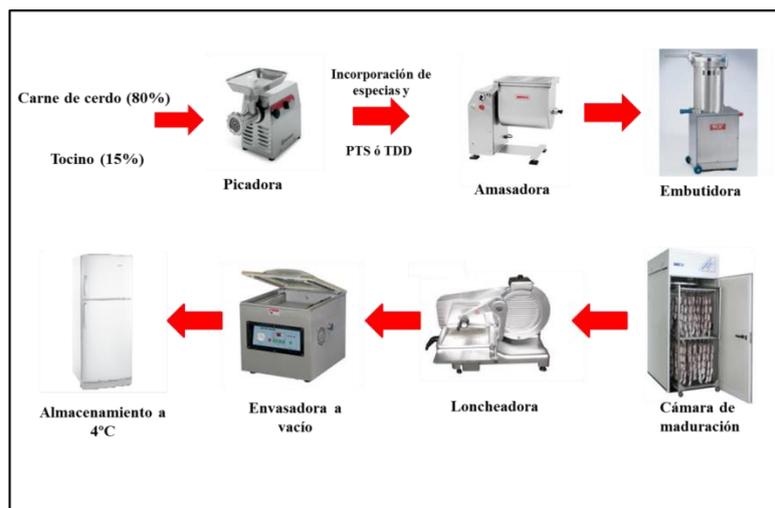
La papada y la carne magra de cerdo se picaron en la misma picadora utilizada para la elaboración de hamburguesas; a continuación, se añadieron las especias y concentraciones de los derivados de tomate comprendidas entre 0,6 y 2%. Para distribuir homogéneamente los distintos componentes, se utilizó una amasadora a baja velocidad (90 rpm) durante 5 min. En todos los casos, se elaboró un lote sin derivados del tomate denominándolo lote control.

A continuación, la masa se embutió en tripas artificiales previamente humedecidas en agua tibia; una vez conformados, los embutidos se pincharon con una aguja para facilitar

la salida del aire. Posteriormente, los salchichones se pulverizaron con sorbato potásico al 25% para controlar el crecimiento de mohos superficiales y se llevaron a la cámara de maduración donde se dejaron 20 días en las condiciones habitualmente utilizadas en la industria. Dichas condiciones fueron: 22°C y 92% de humedad relativa durante las primeras 48 horas seguida de 12 horas a 18°C y 85% de humedad relativa, 24 horas a 18°C y 89% de humedad relativa y 12°C y 85% de humedad relativa hasta el final de la maduración. Todos los lotes se elaboraron por triplicado.

Tras la maduración, los salchichones se cortaron en lonchas de 1 cm de grosor para el análisis de textura o de 2 mm para los análisis sensoriales y de color. Las lonchas se envasaron a vacío y se almacenaron en refrigeración (4°C) hasta su uso. En todo momento estuvieron cubiertas de papel aluminio para protegerlas de la luz. En la **Figura 11** se muestra un esquema del proceso.

Figura 11. Esquema del proceso de elaboración de los productos cárnicos madurados



3.3. Tratamiento de irradiación

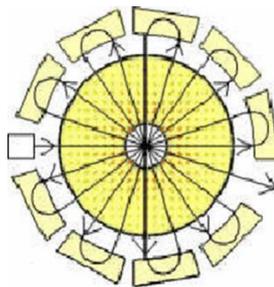
El tratamiento de irradiación se aplicó a los productos cárnicos (hamburguesas y salchichones) y a los derivados del tomate (PTS y TDD). Las muestras envasadas a vacío se transportaron a la planta de irradiación en condiciones de refrigeración (4°C) y en oscuridad, para lo que se utilizaron recipientes isoterms de polipropileno expandido. El tratamiento se llevó a cabo en la planta IONISOS IBÉRICA S.A. (Tarancón, Cuenca, España), donde se realizó el tratamiento con un acelerador de electrones Rhodotron TT200 de IBA Industrial (Lovain-LaNeuve, Bélgica) que operaba a 10 MeV con una potencia máxima de 80 kW (**Figura 12**). Las muestras se sometieron a dosis de 2 y 4 kGy.

Figura 12. Imagen del núcleo del acelerador de electrones Rhodotron



La aceleración de electrones tiene lugar en una cámara de vacío al recorrer una trayectoria de varios bucles conformando la proyección de una margarita (Rhodos, del griego flor) atravesando varias veces el centro de la cámara, lo que permite el funcionamiento del equipo en modo continuo (**Figura 13**).

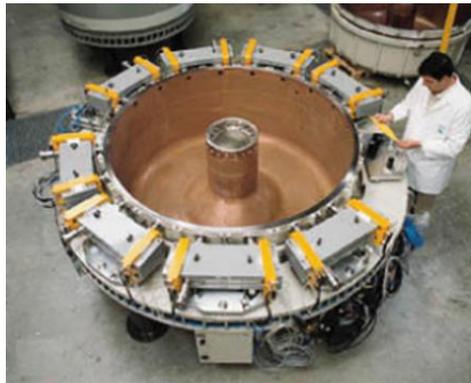
Figura 13. Esquema del mecanismo de funcionamiento de los electroimanes



Los nueve electroimanes deflectores (**Figura 14**) se encargan de lanzar los electrones al punto diametralmente opuesto pasando, de nuevo, por el centro geométrico. Finalmente, los electrones salen de la cámara con una energía de 10 MeV, desviados 90° y dispersados en un cono de barrido, el haz, de una anchura aproximada de 1 m, para incidir en la muestra con una frecuencia de 100 Hz (García-Márquez, 2015).

La dosis exacta absorbida por las muestras se comprobó con dosímetros de triacetato de celulosa, que se trataron simultáneamente con las muestras. Estos dosímetros son una cinta de una película que bajo la influencia de la radiación cambia sus propiedades de absorción óptica. La dosis absorbida por cada muestra se determinó mediante lectura de los dosímetros a una longitud de onda (280 nm). Se consideró que el tratamiento era correcto cuando la diferencia entre la dosis emitida y la absorbida fue < 5%. Igualmente se controló la temperatura de las muestras y el aumento nunca fue superior a 2°C.

Figura 14. Electroimanes deflectores del acelerador de electrones



Tras el tratamiento las muestras se trasladaron hasta el laboratorio en condiciones de refrigeración y se mantuvieron a 4°C hasta su análisis, salvo en el caso de los derivados de tomate los cuales se mantuvieron en congelación. En todos los experimentos hubo un lote que no se irradió y se consideró como el lote control.

3.4. Técnicas analíticas

3.4.1. Determinación de la actividad de agua (a_w)

La determinación de la a_w se llevó a cabo en un higrómetro de punto de rocío a una temperatura de 20°C. Las medidas se realizaron introduciendo en la cubeta del higrómetro cápsulas de plástico con contenido aproximado de 2 g de muestra picada en trozos de menos de 5 mm; una vez introducida la cubeta el equipo proporciona la lectura al cabo de 2-3 min. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.4.2. Determinación del pH

Para realizar las medidas se homogeneizó 1 g de los productos cárnicos con 10 ml de agua destilada en un homogeneizador. Para las medidas de los derivados de tomate se pesaron 0,5 g y se añadieron 10 ml de agua destilada agitando la mezcla en un agitador magnético durante 10 min; después se filtró a través de papel de filtro de laboratorio determinándose el pH en el filtrado. El calibrado se realizó con dos tampones de referencia de pH 7 y pH 4. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.4.3. Recuentos microbiológicos

Para realizar los recuentos microbiológicos se introdujeron 10 g de muestra en una bolsa estéril con filtro que contenía 90 ml de suero fisiológico previamente esterilizado [0,85% (p/v) de NaCl]. La mezcla se homogeneizó 5 min en un Stomacher. A partir de este homogeneizado se tomó 1 ml y se hicieron las diluciones decimales correspondientes.

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: Plate Count Agar (PCA) para la cuantificación de microorganismos aerobios mesófilos; MRS (Man, Rogosa and Sharpe) a pH 5,6 para el recuento de bacterias lácticas y Manitol Salt Agar (MSA) para el recuento de micrococáceas.

Los medios de cultivo y el suero fisiológico se esterilizaron a 121°C durante 15 min. Las placas se incubaron a 32°C durante 48 h. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (ufc/g).

Todos los recuentos se realizaron por duplicado.

3.4.4. Extracción y cuantificación del licopeno

El licopeno se extrajo utilizando disolventes orgánicos. Cuando la matriz poseía un alto contenido en grasa (productos cárnicos madurados), se realizó una saponificación previa.

3.4.4.1. Extracción del licopeno con disolventes orgánicos

La extracción del licopeno de los dos derivados del tomate se realizó con diclorometano. La relación muestra/disolvente fue 1/5 (p/v). Las muestras se mezclaron con el disolvente en un agitador magnético a 40°C en oscuridad durante 30 min; a continuación, se recogió la fracción de disolvente con una pipeta almacenándose en un matraz en oscuridad y en refrigeración (<5°C); se volvió a añadir a las muestras la misma cantidad de diclorometano repitiéndose la extracción varias veces hasta que el disolvente orgánico no tenía color. Las distintas fracciones recogidas se mezclaron y las muestras se llevaron a sequedad en un rotavapor a 35°C en oscuridad. Una vez secas, se almacenaron en atmósfera de nitrógeno a -30°C y en oscuridad hasta su análisis.

En el caso de las hamburguesas, las muestras (10 g) se desmenuzaron en trozos de aproximadamente 0,5 cm, mezclándose a continuación con 50 ml de diclorometano. La

extracción del licopeno se realizó como se ha descrito previamente para los derivados del tomate.

En el caso del salchichón, debido a su mayor contenido de grasa, se llevó a cabo una saponificación previa de las muestras (Calvo y col., 2008). Para ello se picaron 30 g en trozos de aproximadamente 3 mm, se les añadieron 60 ml de potasa metanólica al 10% y la mezcla se mantuvo en agitación en un agitador magnético a 40°C en oscuridad durante 2 horas. Al finalizar la saponificación, la mezcla se llevó a un embudo de decantación y se añadieron 60 ml de agua destilada, 30 ml de diclorometano y 3 ml de metanol; éste último para favorecer la separación de fases. La mezcla se agitó vigorosamente durante 2 min; se recogió la fase de diclorometano, que contenía los carotenoides y el resto de los compuestos liposolubles extraídos, almacenándola en refrigeración y oscuridad. A las fases restantes se le añadieron otros 30 ml del disolvente repitiéndose la extracción varias veces hasta que el diclorometano recogido no tenía color, momento en que se considera que ya no era posible extraer más carotenoides. Finalmente, se mezclaron todas las fases de diclorometano.

Para eliminar los restos de jabones, las fracciones recogidas se lavaron en un embudo de decantación con 200 ml de agua destilada, agitándose vigorosamente durante un minuto. La fase acuosa con los jabones se eliminó y la orgánica se mezcló con otros 200 ml de agua destilada para eliminar el residuo de álcali, repitiéndose el proceso descrito.

Los restos de agua que quedaron en el diclorometano se eliminaron añadiendo a la muestra 10 g de sulfato sódico anhidro dejándolo reposar durante 30 min; transcurrido ese tiempo se pasó la fase orgánica por un filtro Whatman 1PS. Después la muestra se llevó a sequedad en un rotavapor a 35°C en oscuridad y se almacenó en atmósfera de nitrógeno a -30 °C y en oscuridad hasta su análisis.

3.4.4.2. Cuantificación de licopeno

La cuantificación del licopeno en los productos cárnicos se llevó a cabo usando un método espectrofotométrico. La cuantificación de los isómeros del licopeno presentes en los derivados de tomate se llevó a cabo por HPLC en el Institute of Nutrition de la Friedrich Schiller University de Jena (Alemania), en el equipo del Dr. Volker Böhm, asiduo colaborador de la Dra. Palozza.

3.4.4.2.1. Método espectrofotométrico

Las muestras extraídas previamente se diluyeron con éter de petróleo hasta una concentración tal que permitiera su lectura. Las muestras se introdujeron en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz y se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 472 nm. Como blanco se utilizó éter de petróleo.

La cuantificación de licopeno se hizo de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$X = \frac{A \times Y \times 1000}{A_{1cm}^{1\%} \times 100}$$

Donde X = concentración del licopeno en mg, A = absorbancia medida, Y = volumen (ml) de éter de petróleo en que se ha diluido la muestra y $A_{1cm}^{1\%}$ = coeficiente de absorción específico del licopeno definido como la absorbancia teórica de un 1% de solución medido de una cubeta de 1 cm de paso de luz.

Para calcular $A_{1cm}^{1\%}$ hay que tener en cuenta que el coeficiente de absorción molar (ϵ) para el licopeno es 184900, medido en una solución 1 M en una cubeta de 1 cm y utilizando éter de petróleo como disolvente (Britton, 1995), por lo que:

$$\epsilon = \frac{A_{1cm}^{1\%} \times \text{masa molecular del licopeno}}{10}$$

de donde:

$$A_{1cm}^{1\%} = \frac{\epsilon \times 10}{536}$$

sustituyendo en la primera fórmula:

$$X = \frac{A \times Y \times 1000}{[(184900 \times 10 / 536) \times 100]}$$

simplificando:

$$X = \frac{A \times Y \times 536}{184900}$$

3.4.4.2.2. Método cromatográfico (HPLC)

La cuantificación del licopeno *todo-trans* y de las formas *cis* de la PTS y el TDD irradiados a 4 kGy y sin irradiar (control) se realizó por HPLC. Se tomó 500 mg de cada derivado, y se extrajo el licopeno con diclorometano tal y como se ha descrito en el apartado 3.4.4.1.

Para la cuantificación del licopeno *todo-trans* se usó una columna C_{30} acoplada con una pre-columna C_{18} , mantenidas a una temperatura de $10 \pm 1^\circ\text{C}$, y un detector UV-visible.

La longitud de onda utilizada fue 470 nm. Los extractos, obtenidos previamente, fueron diluidos en 25 ml de metanol/metil *ter*-butil éter (MTBE) (20/80; v/v). Se utilizó como patrón interno β -apo-8-carotenal. La fase móvil (1 ml/min) fue el gradiente de metanol y MTBE mostrado en la **Tabla 12**.

El cálculo de la concentración de licopeno se hizo tomando como base la relación entre la concentración conocida del patrón externo (licopeno *todo-trans*) y el área del pico correspondiente obtenido de la muestra.

Tabla 12. Gradiente de elución Metanol/MTBE

Tiempo (min)	Gradiente Metanol/MTBE (v/v)
0	90/10
40	50/50
60	50/50
70	90/10
75	90/10

Para la cuantificación de los isómeros *cis* de licopeno se utilizó un HPLC dotado con una columna polimérica C₃₀ acoplada con una pre-columna C₁₈, mantenidas a una temperatura de 32 ± 1°C, y un detector UV-visible. La longitud de onda utilizada fue de 470 nm. Los extractos obtenidos se diluyeron en una concentración conocida de metanol/MTBE (20/80; v/v). La fase móvil (1 ml/min) utilizada fue MTBE/metanol/etilacetato (50/45/5; v/v/v) la cual se utilizó en condiciones isocráticas.

Con el fin de identificar los isómeros de licopeno se utilizó la relación entre el tiempo de retención de los isómeros *cis* con el del isómero *todo-trans*. No se pudo cuantificar la cantidad de cada isómero, pero sí se estableció la relación entre las áreas de los picos correspondientes a los isómeros *cis* con la del isómero *todo-trans*.

3.4.5. Determinación del color

El color se estimó dentro del espacio CIE L*a*b* (CIE, 1971). Este sistema se basa en un método espacial del color en el cual los valores de L*, a* y b* se representan usando un sistema de coordenadas cartesianas (**Figura 15**). Las distancias iguales en el espacio

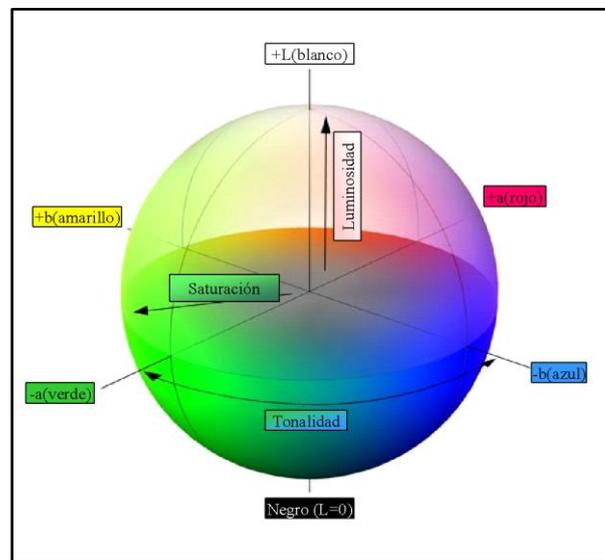
representan aproximadamente diferencias iguales de color. En dicha representación los tres parámetros están representados de la siguiente forma:

- L*: es el eje vertical. Mide la luminosidad, los valores van de 0 que indica el color negro (absorción total) a 100 que representa el blanco.

- a*: está representado en uno de los ejes horizontales. Da una medida de color en el espacio del rojo (+60) al verde (-60).

- b*: está situado en otro eje horizontal perpendicular al anterior, varía desde el amarillo (+60) al azul (-60).

Figura 15. Representación gráfica del sistema CIE L* a* b*.



El espacio de color CIE L*a*b* permite además medir la saturación y la tonalidad de un color; para ello en lugar de las coordenadas cartesianas a* y b* se emplean las coordenadas polares en las que se puede representar el espacio de color CIE L*C*h* donde:

- C*: también denominado índice de saturación (Chroma), mide el grado de saturación o croma de un color. Su valor se calcula a partir de los valores a y b de la forma siguiente

$$C^* = \sqrt{a^2 + b^2}$$

El valor de 0 indica que el color no está saturado y un valor de 100 que es un color altamente saturado.

- h*: se denomina también “Hue angle”. Da una medida de la tonalidad del color. Indica la orientación relativa del color respecto al origen. Si el círculo a*b* entero se divide

en los 360 grados de la circunferencia y se define el origen 0 grados en la posición a^* positiva, en ese punto se sitúa el color estrictamente rojo; al desplazarnos en sentido contrario a las agujas del reloj, el color estrictamente amarillo se encontraría en el ángulo de 90°, el verde estricto en el de 180° y el azul estricto en el de 270°. Se calcula como:

$$h^* = \arctg \frac{b^*}{a^*}$$

Antes de realizar las medidas de las muestras, el colorímetro se calibró con una placa blanca ($L^* = 96,94$, $a^* = 0,16$, $b^* = 2,02$) y una rosa ($L^* = 44,88$, $a^* = 25,99$, $b^* = 6,67$). En las hamburguesas, el color se midió en las recién elaboradas y en las cocinadas, determinándose en al menos cinco puntos distintos de ambos lados de cada hamburguesa. En los salchichones, las lecturas se hicieron en lonchas de 2 mm de espesor.

Para cada uno de los lotes se realizaron un mínimo de 20 determinaciones. En todos los casos se utilizó una fuente de iluminación D-65.

3.4.6. Análisis de textura

La textura se analizó mediante la prueba de doble compresión o Análisis de Perfil de Textura (APT) siguiendo el método descrito por Bourne (1978).

Para la prueba del APT en el caso de las hamburguesas se utilizó un sacabocados para obtener muestras de 1 cm de altura y 30 mm de diámetro; en los salchichones se utilizaron las lonchas de 1 cm de altura previamente cortadas antes de su envasado a vacío (apartado 3.2.2.3.). Antes de realizar los ensayos, el equipo se calibró con una pesa de 5 Kg.

Las muestras se dispusieron sobre la plataforma de aluminio del texturómetro y se procedió a comprimirlas dos veces hasta un 50% de su altura inicial. Para realizar la compresión se utilizó una sonda cilíndrica, de superficie plana y un diámetro de 25 mm.

Las condiciones establecidas fueron: velocidad de la sonda en compresión 2 mm/s y 10 mm/s al subir.

Al menos se realizaron 5 determinaciones de cada muestra.

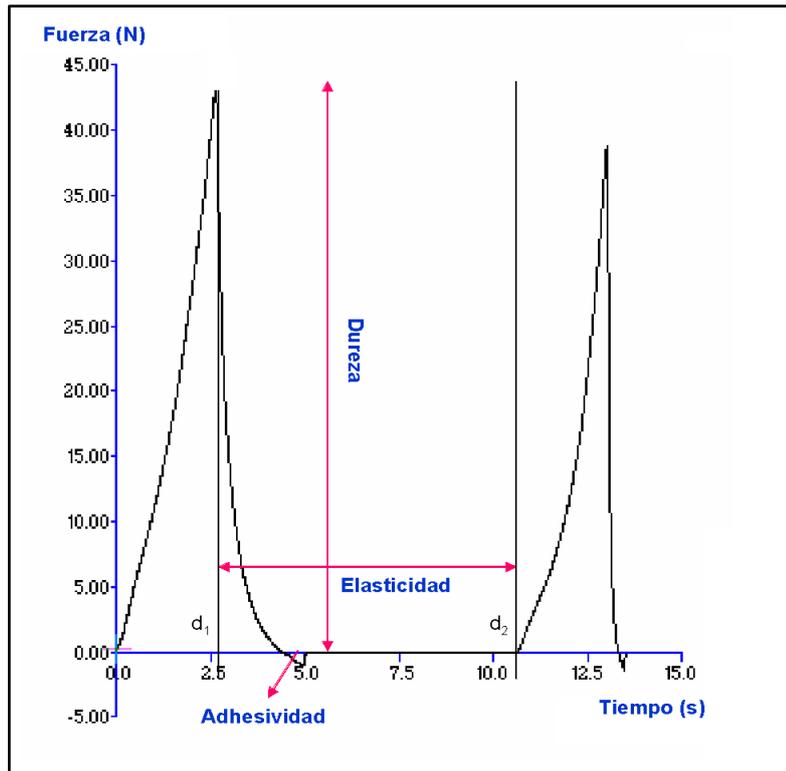
Tras el ensayo se obtuvo una gráfica en la que se representa la fuerza aplicada (ordenadas) en función del tiempo (abscisas) (**Figura 16**).

De esta gráfica se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Dureza. Se define como la altura máxima obtenida en el primer ciclo de compresión. Representa la fuerza máxima necesaria para producir una cierta deformación. Se mide en Newtons.

- Adhesividad. Corresponde al área negativa producida tras el primer ciclo de compresión. Representa la fuerza necesaria para separar la superficie compresora (sonda) de la muestra después de haberla comprimido por primera vez. Se mide en Newtons.
- Elasticidad. Se corresponde con la altura recuperada por la muestra tras la primera compresión y el principio de la segunda. Se expresa en cm.

Figura 16. Representación gráfica de una prueba de doble compresión



- Cohesividad. Es la relación entre las áreas obtenidas durante la segunda y primera compresión. Representa el grado en el que una muestra puede deformarse sin llegar a su ruptura. Es adimensional.
- Gomosidad. Es el resultado de multiplicar el valor de la dureza por el de la cohesividad. Representa el trabajo necesario para desintegrar una muestra y dejarla lista para tragar. Se expresa en Newtons.
- Masticabilidad. Se calcula multiplicando el valor de la gomosidad por el de la elasticidad. Representa el trabajo necesario para masticar una muestra dejándola lista para la deglución. Se mide en Newtons x cm.

3.4.7. Análisis sensorial

El análisis sensorial se realizó en la Sala de Catas del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, construida según la Norma ISO 6658 (ISO, 2005). Esta sala consta de un área de preparación de muestras y de 6 cabinas de cata independientes y comunicadas con la zona de preparación mediante tornos giratorios. Cada cabina está dotada de una mesa de trabajo, un ordenador con un software desarrollado para este Departamento y este tipo de análisis, una pila con agua corriente e iluminación blanca y roja. Los análisis se realizaron siempre con luz blanca.

Los catadores se seleccionaron entre el personal del Departamento. El panel de catadores estuvo siempre formado por 25 personas como mínimo, mujeres y hombres con edades comprendidas entre 25 y 60 años. Todos ellos eran catadores no entrenados, pero consumidores habituales de los productos cárnicos a analizar por lo que mostraban afinidad hacia este tipo de producto.

Se realizó una prueba al día y cuando fue necesario, se realizaron 2 análisis distanciándolos en este caso con un intervalo de al menos una hora para evitar la saturación y no cansar a los catadores. Se procuró realizarlas entre las 9 y 11 de la mañana (Espinosa, 2007).

3.4.7.1. Preparación de las muestras

En el caso de las hamburguesas, las muestras se cocinaron en una plancha previamente calentada a 180°C y durante 2 min por cada lado. De esta manera, en el interior de la hamburguesa se conseguía una temperatura de al menos 60°C con la que se alcanza la sensación de “hecho”. La temperatura fue medida con un termómetro digital.

Los salchichones se prepararon en lonchas de 2 mm de espesor. Se mantuvieron a temperatura ambiente tapadas con papel aluminio para evitar la pérdida de humedad y cambios en el color.

A cada catador se le sirvió una hamburguesa recién cocinada o tres lonchas de salchichón recién cortadas. En cada caso, las muestras se presentaron en platos blancos de plástico etiquetados con un número de tres dígitos seleccionado de forma aleatoria a partir de las Tablas de Dígitos al Azar. Se sirvió también un vaso con agua y pan sin sal, para poder limpiar la boca entre una y otra muestra a catar.

3.4.7.2. Prueba Hedónica

El objetivo de la Prueba Hedónica o Prueba de Nivel de Agrado es, como su nombre indica, determinar el nivel de agrado o desagrado que provoca en los catadores una muestra específica. Para este tipo de pruebas se recomienda que los catadores sean usuarios habituales del producto que van a catar y no deben conocer la problemática del estudio, solamente entender el procedimiento de la prueba y responder.

En el caso de los productos cárnicos madurados enriquecidos con PTS, la aceptabilidad general del producto se valoró con una escala hedónica estructurada de 5 puntos (**Figura 17**). En este estudio se marcaba sobre una línea horizontal valores del 1 al 5, siendo el 1 = Muy desagradable, 2 = Desagradable, 3 = Aceptable, 4 = Agradable y 5 = Muy agradable. Con esta escala los resultados por debajo de 3 puntos, indicaban la baja o nula aceptabilidad del producto cárnico.

La posible mediatización descrita para estas escalas estructuradas de máximo 5 puntos (Pedrero y col., 1989) hizo que se decidiera que el resto de los análisis hedónicos se llevaran a cabo con escalas no estructuradas de 10 cm.

Para ello, cada catador recibió una hoja (**Figura 18**) con las instrucciones en las que se le pedía que calificara olor, color, textura, sabor y aceptabilidad general del producto sobre escala no estructurada de 10 cm en la que tenía que marcar una línea vertical según su valoración. En esta escala, solo había dos marcadores: Muy desagradable y Muy agradable, cada uno en uno de los extremos. Para interpretar los resultados, la escala hedónica se convirtió en numérica transformando a centímetros la distancia entre los dos extremos y se midió el punto de respuesta indicado por el catador para cada uno de los parámetros sensoriales analizados.

Figura 17. Hoja de respuestas utilizada para realizar el análisis sensorial. Escala estructurada

EVALUACION SENSORIAL

Nombre
Numero de muestra:
Fecha:

Instrucciones: Enjuáguese la boca con agua y coma un poco de pan antes de cada muestra, incluso antes de la primera. Fíjese en el atributo organoléptico que se le indica e intente, en la medida de lo posible, aislarlo de los demás y marque en función de su valoración, una línea vertical sobre la línea horizontal que determina la aceptabilidad general del producto. No olvide indicar el número de muestra. MUCHAS GRACIAS

Aceptabilidad general del producto

Muy desagradable Muy agradable

 1 2 3 4 5

1- Muy Desagradable
 2- Desagradable
 3- Aceptable
 4- Agradable
 5. Muy agradable

Figura 18. Hoja de respuestas utilizada para realizar el análisis sensorial. Escala no estructurada

EVALUACION SENSORIAL

Nombre
Numero de muestra:
Fecha:

Instrucciones: Enjuáguese la boca con agua y coma un poco de pan antes de cada muestra, incluso antes de la primera. Fíjese en el atributo organoléptico que se le indica e intente, en la medida de lo posible, aislarlo de los demás y marque en función de su valoración, una línea vertical sobre la línea horizontal que determina cada atributo de calidad organoléptica. No olvide indicar el número de muestra. MUCHAS GRACIAS

Olor:

Muy desagradable Muy agradable

Color:

Muy desagradable Muy agradable

Textura:

Muy desagradable Muy agradable

Sabor:

Muy desagradable Muy agradable

Aceptabilidad general del producto:

Muy desagradable Muy agradable

3.4.8. Determinación de la actividad antioxidante del licopeno

3.4.8.1. Preparación de los extractos de licopeno a partir de los derivados del tomate

Los extractos se obtuvieron a partir de los dos derivados del tomate (PTS y TDD) irradiados a 4 kGy (apartado 3.2.1.) o sin irradiar, utilizando éstos últimos como control. Para ello, se pesaron 0,5 g de cada extracto y se les adicionó 1 ml de tetrahidrofurano (THF). Para reducir al máximo las pérdidas de licopeno, los extractos se prepararon inmediatamente antes de ser añadidos a las células.

3.4.8.2. Ensayos con la línea celular RAT-1

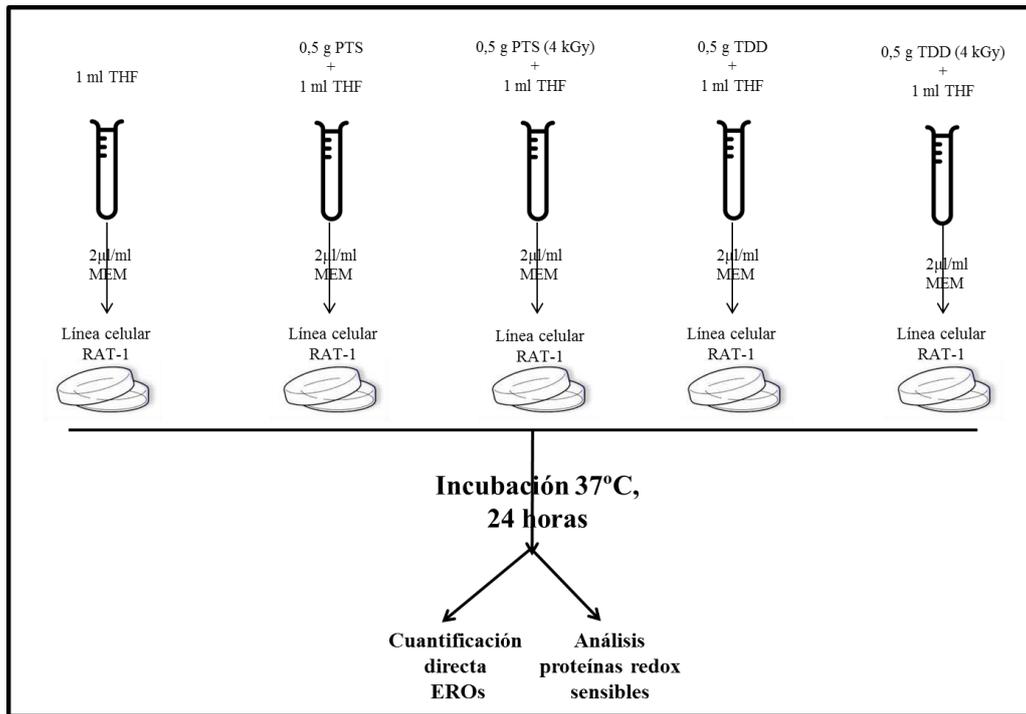
Se seleccionó la línea celular RAT-1 procedente de fibroblastos humanos por haberse utilizado satisfactoriamente en diferentes estudios también encaminados a determinar la capacidad antioxidante del licopeno (Calviello y col., 2006; Lorenz y col., 2009). Además, esta línea se caracteriza por tener un crecimiento más rápido y sencillo que el de otras similares.

El medio de cultivo utilizado fue Minimum Essential Medium Eagle (MEM) con 100 µg/ml de estreptomycin, 100 µg/ml de penicilina y suplementado con suero fetal 10% p/v y glutamina 2 mM. El crecimiento de las células se realizó en placas de Petri a una temperatura de 37°C. Cuando la densidad del cultivo fue de aproximadamente 3×10^5 células/ml, las células se llevaron a 3°C bajo una atmósfera con un 5% de CO₂ para mantenerlas en fase logarítmica, a la espera de ser tratadas con los extractos de tomate.

Se realizaron cinco ensayos (**Figura 19**): células tratadas solo con THF (muestra blanco), células tratadas con THF+PTS, células tratadas con THF+PTS irradiada a 4 kGy, células con THF+TDD y por último las células tratadas con THF+TDD irradiado a 4 kGy.

De cada una de las 5 soluciones descritas en la **Figura 19**, se tomaron 2 µl por ml del medio MEM contenido en la placa de Petri donde se hallaban las células. En el blanco, se adicionaron también 2 µl de THF por ml de medio MEM. Posteriormente, las células se incubaron durante 24 h a 37°C. Pasado este tiempo, se llevaron a cabo dos análisis: una parte de las muestras se destinaron a la cuantificación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y otra parte al análisis de proteínas indicadoras de la actividad antioxidante celular. En ambos casos, los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Figura 19. Diagrama de los ensayos realizados con la línea celular RAT-1 y los extractos de tomate



3.4.8.3. Cuantificación de las especies reactivas de oxígeno

Para evaluar la producción de EROs se utilizó el reactivo fluorescente diacetoximetilester, análogo de 6-carboxi-2',7'-diacetatodihidrofluoreseceína, que es un indicador de EROs en las células, pero que no es fluorescente.

En primer lugar, el total de las células (2×10^6) se lavaron con el medio de cultivo MEM para eliminar los extractos de tomate que no estuvieran bien anclados a las células. Posteriormente, se añadieron 2 ml de diacetoximetilester y se incubaron durante 30 min a 37°C en oscuridad; a continuación, se procedió a realizar la lectura de la fluorescencia en un citofluorímetro, previamente calibrado con un blanco sin células. Los resultados se expresaron en unidades de fluorescencia.

Con el objetivo de amplificar la producción de EROs, de forma paralela se incubó la misma concentración de células (2×10^6) con H_2O_2 100 µM, como agente pro-oxidante, durante 30 y 60 min a 37°C. Finalmente, se realizó la lectura de la fluorescencia

3.4.8.4. Análisis de la expresión de las proteínas indicadoras de estrés celular mediante la técnica de Western blot

3.4.8.4.1. Preparación de la muestra

Una vez tratadas con los extractos de licopeno (apartado 3.4.8.2.), las células (10×10^6) se lisaron durante 30 min en condiciones de congelación, usando para ello 100 μ l del tampón de lisis (1mM $MgCl_2$, 350 mM NaCl, 20 mM Hepes, 0,5 mM ácido etilendiaminotetraacético, 0,1 mM ácido etilenglicólicotetracético, 1 mM ditiotreitól, 1 mM $Na_4P_2O_7$, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1 mM aprotinina, 1,5 mM leupeptina, 1 mM Na_3VO_4 y 20% glicerol). Una vez lisadas, las células se centrifugaron a 18000 rpm durante 10 min a 4°C.

Las proteínas presentes en el sobrenadante se cuantificaron espectrofotométricamente, mediante una lectura realizada a 595 nm, utilizando para ello una curva de calibrado realizada previamente con concentraciones crecientes de albúmina bovina (EC 232-936-2) con reactivo de Bradford.

Con el fin de preparar las proteínas para la electroforesis, fue necesaria su desnaturalización hasta su estructura primaria, rompiendo los enlaces peptídicos y los puentes disulfuro gracias a la acción combinada de detergentes iónicos y altas temperaturas. Como agente desnaturalizante se usó β -mercaptoetanol (1/1; v/v) añadido a la muestra en ebullición durante 5 min.

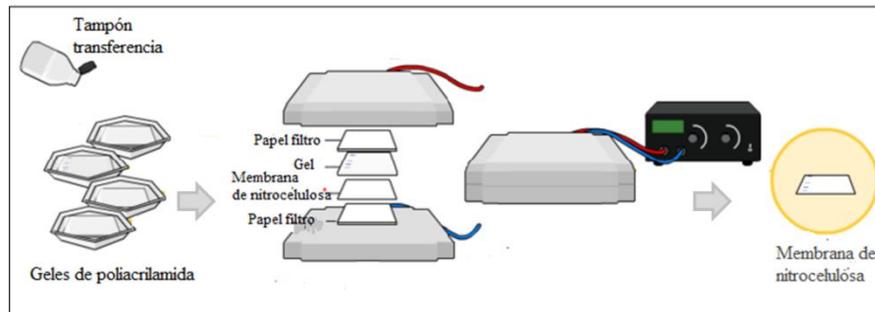
Una vez desnaturalizadas, se cargaron en un gel de poliacrilamida junto con la proteína marcadora C1992. Una vez cargadas todas las proteínas en sus pocillos, el gel se cubrió completamente con tampón dodecil sulfato sodico (SDS) al 10%, y se aplicó un voltaje de 100 V durante media hora.

3.4.8.4.2. Transferencia de las proteínas indicadoras de estrés celular

Para que las proteínas sean accesibles a la detección por anticuerpos, se las transfirió desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa, soporte sólido que las inmoviliza. Para ello, se montó un sándwich con las membranas desde el polo negativo o cátodo al polo positivo o ánodo con el siguiente orden: una esponja, varios papeles de filtro empapados en el buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina,

SDS 0,04% y 20% metanol), el gel de electroforesis, la membrana de nitrocelulosa, más papeles de filtro empapados en el tampón y otra esponja (**Figura 20**).

Figura 20. Esquema del proceso de transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa



Una vez montado, se introdujo en la cubeta de electroforesis junto con el tampón de transferencia y se aplicó una corriente de 100 V durante 1 h: las proteínas del gel se desplazaron hacia el polo positivo y quedaron atrapadas en la membrana.

3.4.8.4.3. Bloqueo de la membrana

Antes de añadir los anticuerpos, es preciso bloquear la parte de la membrana que ha quedado libre y no ha sido ocupada por las proteínas transferidas desde el gel. De lo contrario el anticuerpo, de naturaleza proteica, podría unirse directamente a la membrana, y dificultar la distinción del complejo antígeno-anticuerpo, obteniéndose falsos positivos.

El bloqueo se realizó cubriendo la membrana con leche en polvo comercial diluida en tampón TBST (50 g/l) (Tris-Buffered saline and Tween 20) constituido por 50 mM Tris, 150 mM NaCl y 0,05% Tween 20. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante toda la noche bajo agitación suave. Tras la incubación la membrana se lavó con TBST.

3.4.8.4.4. Detección de las proteínas indicadoras del estrés celular

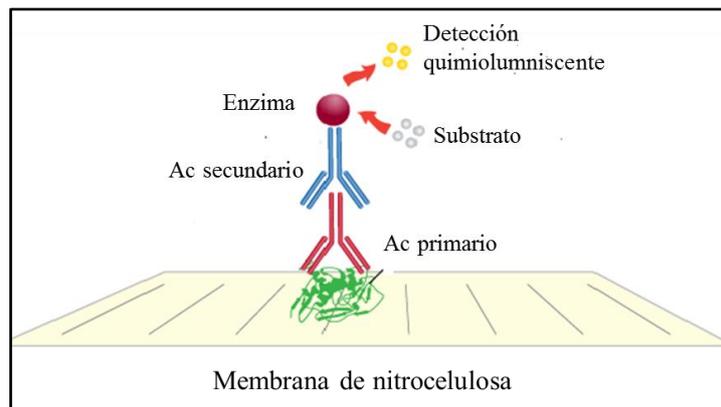
Para la detección de las proteínas indicadoras del estrés celular se emplearon dos tipos de anticuerpos monoclonales, unos primarios y otros secundarios. Los anticuerpos primarios se unen específicamente a la proteína presente en la membrana. Los anticuerpos secundarios reconocen una región específica del anticuerpo primario y se unen a él. Dichos

anticuerpos secundarios están marcados con peroxidasa, lo que facilita su detección gracias a una reacción colorimétrica.

En primer lugar se adicionaron los anticuerpos primarios (anti-p38, anti p-p38, anti-ERK1/2, anti p-ERK1/2, anti-JNK, anti-p-JNK, anti-NOX-4, anti-Cox-2) y se incubaron a 4°C en agitación (50 rpm) durante toda la noche. Cada membrana se incubó solamente con un anticuerpo. Posteriormente, las membranas se lavaron con el tampón TBST con el objetivo de eliminar el anticuerpo primario que no se había unido.

Una vez lavadas se expusieron a anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo (1:2500) y de ratón (1:5000) marcados con peroxidasa durante 45 min a temperatura ambiente y en agitación (50 rpm). Después, se lavaron de nuevo las membranas con el tampón TBST para eliminar los posibles restos de anticuerpos secundarios que no se hubieran unido. En la **Figura 21** se presenta un esquema del proceso de unión de las proteínas a los anticuerpos.

Figura 21. Esquema del proceso de unión de las proteínas a los anticuerpos



3.4.8.4.5. Cuantificación de las proteínas indicadoras del estrés celular

Tras el lavado de las membranas de nitrocelulosa se procedió al revelado por quimioluminiscencia, usando luminol como agente quimioluminiscente. La luz emitida por la enzima unida al anticuerpo secundario fue captada por una película fotográfica que tomó una imagen digital del Western-blot. Posteriormente, se analizó la imagen por densitometría evaluando la cantidad relativa de mancha y cuantificando el resultado en términos de densidad óptica. La lectura se realizó a 260 nm.

3.4.8.5. Cuantificación del factor de transcripción NF- κ B

Para cuantificar este factor transcripcional se utilizó un ensayo de cambio de movilidad electroforética. La técnica se basa en que la unión del ADN a una proteína provoca un cambio en su movilidad electroforética y migra más lentamente que el ADN libre. En este caso se quería detectar y cuantificar la presencia del factor NF- κ B, por medio de su unión a una sonda de ADN específica marcada radioactivamente.

En primer lugar se lisaron las células, obtenidas en el apartado 3.4.8.2., para liberar el factor NF- κ B que se encuentra en el núcleo. Para ello se utilizó el mismo tampón de lisis celular utilizado en el apartado 3.4.8.4.1. Las células fueron mantenidas durante 30 minutos en condiciones de congelación con 100 μ l del tampón de lisis. Posteriormente, las células lisadas se centrifugaron 3000 rpm durante 20 min a 4°C. El factor NF- κ B se encuentra en el sedimento junto con los núcleos celulares, por lo que se desechó el sobrenadante que contenía las proteínas citosólicas. Una vez recuperado el sedimento, se volvió a lisar con un tampón (10 mM HEPES, 0,4 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA y 2 μ g de inhibidores de proteasas) durante 20 min a 4°C en agitación continua. La fracción nuclear definitiva se obtuvo tras una centrifugación posterior a 14000 rpm durante 10 min a 4°C.

El siguiente paso fue marcar la sonda de ADN radiactivamente. Con este fin la sonda (5'-AGTTGAGGGACTTTCCAGGC-3') se incubó con 5 pmol del oligonucleótido, con 10 pmol de (α -³²P) ATP y con 3U de la polinucleótido quinasa T4 durante 10 min a 37°C. Tras su marcaje, la sonda fue purificada usando para ello una columna de biogel de poliacrilamida, capaz de limpiar y eliminar cualquier resto de sales.

Posteriormente, se incubaron 3 mg de la sonda con 5 μ g de los extractos nucleares obtenidos; dicha incubación se realizó en un medio con 10 mM Tris-HCl, 5% glicerol, 1 mM de EDTA, 1mM de DDT, 50 mM NaCl en un volumen final de 20 μ l.

Una vez formados los complejos ADN-NF- κ B, se cargaron en geles de poliacrilamida (60 g/l) con tampón Tris-borato 45mM, EDTA 1mM a pH 8, con el objetivo de separar el ADN libre del ADN unido a NF- κ B y se aplicó un voltaje de 100 V. A continuación los geles se secaron a vacío y se expusieron en pantallas de fósforo donde se analizaron por fosforescencia. La intensidad de las bandas fue cuantificada por el software QuANT.

3.4.8.6. Cuantificación de la subunidad p65

Para realizar este análisis se siguió el mismo protocolo que en el apartado 3.4.8.5., ya que la subunidad p65 del complejo proteico NF- κ B se encuentra en el núcleo celular.

Una vez obtenidos los extractos, se llevó a cabo un Western-blot, similar al realizado en el apartado 3.3.8.4. En primer lugar se separaron las proteínas presentes en los extractos nucleares (25-30 μ g) por medio de una electroforesis en gel Bis-Tris (40-120 g/l) con un voltaje aplicado de 90 V y posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de Immobilon-P, de igual manera que en el apartado 3.4.8.4.2. Con el fin de evitar falsos positivos, la membrana se bloqueó con la misma solución que en el apartado 3.4.8.4.3. durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Tras el bloqueo, las membranas se lavaron con TBST. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo policlonal primario p65, marcado con peroxidasa, en PBS con Tween 20 (0,05%) durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Por último las membranas se revelaron de la misma manera que ha sido descrita en el apartado 3.4.8.4.5.

3.4.9. Accesibilidad del licopeno

Para el estudio de la accesibilidad del licopeno se utilizó un método *in vitro* estático basado en los descritos por Oomen y col. (2003) y Granado-Lorencio y col. (2007).

El método se basa en una simulación de la digestión gastrointestinal tratando la muestra con una serie de soluciones salinas y las enzimas digestivas en condiciones de pH, temperatura y tiempo lo más próximas a las que tienen lugar durante el proceso de la digestión. En la **Tabla 13** se muestra la composición de las soluciones inorgánicas e orgánicas utilizadas. Con el fin de evitar la incidencia de la luz, todo el proceso se realizó con material de vidrio ámbar o, en su defecto, tapado con papel aluminio.

En primer lugar se realizó una homogeneización de la muestra con el fin de simular el proceso de masticación. Para ello a 10 g de muestra se le adicionaron 9 ml de la solución que simulaba la saliva homogenizándose la muestra en un UltraTurrax. Una vez homogeneizada, se añadieron 145 mg de α -amilasa y se ajustó el pH a 6,5 con bicarbonato sódico 1M; la muestra se incubó durante 5 min a 37°C en un agitador-incubador a 90 rpm. A continuación, se añadieron 13,5 ml de jugo gástrico y 1 g de pepsina de estómago de cerdo. El pH se ajustó a 1,1 con HCl 1M y la mezcla se incubó de nuevo en agitación (90 rpm) durante 1 hora a 37°C. Una vez transcurrida la hora, al digerido gástrico se le adicionó

25 ml del jugo duodenal y 9 ml de bilis. Además se añadieron 3 g de pancreatina porcina, una unidad de lipasa pancreática, 5 µg de colipasa, 5 unidades de colesterol esterasa, 50 µl de fosfolipasa A2 y 19,9 mg de sales taurocólicas, ajustándose el pH a 7 con bicarbonato 1M. La muestra se incubó en agitación (90 rpm) durante 2 horas a 37°C con el fin de formar micelas, proceso que requiere la rotura de las gotas de lípidos grandes en gotitas más pequeñas. Una vez terminada la incubación, el digerido intestinal, se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min a 20°C. En el sobrenadante obtenido se encuentra el licopeno liberado, el cual no está necesariamente micelarizado (Hedren y col., 2002; Goñi y col., 2006). La cuantificación de licopeno se realizó por el método espectrofotométrico explicado en el apartado 3.4.4.2.1.

Tabla 13. Componentes y concentraciones de los jugos sintéticos utilizados en la digestión *in vitro*

	Saliva	Jugo gástrico	Jugo duodenal	Bilis
Soluciones inorgánicas	10 ml KCl 89,6 g/l	15,7 ml NaCl 175,3 g/l	40 ml NaCl 175,3 g/l	30 ml NaCl 175,3 g/l
	10 ml KSCN 20 g/l	3,0 ml NaH ₂ PO ₄ 88,8 g/l	40 ml NaHCO ₃ 84,7 g/l	68,3 ml NaHCO ₃ 84,7 g/l
	10 ml NaH ₂ PO ₄ 88,8 g/l	9,2 ml KCl 89,6 g/l	10 ml KH ₂ PO ₄ 8 g/l	4,2 ml KCl 89,6 g/l
	10 ml Na ₂ PO ₄ 57 g/l	18 ml CaCl ₂ x 2 H ₂ O 22,2 g/l	6,3 ml KCl 89,6 g/l	
	1,7 ml NaCl 175,3 g/l	10 ml NH ₄ Cl 30,6 g/l	10 ml MgCl ₂ 5 g/l	
	1,8 ml NaOH 40 g/l	8,3 ml HCl 37% g/g	180 µl HCl 37% g/g	
Soluciones orgánicas	8 ml urea 25 g/l	10 ml glucosa 65 g/l	4 ml urea 25 g/l	10 ml urea 25 g/l
		10 ml ácido glucurónico 2 g/l	9 ml CaCl ₂ x 2 H ₂ O 22,2 g/l	10 ml CaCl ₂ x 2 H ₂ O 22,2 g/l
		3,4 ml urea 25 g/l 10 ml hidrocloruro de glucosamina 33 g/l		
pH	6,5±0,2	1,07±0,07	7,8±0,2	8,0±0,2

De: Oomen y col. (2003)

Los datos de accesibilidad se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Accesibilidad (\%)} = \frac{\text{licopeno en el sobrenadante}}{\text{licopeno en el producto cárnico}} \times 100$$

3.4.10. Análisis estadístico

En todos los casos, los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA). En los casos en los que se detectaron diferencias significativas en los datos obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante del licopeno, se realizó el test de Fisher o el test de Tukey. Con el resto de resultados se usó el test de Rango Múltiple de Duncan.

El software utilizado para este estudio fue el Statgraphics Plus 5.0 para Windows (Virginia, Estados Unidos). El nivel de significancia en todos los análisis estadísticos realizados, se estableció en $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

ARTÍCULO 1

Irradiation of Ready To Eat sausages containing lycopene

Italian Journal of Food Science, 23, (2011), 260-269

IRRADIATION OF READY-TO-EAT SAUSAGES CONTAINING LYCOPENE

M.C. GÁMEZ¹, M.L. GARCÍA¹, M.D. SELGAS¹ and M.M. CALVO^{2*}

¹Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos,
Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense 28040, Madrid, Spain

²Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición. CSIC. C/ Juan de la Cierva 3,
28006 Madrid, Spain

*Corresponding author: Tel. +34 91 5622900,
e-mail: mmcalvo@ifi.csic.es

ABSTRACT

The objective was to obtain a new ready-to-eat (RTE) dry fermented sausage enriched with lycopene by the addition of dry tomato peel as font of this carotene; the product was submitted to irradiation and stored. The effect of these treatments on microbiota, lycopene concentration, physico-chemical and sensory properties were studied. Levels of total viable bacteria, lactic acid bacteria and *Micrococcaceae* decreased as a result of irradiation. Lycopene content was not affected by irradiation and storage. The *b** and the hue angle showed the largest changes of colour parameters. The tomato peel modified slightly the texture parameters. Sensory quality was not acceptable in 4 kGy irradiated samples. A new RTE product enriched with lycopene was obtained.

- Key words: dry fermented sausages, dry tomato peel, irradiation, lycopene, ready-to-eat -

ARTÍCULO 2

Effect of E-beam treatment on the chemistry and on the antioxidant activity of lycopene from dry tomato peel and tomato powder.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62, (2014), 1557-1563.

Effect of E-Beam Treatment on the Chemistry and on the Antioxidant Activity of Lycopene from Dry Tomato Peel and Tomato Powder

M. Carmen Gámez,[†] Marta M. Calvo,^{*,‡} M. Dolores Selgas,[†] M. Luisa García,[†] Katrin Erler,[§] Volker Böhm,[§] Assunta Catalano,^{||} Rossella Simone,^{||} and Paola Palozza^{||}

[†]Department of Nutrition, Bromatology and Food Technology, Faculty of Veterinary, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

[‡]Institute of Food Science Technology and Nutrition, ICTAN-CSIC. C/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

[§]Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Straße 25-29, D-07743 Jena, Germany

^{||}Institute of General Pathology, Catholic University School of Medicine, Largo F Vito, I-00168 Roma, Italy

ABSTRACT: Tomato powder (TP) and dry tomato peel (DTP) have been previously used in our laboratory as a source of lycopene to manufacture meat products ready-to-eat (RTE) submitted to E-beam irradiation with good technological and sensory results. Present work describes the studies performed in order to investigate the effect of radiation on chemical changes and antioxidant properties of lycopene. DTP and TP were irradiated (4 kGy). Changes on lycopene were analyzed by HPLC; inhibition of reactive oxygen species (ROS), possible modulation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) cascade, nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells (NP- κ B) activation and expression of proteins involved in oxidation stress were analyzed in RAT-1 fibroblasts cell culture. Radiation reduced the content of *all-E*-lycopene and increased (*Z*)-lycopene, lycopene isomerization, and degradation being higher in DTP than in TP. E-Beam treatment increased the antioxidant ability of both DTP and TP in inhibiting spontaneous and H₂O₂-induced oxidative stress in cultured fibroblasts. Antioxidant activity was higher in DTP than in TP samples.

KEYWORDS: tomato peel, tomato powder, radiation, lycopene antioxidant activity, lycopene changes

■ INTRODUCTION

Epidemiological and clinical studies have suggested health benefits of tomatoes and tomato-based food products.^{1,2} Dietary intake of tomato and tomato products has been shown to be associated with decreased risk of cardiovascular diseases³ and of certain cancers, including those of the digestive tract, prostate, and pancreas.⁴ Lycopene is responsible for the deep-red color of tomatoes and tomato-based foods, and it is the most representative carotenoid in ripe tomato. In recent years, there have been suggestions that lycopene may be responsible for the health benefits of tomato-based food products. Although several mechanisms have been implicated in such beneficial effects, one of the most evoked is lycopene's ability as an antioxidant agent.⁵ Food enrichment with lycopene and/or tomato products may represent a good strategy to improve health. Ahuja et al.⁶ added tomato to olive oil and Sahin et al.⁷ to quail egg. In the case of meat products, tomato paste was added to beef patties,⁸ to frankfurters,⁹ or to low-fat sausages;¹⁰ tomato juice was added to low-fat pork sausages.¹¹

Calvo et al.¹² patented a method to add dry tomato peel (DTP) to meat and fish products with good results.^{13,14} They proposed partial removal of water by centrifugation, and consequently soluble compounds, before drying to obtain tomato powder (TP) (unpublished data). Both DTP and TP can be considered as good sources of lycopene for food enrichment. The main advantage of addition of DTP and TP is that it is not necessary for lycopene extraction by organic solvents or supercritical fluids, eliminating the associated costs. Moreover, they contribute to solving the environmental

problem that involves the removal of the surplus and byproducts from the tomato industry.

E-Beam treatment has been identified as a new nonthermal technology that can eliminate pathogenic microorganisms from raw foods in both the fresh and frozen state,¹⁵ and it has been successfully used in fish and crustacean,^{16,17} chestnuts,¹⁸ mushrooms,¹⁹ meat products, etc.^{20,21} Radiation is known to cause several changes in lipids and proteins that lead to undesirable changes in odor and color, which can affect consumer acceptance of the product; the changes depend on the product and on the radiation dosage.

In previous works performed in our laboratory, ready-to-eat functional meat products were designed in which the E-beam treatment was applied to ensure the hygienic quality. DTP and TP were used as source of lycopene as bioactive compound. The results obtained indicated that doses up to 4 kGy are useful to obtain a good microbiological and technological quality.^{22,23}

At the moment, however, it is not clear if the E-beam treatment may result in changes in the lycopene from tomato products (DTP and TP) which could compromise the physiological activity of this carotene. For that, the objective of this work is to analyze the effect of this irradiation treatment on the levels of lycopene isomerization and degradation and its antioxidant activity, its ability in inhibiting intracellular reactive

Received: October 29, 2013

Revised: January 23, 2014

Accepted: January 29, 2014

Published: January 29, 2014

ARTÍCULO 3

Tomato powder low in serum as a source of lycopene to meat products.

Fleischwirtschaft International, 6, (2014), 63-67.

Tomato powder low in serum as a source of lycopene to meat products

By Marta María Calvo, María del Carmen Gámez, María Luísa García, María Dolores Selgas

Dry tomato powder from which most of aqueous phase (serum) was removed (Low Serum Tomato Powder) has been used for the enrichment of hamburgers and dry fermented sausages in lycopene. Different amounts of LSTP were tested to determine the maximum that could be incorporated without significantly harming the technological and sensory properties or consumer acceptability of the products. Sensory properties were analysed using a hedonic test. Texture characteristics were instrumentally determined and colour was checked using the colour space CIE L*a*b*. Good technological and sensory quality was obtained with LSTP levels up to 4% (w/w) in hamburgers and 1.5% (w/w) in dry fermented sausages. These amounts imply that 1 kg of an enriched hamburger could provide 64 mg of lycopene, while 1 kg of dry fermented sausage could provide 20.8 mg of lycopene. Moreover, the use of LSTP in meat products as a lycopene source is proposed as a way to exploit surplus in the tomato industry and to enhance the enrichment with bioactive compounds.

The incontestable importance of the tomato producing industry is rooted in the regular growth in consumption observed over the past twenty years. The highest overall consumptions of tomato products are found in Europe and in the USA (www.tomato-news.com/resources.html). The increase in the production of some countries like China had produced an increase in the surpluses of traditional producers like USA and some European countries. One way to use this surplus is the obtaining of bioactive compounds. Tomato provides an essential source of vitamin C, potassium, antioxidants primarily lycopene, and others as fibre.

Lycopene is a carotene found in a great number of red fruits and vegetables, as in tomatoes, where it is the predominant carotenoid. It is also the major carotenoid in human serum. Epidemiological and clinical studies have suggested that lycopene is responsible for the health benefits of tomato based food products (VIUDA-MARTOS et al., 2014). Although several mechanisms have been implicated in such beneficial effects, the most evoked ability is the strong antioxidant effect (ROHLIK and PIPEK, 2012; SERLENE et al., 2013) with a preventive action against cardiovascular diseases (WILLCOX, 2003) and several types of cancer. Its role as a modulator of numerous biological processes, including intercellular gap junction communication, hormone activity, the immune response and metabolic pathways are also investigated (BLUM et al., 2005).

Numerous researchers have added different tomato preparations to meat products with different objectives as reduction of nitrite, decrease lipid oxidation or increase antioxidant capacity. CANDOGAN (2002) added tomato paste to beef patties; YILMAZ et al. (2002) added tomato juice to low-fat sausages; SANCHEZ-ESCALANTE et al. (2003) added oleoresins and frozen tomato pulp to beef patties; OSTERLIE and LERFALL (2005) added sun-dried tomatoes to minced meat; DEDA et al. (2007) added tomato paste to Frankfurters; KIM et al. (2011) added tomato paste mixed with olive oil and dried tomato to low-fat pork sausages; and EYLER and OZTAN (2011) added dried tomato powder to frankfurters. Our research group has added dry tomato peel to hamburgers and dry fermented sausages to enrich these meat products in lycopene (CALVO et al. 2007; CALVO et al., 2008; GARCIA et al., 2009). The meat products obtained presented good technological and sensory properties and contained a level of lycopene that can increase the intake of this carotene in the diet.

Keywords

- › Tomato powder
- › Lycopene
- › Hamburger
- › Dry fermented sausages

This work describes experiments performed with tomato powder named low serum tomato powder (LSTP), in which most of the serum has been removed before drying. The interest of the serum elimination is to remove the tomato soluble fibre that could modify the texture properties (viscosity and gelling ability) of foods at which the LSTP could be incorporated. As a contribution to the actual demand of more healthy foods, this work studied the feasibility of LSTP as source of bioactive compounds (lycopene) in fresh (hamburgers) and dry fermented meat products. The maxima amounts of tomato powder that can be incorporate to the meat products has been determined as well as the physico-chemical and sensory properties of the final meat products.

Material and methods

Preparation of tomato low in serum

Tomatoes were purchased in a local market, cleaned and grounded at room temperature in a Robot-Coupe Mod R20 V.V. (Vincennes Cedex, France) grinder; the tomato paste obtained was centrifuged at 7000 g for 15 min. at 5 °C in order to eliminate the serum. The pellet (LSTP) was frozen and dried in a lyophiliser. Then, it was ground in a mill until to obtain a particle size of 0.025 to 0.05 mm. This powder was stored in the dark at -30 °C until use.

Hamburger manufacture

The Hamburgers were manufactured with fresh beef meat ground up using a 3-mm plate. Four batches were manufactured: a control batch without LSTP and three batches containing 2 (H.2), 4 (H.4) and 6 (H.6) g of LSTP/100 g of product. The LSTP was added to the meat and mixed in an automatic mixer until a homogeneous distribution appeared. The hamburgers were molded into plates with a diameter of 10 cm and a height of 1 cm. All the batches were manufactured in triplicate.

The Hamburgers were cooked for 2 min. on each side using a grill preheated to 150 °C. The temperature inside the meat was close to 60 °C, as measured by a portable digital thermometer. This treatment was sufficient to obtain a good degree of doneness.

Sausage manufacture

The sausages were manufactured according to a traditional formula for Spanish salchichón: 80% pork meat, 15% pork backfat and 5% of a commercial mixture of salt and spices designed especially for dry fermented sausages. The meat and fat were cut using the same chopper and mixer as that used for hamburgers manu-

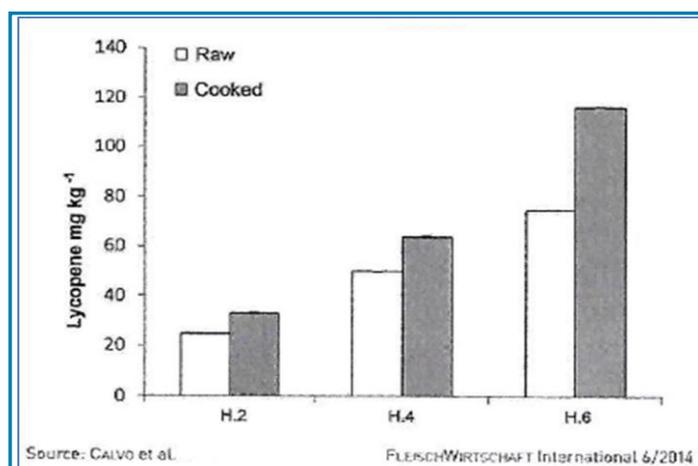


Fig. 1: Lycopene content in raw and cooked hamburgers enriched with 2 (H.2), 4 (H.4) or 6 (H.6) mg LSTP kg⁻¹ hamburger.

facture. LSTP was homogeneously mixed with the spices and added to the meats. Four batches were manufactured: a control batch without LSTP and three batches containing 1 (S.1), 1.2 (S.1.2) and 1.5 (S.1.5) g of LSTP/100 g of mixture. Higher amounts raised problems of cohesion between the particles of ground beef and difficult meat handling and stuffing. The final mixtures were stuffed into artificial casings (50 mm diameter) previously humidified with lukewarm water. Ripening was carried out in a laboratory ripening cabinet type Ibercex (Madrid, Spain) under the following conditions: 22 to 24 °C and 85 to 90% RH for 48 h, then 13 to 16 °C and 88 to 85% RH until the end of ripening (20 days). All batches were manufactured in triplicate.

Lycopene quantification

The lycopene was extracted adding 50 ml of dichloromethane to 10 g of sample (LSTP, ground-up hamburger or sausage) and immediately shaken at 100 rpm for 30 min. at 40 °C in the dark. The dichloromethane phase was filtered (Whatman No. 1 filter paper) and the filtrate was stored under refrigeration. The extraction process was repeated until the solvent had no colour. The fractions were evaporated on a Rotavapor (Büchi, Switzerland). The dry sample was stored at 25 °C in the dark until analysis.

The extracts were diluted with petroleum ether to a known volume and the absorbance of the appropriately diluted extract was mea-

sured at 470 nm using a Beckman Coulter DU spectrophotometer. The lycopene concentration was calculated using the equation described by BRITTON (1955):

$$\text{Lycopene (mg)} = A_{470\text{nm}} \times V \times 537/e$$

where:

- A is the measured absorbance,
- V is the volume of dilution (ml),
- 537 is the molecular weight of lycopene and e is the molar absorption coefficient = 184,900, the value reported by BRITTON (1955) for lycopene dissolved in petroleum ether.

All extractions and quantifications were performed in triplicate.

Textural profile

The textural properties of raw and cooked hamburgers and dry fermented sausages were determined using a texturometer Mod. TA.XT 2i/25 (Stable Micro System, London, UK). A textural profile analysis test was performed using samples measuring 1 cm in height and 2.5 cm in diameter which were compressed twice to 50% of its original height (crosshead speed: 2 mm/s). The following parameters were determined:

- Hardness (N)
- Cohesiveness (ratio) and
- Chewiness (N cm).

At least eight replicates of each batch were analysed.

Colour

The colour of raw hamburgers and dry fermented sausages was measured using a Chroma Meter CR-200 colorimeter (Minolta Co. Osaka, Japan) using the CIE L*a*b* system and calibrated with a raised tile (L* = 44.88, a* = 25.99 and b* = 6.67) using a D₆₅ illumination source. The parameters studied were L* (lightness, 0 to 100), a* (red-green coordinate, -60 to +60) and b* (yellow-blue coordinate, -60 to +60). A total of 20 measurements were taken for each batch at room temperature.

Sensory analysis

The sensory analysis was performed at room temperature in individual booths constructed according to ISO DP 6658 (ISO, 1985) under white fluorescent lights. Unsalted crackers and water were provided to clean the palate between samples. A hedonic test was performed

Tab. 1: Influence of the amount of low serum tomato powder (LSTP) (g Kg⁻¹ of meat product) in the colour parameters of raw and cooked hamburgers and dry fermented sausages.

Meat product	Batch	L*	a*	b*
Raw hamburger				
	Control	45.41 ± 2.86 ^a	23.12 ± 2.23 ^b	11.64 ± 0.87 ^c
	H.2	42.23 ± 4.61 ^b	25.41 ± 2.54 ^a	13.97 ± 1.87 ^b
	H.4	42.50 ± 3.44 ^b	27.09 ± 3.41 ^a	16.42 ± 2.28 ^a
	H.6	40.57 ± 3.63 ^b	26.76 ± 2.53 ^a	17.36 ± 2.18 ^a
Cooked hamburger				
	Control	45.42 ± 5.23 ^a	9.44 ± 1.46 ^b	12.19 ± 1.16 ^c
	H.2	39.84 ± 3.60 ^b	12.24 ± 1.23 ^a	13.93 ± 0.99 ^b
	H.4	39.89 ± 2.13 ^b	14.00 ± 1.27 ^a	15.82 ± 1.43 ^a
	H.6	38.51 ± 2.68 ^b	14.74 ± 0.95 ^a	16.72 ± 1.07 ^a
Dry fermented sausage				
	Control	59.78 ± 4.24 ^a	10.51 ± 2.52 ^c	10.69 ± 1.27 ^c
	S.1	52.67 ± 4.08 ^b	17.14 ± 2.76 ^b	15.19 ± 2.10 ^b
	S.1.2	48.72 ± 2.84 ^c	20.53 ± 2.12 ^a	16.70 ± 2.30 ^a
	S.1.5	47.13 ± 2.26 ^c	21.22 ± 1.45 ^a	17.41 ± 2.03 ^a

Means in column with common letter are not different (p < 0.05)

Source: CALVO et al.

FLEISCHWIRTSCHAFT International 6/2014

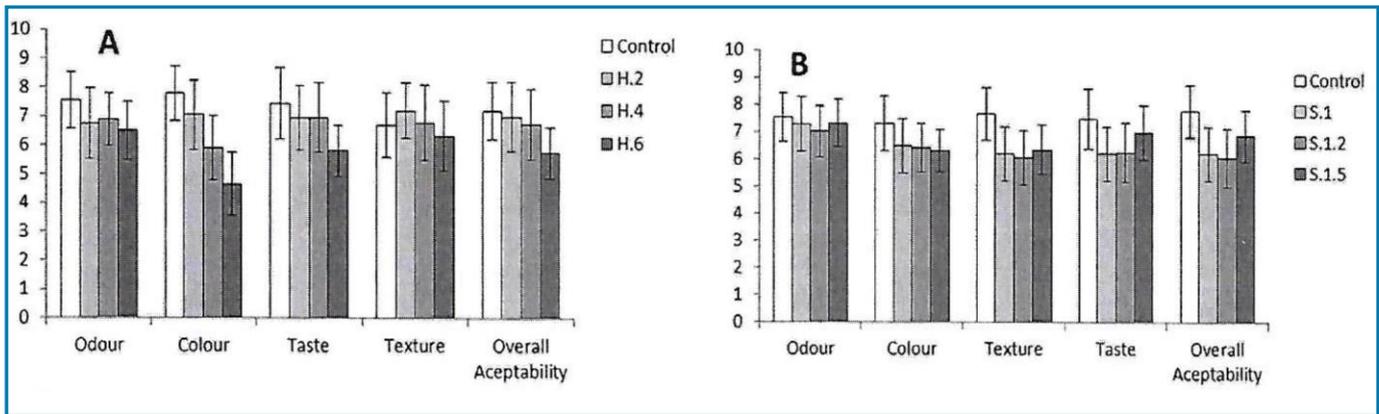


Fig. 2: Sensory properties and overall acceptability of cooked hamburgers (A) and dry fermented sausages (B) with and without low serum tomato powder. Standardised assessors gave scores from 0 (extremely dislike) to 10 (extremely like).

by 45 untrained panellists selected according to their habits, familiarity with the products analysed, and the sensitivity and reproducibility of their evaluations. A non-structured, 10-point hedonic scale (0 = extremely dislike, 10 = extremely like) was used to evaluate the following attributes: odour, colour, texture, taste and overall acceptability. The cooking of hamburgers and the slicing of dry-fermented sausages (2 mm thickness) were performed immediately before the analysis.

Statistical methods

The statistical analysis of results was carried out using one-way analysis of variance, followed by Duncan's multiple range tests to determine significant differences (Statgraphics 5.0 Plus System, Statistical Graphics, Herndon, VA, USA).

Results and discussion

The lycopene concentration of the LSTP used ranged between 920 and 1400 mg x kg⁻¹. These variations exist due to several factors like the degree of tomato ripening or the presence of different tomato cultivars.

The lycopene concentration in the raw and cooked hamburgers was in a good correlation (0.999 and 0.989 respectively) with the amount of LSTP added. The lycopene values were higher in cooked hamburgers than in raw ones (Fig. 1), due to the fact that heating improves the solvent extraction and the recovery of lycopene. In this way, GÄRTNER et al. (1997), and GARCIA et al. (2009) reported that food processing steps break down the cell walls and make that the lycopene becomes more accessible to the solvents; it has been also described that these steps weak the bonds between phytochemicals and the tissue matrix (as the meat products) and, in this way, the lycopene could be more easily released (DEWANTO et al., 2002).

It was impossible to use the same levels of LSTP in dry fermented sausages as in hamburgers because high LSTP levels made the sausage mixture less cohesive; for this reason the concentration of lycopene was lower in dry fermented sausages than in hamburgers. The lycopene concentrations determined in ripened dry fermented sausages were 12.9 ± 0.09, 17.8 ± 0.14 and 20.8 ± 0.08 mg x kg⁻¹ in the batches S.1, S.1.2 and S.1.5 respectively.

According to these results, one hamburger of 100 g and 100 g of dry fermented sausages manufactured with the maximal amount of LSTP would provide 11.7 and 2.08 mg lycopene, respectively.

RAO and SHEN (2002) indicated that a daily intake of 5 to 10 mg of lycopene is adequate for maintaining serum lycopene levels and reducing lipid peroxidation which yield cyto- and genotoxic compounds. DEVARAJ et al. (2009) reported that daily intake of 6.5 mg is

enough to decrease biomarkers of oxidative stress, particularly of oxidative DNA damage.

The effect of LSTP addition on the colour of raw and cooked hamburgers is shown in Table 1. The presence of LSTP affected all colour parameters of raw hamburgers. The L* values showed a downward trend while a* showed the contrary tendency when LSTP was added, but no significant differences were found; the b* values increased (p<0.05) with increasing LSTP up to 4%, and no differences were found between the 4% and 6% batches. This could be due to a colour saturation and indeed, the saturation index behaved as the b* parameter in our experiments. Similar behaviour was found in the colour of cooked hamburgers.

LSTP addition influenced colour parameters of dry fermented sausages (Tab. 1). The L* values differed significantly between the control batch and batches containing LSTP. The control batch showed the highest values, while differences were not found between sausages containing 1.2 or 1.5% of LSTP. The parameters a* and b* tended to increase with LSTP and there were no significant differences between the batches containing 1.2 or 1.5% of LSTP.

These changes are a reflect of the high colourant power of lycopene, which is a red pigment that can shift the colour towards orange. These results agree with those reported by CANDOGAN (2002), CALVO et al. (2008), GARCIA et al. (2009) and KIM et al. (2011) who also observed that the addition of tomato derivatives to meat products affect to the a* and b* parameters. These researchers also observed a decrease in L* with increasing amount of lycopene.

Table 2 shows the effect of LSTP on the textural properties of meat products. LSTP increased significantly the hardness and chewiness of raw hamburgers only in batches with a 6% addition. The textural properties of cooked hamburgers were very similar regardless of the LSTP concentration and a significant decrease was observed only in cohesiveness in batches containing more than 4% of LSTP. GARCIA et al. (2009) added dry tomato peel to hamburgers and observed that cohesiveness was modified with a 1.5% and hardness with a 4% addition. They explained these differences with the presence of insoluble fibre, cellulose and lignin, could influence hardness. Taking into account that during the LSTP preparation a part of the soluble fibre is eliminated with the serum, there is a residual insoluble fibre that can interfere with the gel development during cooking. It is possible that fibre molecules, by their size, difficult the approaching of the proteins preventing the formation of the characteristic protein network and consequently favouring the decreased of cohesiveness. This result is important because a low cohesiveness can condition the handling of the hamburgers during the manufacture process.

Moreover, YILMAZ and DADIOGLU (2003) manufactured reduced-fat meatballs enriched with insoluble fibre and reported that the increase in fibre increased the firmness, independently of the fat con-

Tab. 2: Textural properties of raw and cooked hamburgers and dry fermented sausages containing low serum tomato powder (LSTP).

Meat products	Batches	Hardness (N)	Cohesiveness (ratio)	Chewiness (N cm)
Raw hamburger	Control	12.06 ± 1.53 ^b	0.44 ± 0.44 ^a	1.48 ± 0.40 ^b
	H.2	16.08 ± 5.63 ^{ab}	0.46 ± 0.77 ^a	1.53 ± 0.40 ^b
	H.4	15.44 ± 3.95 ^{ab}	0.44 ± 0.03 ^a	1.77 ± 0.48 ^b
	H.6	20.37 ± 5.89 ^a	0.47 ± 0.05 ^a	2.69 ± 0.76 ^a
Cooked hamburger	Control	37.83 ± 4.26 ^a	0.68 ± 0.01 ^a	9.39 ± 1.09 ^a
	H.2	38.30 ± 2.54 ^a	0.66 ± 0.02 ^{ab}	9.20 ± 1.16 ^a
	H.4	39.54 ± 2.86 ^a	0.65 ± 0.02 ^b	10.18 ± 0.85 ^a
	H.6	38.43 ± 4.08 ^a	0.64 ± 0.02 ^b	9.31 ± 1.46 ^a
Dry fermented sausage	Control	97.30 ± 5.09 ^c	0.54 ± 0.04 ^a	25.05 ± 5.70 ^a
	S.1.0	117.69 ± 7.86 ^b	0.50 ± 0.03 ^b	27.07 ± 4.27 ^a
	S.1.2	113.91 ± 9.93 ^b	0.50 ± 0.02 ^b	25.45 ± 2.30 ^a
	S.1.5	133.30 ± 9.93 ^a	0.47 ± 0.03 ^c	28.25 ± 4.71 ^a

Means in column with common letter are not different ($p < 0.05$)

Source: CALVO et al.

FLEISCHWIRTSCHAFT International 6/2014

tent. These controversial results indicate that the textural changes must be taken into account when the most appropriate LSTP content in hamburgers has to be determined.

The hardness of dry fermented sausages increased significantly when LSTP was added (Tab. 2). Cohesiveness was significantly lower in the batches containing LSTP than in the control batch ($p < 0.05$). No significant influence of LSTP in chewiness was found. Similar results have been reported by KIM et al. (2011). The presence of the insoluble fibre in LSTP may explain the increase of hardness and the decrease of cohesiveness. It has been described that the structure of insoluble fibre is complex and quasi-crystalline at high concentrations, making it easier for fibre-rich structures to crumble (GARCÍA et al., 2002). Nevertheless, changes in cohesiveness were not so large as to affect the ability of the sausage to linkage so sausage containing LSTP should be technologically viable.

Cooked hamburgers received scores higher than 5 for all sensory parameters (Fig. 2A), this punctuation was considered as the limit of acceptability. Batches did not differ significantly on the odour parameter; volatile compounds formed during cooking could mask the typical tomato odour. The texture was very similar in all batches containing LSTP and reflects the effect observed in the instrumental analysis. Hamburger H.6 showed the lowest scores for all parameters, mainly for the intensity of the red colour, since this batch contains the highest LSTP.

Batches of dry fermented sausages with or without LSTP received scores higher than 6 (Fig. 2B), although the control batch had the highest scores to all the parameters. The enriched batches showed similar values ($p < 0.05$) although the taste of the batch added with 1.5% of LSTP obtained the higher punctuation. Slight differences ($p > 0.05$) in the taste scores between batches could be a direct consequence of the fibre content and the hint of tomato taste that consumers do not expect in this type of meat products. Similar results have been obtained by KIM et al. (2011) in sausages with tomato powder. They indicate that the addition of tomato powder up to 1.5% has no negative effect on the acceptability of the sausages rather it has partially improved the flavour of the product.

Conclusions

Low serum tomato powder is useful for enriching hamburgers and dry fermented sausages with lycopene. The sensory quality remains good at concentrations up to 4% in hamburgers and up to 1.5% in sausages. Both meat products had a characteristic colour due to the presence of this carotene. These new meat products are adequate for providing the recommended daily amount of lycopene in a normal diet.

Acknowledgements

We acknowledge support from the CONSOLIDER-Ingenio 2010 program (CSD 2007-00016) and from the Grupo Santander-UCM research consortium (No. 920276, Ref. GR58/08).

References

- BLUM, A., M. MONIR, I. WIRSANSKY and S. BEN-ARZI (2005): The beneficial effects of tomatoes. *European Journal of International Medicine* 16, 402-404.
- BRITTON, G. (1995): UV/Visible spectroscopy. In: Britton G., S. Liasen-Jensen and H. Pfander: Carotenoids. Volume 1B: Spectroscopy (56-57). Berlin: Birkhäuser Verlag.
- CALVO, M.M., M.J. RODRÍGUEZ, J.G. SANTA-MARÍA, M.D. SELGAS and M.L. GARCÍA (2007): Productos cárnicos y de la pesca enriquecida en licopeno mediante la adición de piel de tomate. Patent (P200701670).
- CALVO, M.M., M.L. GARCÍA and M.D. SELGAS (2008): Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel. *Meat Science* 80, 167-172.
- CANDOGAN, K. (2002): The effect of tomato paste on some quality characteristics of beef patties during refrigerated storage. *European Food Research Technology*, 215, 305-309.
- DEDA, M.S., J.G. BLOUKAS and G.A. FISTA (2007): Effect of tomato paste and nitrite level on processing and quality characteristics of frankfurters. *Meat Science* 76, 501-508.
- DEVARAJ, S., S. MATHUR, A. BASU, H.H. AUNG, V. VASU, S. MEYERS and I. JIALAL (2009): A dose-response study on the effects of purified lycopene supplementation on biomarkers of oxidative stress. *Journal American College Nutrition* 27, 267-273.
- DEWANTO, V., X. WU, K.K. ADOM and R.H. LIU (2002): Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3010-3014.
- EYLER, E. and A. OZTAN (2011): Production of frankfurters with tomato powder as a natural additive. *LWT - Food Science and Technology* 44, 307-311.
- GARCÍA, M.L., R. DOMÍNGUEZ, M.D. GÁLVEZ, C. CASAS and M.D. SELGAS (2002): Utilization of cereal and fruit fibres in low fat fermented sausages. *Meat Science* 60, 227-236.
- GARCÍA, M.L., M.M. CALVO and M.D. SELGAS (2009): Beef hamburgers enriched in lycopene using dry tomato peel as an ingredient. *Meat Science* 83, 45-49.
- GÄRTNER, C., W. STAHL and H. SIES (1997): Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *American Journal of Clinical Nutrition* 66, 116-122.
- KIM, I.L., S.K. JIN, P.K. MANDAL and S.N. KANG (2011): Quality of low-fat pork sausages with tomato powder as colour and functional additive during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology* 48, 591-597.
- OSTERLIE, M. and J. LERFALL (2005): Lycopene from tomato products added minced meat: Effect on storage quality and colour. *Food Research International* 38, 925-929.
- RAO, A.V. and H.L. SHEN (2002): Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. *Nutrition Research* 22, 1125-1131.
- ROHLÍK, B.A. and P. PIPEK (2012): Rosemary extract and its affect on meat products' properties. *Fleischwirtschaft International* 27, 70-74.
- SÁNCHEZ-ESCALANTE, A., G. TORRESCANO, D. DJENANE, J.A. BELTRÁN and P. RONCALÉS (2003): Stabilisation of colour and odour of beef patties by using lycopene-rich tomato and peppers as a source of antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83,

- 187-194. - 18. SERLENE, J., M.K. CHATLI, A.K. BISWAS and J. SAHOO (2013): Efficacy of lyophilized tomato peel powder as an antioxidant in raw pork emulsion. *Fleischwirtschaft International* 28, 146-152. - 19. VIUDA-MARTOS, M., E. SANCHEZ-ZAPATA, E. SAYAS-BARBERA, E. SENDRA, J.A. PEREZ-ALVAREZ and J. FERNANDEZ-LOPEZ (2014): Tomato and tomato byproducts. Human health benefits of lycopene and its application to meat products: a review. *Critical reviews in food science and nutrition* 54, 1032-1049. - 20. WILLCOX, J.K., G.L. CATIGNANI and S. LAZARUS (2003): Tomatoes and cardiovascular health. *Critical reviews in food science and nutrition* 43, 402-404. - 21. YILMAZ, I., O. SIMSEK and M. ISIKLI (2002): Fatty acid composition and quality characteristics of low-fat cooked sausages made with beef and chicken meat, tomato juice and sunflower oil. *Meat Science* 62, 253-258. - 22. YILMAZ, I. and O. DAGLIOGLU (2003): The effect of replacing fat with oat bran and fatty acid composition and physicochemical properties of meatballs. *Meat Science* 65, 819-823.

Authors' addresses

Marta María Calvo, Ph D, (corresponding author: mmcalvo@ictan.csic.es), Food Science Technology and Nutrition Institute (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain; María del Carmen Gámez, B. D., María Luísa García, Ph D, María Dolores Selgas, Ph D, Department of Food Science and Technology, Veterinary School, Complutense University, 28040 Madrid, Spain.

ARTÍCULO 4

**E-beam treatment to extend the shelf-life of meat products containing
low serum tomato powder.**

Radiation Physics and Chemistry. Under review

----- Forwarded message -----

From: **Radiation Physics and Chemistry** <EviseSupport@elsevier.com>
Date: 2016-12-20 17:05 GMT+01:00
Subject: Submission RPC_2016_362 received by Radiation Physics and Chemistry
To: selgar@vet.ucm.es

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: RPC_2016_362

Title: E-beam treatment to extend the shelf-life of meat products containing low serum tomato powder
Journal: Radiation Physics and Chemistry

Dear Professor. Selgas,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Radiation Physics and Chemistry. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=RPC and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Radiation Physics and Chemistry

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2016 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

--

E-beam treatment to extend the shelf-life of meat products containing low serum tomato powder

M.C. Gámez^a, M.L. García^a, M.D. Selgas^{a*}, M.M. Calvo^b

^aDpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Faculty of Veterinary, Complutense University, 28040-Madrid, Spain

^b Institute of Food Science and Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), 28040-Madrid, Spain

*Corresponding author: selgar@ucm.es, +34913944092

ABSTRACT

This work looks into the effectiveness of E-beam irradiation to extend the shelf-life of ready-to-cook hamburgers and ready-to-eat dry fermented sausages enriched with low serum tomato powder, a new tomato derivative, as a source of lycopene. The meat products were treated with 2 and 4 kGy and stored at 4°C. Lycopene concentration decreased slightly during storage. Minor changes caused by the E-beam treatment were noted in the main sensory and rheological characteristics. The shelf-life was extended to 28 days for hamburgers and to at least 90 days for dry fermented sausages after the application of 4 kGy. Texture and odour were affected but the most of the off-odours diminished with storage time. In any case, evaluators judged the samples to be adequate for consumption. These new products contribute to reaching the daily recommended intake of lycopene.

Keywords: E-beam radiation, enriched meat products, lycopene, shelf-life.

1. Introduction

Lycopene is a carotenoid characterized by its efficiency as an antioxidant compound and its colorant powder. The ingestion of lycopene has been associated with health benefits (Ciriminna et al., 2016) and population studies have shown a protective effect inversely associated with the incidence of certain types of cancer (García-Closas et al., 2005; Chalabi et al., 2008; Seren et al., 2008; Trion et al., 2008; Verghese et al., 2008), cardiovascular diseases (Ried and Fakler, 2011), inflammatory processes (Svelander et al., 2010) and osteoporosis (Rao and Rao, 2007).

Meat products have been successfully enriched with this bioactive compound by directly adding tomato (paste, sauce or juice) or tomato by-products, i.e. beef patties (Sanchez-Escalante et al., 2003; Valenzuela-Melendes et al., 2014), minced meat (Osterlie and Jerfall, 2005; Selgas et al., 2009), cooked meat (Eyiler and Otzan 2011; Doménech-Asensi et al., 2013; Savadhooi et al., 2014), dry fermented sausages (Calvo et al., 2008, 2014) or low fat pork-sausages (Kim et al., 2011). This paper is a contribution to this line.

Waste and surplus agricultural tomato are used to make tomato derivatives carrying lycopene thus

making them an economical way to prevent environmental pollution problems. In this line, Calvo et al. (2014) developed meat products enriched with a new tomato derivative, low serum tomato powder (LSTP), obtained by separating the water which contains soluble compounds, (i.e. soluble fibre) which could change the final texture.

Ready-to-cook (RTC) or ready-to-eat (RTE) foods are very popular because consumers want innovative foods that are high quality, safe, at the same time, easy to prepare. These new trends entail additional handling that could compromise the health safety of products. Indeed, there is a risk of contamination by food-borne pathogens such as *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, or *Listeria monocytogenes* (Park et al., 2010).

The effectiveness of irradiation to improve food safety is well known. It has been demonstrated that doses of 1-4 kGy are sufficient in controlling the foodborne pathogens ensuring hygienic quality without significantly modifying sensory quality (Miller, 2005; Zhu et al., 2005; Cabeza et al., 2007; Cabeza et al., 2009; Calvo et al., 2008; Galán et al., 2011).

Our research group has successfully developed functional meat products added with LSTP as source of lycopene (Calvo et al., 2014). This work addresses

ARTÍCULO 5

In vitro accessibility of lycopene added to Ready To Eat meat products. Meat Science. Under review.

----- Forwarded message -----

From: **Meat Science** <EviseSupport@elsevier.com>

Date: 2017-02-08 13:29 GMT+01:00

Subject: Successfully received: submission In vitro accessibility of lycopene added to Ready To Eat meat products for Meat Science

To: selgar@vet.ucm.es

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: MEATSCI_2017_123

Title: In vitro accessibility of lycopene added to Ready To Eat meat products

Journal: Meat Science

Dear Professor. Selgas,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Meat Science. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into

EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_AC R=MEATSCI and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Meat Science

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

***In vitro* accessibility of lycopene added to ready-to-eat meat products**

Gámez M.C.^a, Selgas M.D.^a, García M.L.^a, Calvo M.M.^b

^a *Department of Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Veterinary Faculty. Complutense University, 28040 Madrid, Spain.*

^b *Food Science Technology and Nutrition Institute (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain*

ABSTRACT

Accessibility of lycopene from ready-to-eat meat products (hamburgers and dry fermented sausages) enriched with tomato derivatives (dry tomato peel and low serum tomato powder) was studied. Electron-beam treatment (2 and 4 kGy) was used to ensure the safety of the meat products and extend their shelf-life. Neither the type of tomato derivative used nor the irradiation treatment influenced accessibility. Dry fermented sausages showed higher lycopene accessibility than hamburgers possibly due to the higher fat content.

Keywords: Accessibility, Lycopene, Irradiation, Hamburgers, Dry fermented sausages.

1. Introduction

One of the most consistent relationships observed is that a diet rich in fruit and vegetables is associated with a lower risk of some diseases (Colle et al., 2013). Lycopene is the predominant carotenoid in tomatoes and is one of the majority carotenoids in human serum. It exhibits a physical quenching rate constant with singlet oxygen almost twice as high as that of β -carotene and ten times as high as that of α -tocopherol. Many studies have demonstrated its role in the prevention of chronic disease, such as cardiovascular diseases or several types of cancer (Holzapfel et al., 2013; Viuda-Martos et al., 2014; Nasir, Hussain, & Jabbar, 2015), which, together with obesity and diabetes constitute the main causes of mortality in developed countries.

In previous works (García, Calvo, & Selgas, 2009; Gámez, García, Selgas, & Calvo, 2011; Gámez et al., 2014) meat products enriched with lycopene have been designed by the addition of two tomato derivatives, dry tomato peel (DTP) and low serum tomato powder (LSTP), as lycopene source.

The manufacture of ready-to-eat (RTE) meat products is a good way to offer consumers high quality, safe and extended shelf-life foods. The preparation of these types of meat products involves an additional manipulation that increases the risk of contamination with pathogens and food-borne

microbiota. In previous studies, Selgas, García, & Calvo (2009) and Gámez et al. (2011) successfully developed conventional and RTE meat products enriched with lycopene in which E-beam irradiation was applied as a non-thermal technology useful to ensure their hygienic quality. Doses of 2 and 4 kGy have been described as high enough to achieve this goal (Galán, García, & Selgas, 2010, 2011).

However, studies on bioactive compounds require complementary tests to establish if these are released from the food matrix during digestion and become accessible for intestinal absorption (Parada & Aguilera, 2007; Hervert-Hernández, Sáyago-Ayerdi, & Goñi, 2010). Several studies have reported the accessibility of lycopene from tomato derivatives: dry tomato peel in extruded snacks (Dehghan-Shoar, Mandimika, Hardacre, Reynolds, & Brennan, 2011), tomato pulp (Colle, Van Buggenhout, Lemmens, Van Loey, & Hendrickx, 2012) or tomato puree (Knockaert et al., 2012).

The present study addresses the accessibility of lycopene added to conventional and RTE meat products (hamburgers and dry fermented sausages) submitted to an E-beam treatment. For this aim, a static *in vitro* method simulating gastrointestinal human digestion was used.

5. DISCUSIÓN INTEGRADORA

Es un hecho constatable que la sociedad actual es plenamente consciente de que sus perspectivas de salud, bienestar y longevidad están directamente relacionadas con la composición de los alimentos que forman parte de la dieta. Los consumidores demandan cada vez más, alimentos sanos, nutritivos y seguros por lo que, desde hace varias décadas, tanto los científicos como la industria alimentaria, han promovido el desarrollo de nuevos alimentos y la mejora de los ya existentes con el fin de cumplir con estas expectativas. Una de las estrategias de mayor interés en la actualidad es el enriquecimiento de alimentos con nutrientes o compuestos bioactivos, cuya actividad biológica en el organismo se traduzca en un beneficio para la salud. Algunos de estos compuestos intervienen en el metabolismo secundario de los vegetales, son los denominados compuestos fitoquímicos y no tienen una función nutricional claramente definida. Aunque no se les puede considerar compuestos esenciales, puesto que no se requieren para nuestro metabolismo, pueden tener un impacto significativo en la prevención o evolución de algunas enfermedades por lo que resultan beneficiosos, a largo plazo, para nuestra salud. Dichos compuestos intervienen ejerciendo alguno de los siguientes efectos: protector del sistema cardiocirculatorio, reductor de la presión sanguínea, regulador de la glucemia y la colesterolemia, reductor del riesgo de cáncer o mejorador de la respuesta inmunitaria.

Uno de los sectores industriales más implicados en esta línea es el de las frutas y hortalizas, el cual genera grandes cantidades de excedentes y de subproductos, procedentes éstos últimos de su transformación y procesado. Tradicionalmente y aún ahora, tanto unos como otros se utilizan para la elaboración de piensos destinados a la alimentación animal o como combustible o compost para la propia industria hortofrutícola. Sin embargo, su riqueza en compuestos bioactivos hace que en los últimos años se hayan abierto nuevas alternativas de uso, entre la que se encuentra su extracción y aprovechamiento como ingredientes naturales para el enriquecimiento de los alimentos, dando así respuesta a la demanda creciente de alimentos más saludables.

El tomate es una de las hortalizas más consumidas en todo el mundo, tanto en crudo como en forma de derivados. Principalmente en la cuenca Mediterránea constituye un componente muy importante de la dieta que toma dicho nombre, la dieta Mediterránea, considerada una valiosa herencia cultural que representa mucho más que una simple pauta nutricional, rica y saludable; es casi un estilo de vida (Bonaccio y col., 2012).

La industria procesadora del tomate tienen un peso importante en la economía española, ya que concentra el 41% de toda la oferta de productos derivados de vegetales (Mercasa, 2016). Sin embargo, es una industria que genera una notable cantidad de

residuos, unas 45.000 toneladas al año (Bravo, 2012) principalmente en forma de semillas y piel (Knoblich y col., 2005; Valle y col., 2006). Dichos residuos son ricos en compuestos beneficiosos para la salud entre los que se pueden mencionar tocoferoles, polifenoles, carotenoides, terpenos, esteroides y vitaminas (Strati y Oreopoulou, 2011; Kalogeropoulos y col., 2012), poseedores de una amplia gama de propiedades como antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, antimicrobianas, antitrombóticas, vasodilatadoras o cardioprotectoras (Viuda-Martos y col., 2014).

El aprovechamiento de dichos subproductos como fuente de ingredientes funcionales constituye, por lo tanto, una actividad irrenunciable y supone además, una importante reducción en el gasto de las industrias procesadoras de tomate, al disminuir los costes que conlleva la eliminación de residuos. En este sentido, la legislación actual (Ley 22/2011) obliga a la industria agroalimentaria a hacerse cargo de la eliminación de los residuos generados, con el objetivo de evitar las graves consecuencias medioambientales que conlleva su inadecuado manejo.

El tomate es rico en potasio, fósforo, magnesio y vitaminas B₁, B₂, B₅ y C. Pero lo más importante para este trabajo es su alto contenido en carotenoides tales como: α y β -caroteno, luteína y, sobre todo, licopeno que, además de conferirle su característico color rojo, es un potente antioxidante. En la Introducción de esta Tesis (apartado 1.3.3) se ha descrito de forma amplia el potencial antioxidante y los efectos beneficiosos que el licopeno aporta a la salud.

Dentro de la profunda transformación que las costumbres alimentarias han experimentado en los últimos años, principalmente inducida por las exigencias del ritmo de vida de la sociedad actual, es cada vez más frecuente el consumo de comidas preparadas seguras, nutritivas y de fácil y rápido consumo, tanto en el hogar como fuera del mismo. La industria alimentaria ha tenido que adaptarse a esta nueva demanda y ha desarrollado un nuevo tipo de alimentos con un procesado mínimo que apenas exige una preparación culinaria; son los denominados alimentos listos para el consumo o Ready To Eat (RTE). Sin embargo, su proceso de elaboración lleva consigo algunas operaciones y manipulaciones que favorecen la contaminación por microorganismos patógenos y/o alterantes; por ello es necesario realizar un tratamiento posterior al envasado que asegure la calidad higiénica de estos alimentos. Las tecnologías que se pueden aplicar han de ser no térmicas, pues son capaces de asegurar la calidad higiénica de estos alimentos haciendo que no solo sean sanos y nutritivos, sino que provoquen pérdidas mínimas de las características organolépticas y del valor nutritivo que causaría la aplicación de un tratamiento térmico

convencional. Entre estas tecnologías se encuentra la irradiación mediante la aplicación de electrones acelerados.

El diseño de productos cárnicos funcionales constituye una excelente oportunidad de diferenciación, diversificación y posicionamiento dentro de un mercado en continuo crecimiento. A este respecto la carne y los productos cárnicos se perfilan como un excelente vehículo por su gran versatilidad, su alto valor nutritivo, su consumo habitual y por la amplia gama y formas de presentación existentes en el mercado. Estos productos contribuyen a mejorar la deteriorada imagen que ha tenido la carne en los últimos años al relacionarse su consumo con el desarrollo de algunas enfermedades como las cardiovasculares, la obesidad y la diabetes (Jiménez-Colmenero y col., 2001). Los productos cárnicos funcionales no deben ser ajenos a las nuevas tendencias y su proyección natural pasa por su comercialización en las mismas condiciones y formatos que los productos convencionales, es decir, como productos RTE. Bien es cierto que esta nueva forma de preparación conlleva la necesidad de estudiar qué es lo que le pasa al compuesto bioactivo adicionado cuando se somete a tratamientos higienizantes. Este es uno de los aspectos que se ha abordado en la presente Tesis.

Por todo lo anteriormente expuesto, el planteamiento del trabajo ha sido diseñar productos cárnicos funcionales enriquecidos en licopeno mediante la incorporación de derivados del tomate procedentes de subproductos y excedentes de la industria tomatera. Así mismo, se ha abordado su transformación en productos RTE, a los que se les ha aplicado radiaciones ionizantes (electrones acelerados) como tratamiento no térmico higienizante. En todos ellos se han estudiado sus características tecnológicas y sensoriales así como los posibles cambios en la concentración de licopeno a lo largo del periodo de almacenamiento en refrigeración.

Además se ha realizado un estudio de la capacidad antioxidante del licopeno presente en los derivados del tomate estudiados, antes y después del tratamiento con electrones acelerados, con el fin de conocer su efecto en dicha capacidad antioxidante, cuya importancia justifica la utilización de este carotenoide en el presente trabajo.

Finalmente, se ha realizado un ensayo *in vitro* para estimar la cantidad de licopeno que estaría potencialmente disponible para su absorción a nivel intestinal y, por lo tanto, desarrollar la función para la que ha sido incorporado.

5.1. Viabilidad tecnológica y sensorial de productos cárnicos enriquecidos con licopeno

En este apartado se recogen los resultados obtenidos en relación a la obtención de los derivados del tomate utilizados como fuente de licopeno y las características tecnológicas y sensoriales de los productos cárnicos con los que se ha trabajado: frescos (hamburguesa) y madurados (salchichón).

5.1.1. Obtención de los derivados de tomate e incorporación a los productos cárnicos

Como fuente de licopeno se han utilizado dos derivados del tomate: piel de tomate seca (PTS) (aprovechamiento de un subproducto de la industria tomatera) y tomate entero desuerado y desecado (TDD) (aprovechamiento de excedentes de dicha industria). Ambos derivados se han obtenido siguiendo el método descrito en la sección de Material y Métodos de esta Tesis (apartado 3.2.1).

En primer lugar se determinó la cantidad de cada uno de los derivados de tomate más adecuada para su incorporación a los productos cárnicos.

En el caso de la PTS se incorporó un 4% en hamburguesas y un 2% en los productos cárnicos madurados. Estas cantidades habían sido seleccionadas por nuestro grupo de investigación en trabajos previos (Calvo y col., 2008; García y col., 2009) en los que se habían ensayado diferentes cantidades de este derivado; la selección se hizo por haber sido éstas las mayores cantidades de PTS con las que se obtuvieron buenos resultados tanto tecnológicos como sensoriales. En el caso de la TDD, las cantidades ensayadas fueron entre 2-6% en los cárnicos frescos y 1-1,5% en los madurados. Los mejores resultados se obtuvieron con 4% para los frescos y 1,5% para los madurados. En todos los casos, se consideró como cantidad límite aquella en la que las características tecnológicas o las sensoriales podían verse comprometidas; como, por ejemplo, una pérdida de cohesión en los productos cárnicos que dificultaba su manejo o sabores excesivamente intensos “a tomate”.

Para su transformación en alimentos RTE, los productos cárnicos enriquecidos se envasaron a vacío y se sometieron al tratamiento con electrones acelerados. Se aplicaron dosis de 2 y 4 kGy.

5.1.2. Características físico-químicas de los productos cárnicos

Seguidamente se estudió el posible efecto de los derivados de tomate en el pH y a_w de los productos cárnicos. La adición de PTS y TDD provocó un descenso del pH de los productos cárnicos elaborados. Dicha disminución fue directamente proporcional a la cantidad de derivado añadida debido al bajo pH de los mismos (4,02 y 4,33 en PTS y TDD respectivamente). Diferentes autores han descrito descensos similares del pH al adicionar derivados de tomate a distintos productos cárnicos frescos (Candogan, 2002; Østerlie y Lerfall, 2005; García y col., 2009), madurados (Yilmaz y col., 2002; Kim y col., 2011) y cocidos (Deda y col., 2007; Eyiler y Oztan, 2011).

El pH se mantuvo estable después del tratamiento de irradiación, lo que también ha sido descrito por diferentes autores (Chouliara y col., 2006; Selgas y col., 2009; Kanatt y col., 2015). Tampoco se observaron cambios del pH a lo largo del tiempo de almacenamiento, al igual que ha descrito Kim y col. (2013) en diferentes productos cárnicos enriquecidos con compuestos fenólicos.

No se observaron cambios significativos en la a_w y los valores medios determinados fueron similares a los descritos en la literatura científica para estos mismos tipos de productos cárnicos convencionales: 0,97 para productos cárnicos frescos (Besbes y col., 2008) y 0,87 para madurados (Ordoñez y col., 1999). La a_w tampoco se modificó tras la aplicación de radiaciones ionizantes o durante el tiempo de almacenamiento.

5.1.3. Cambios en la concentración de licopeno en los productos cárnicos

Sin duda uno de los aspectos más importantes en este estudio es conocer el comportamiento del licopeno después del procesado de los productos cárnicos. Para ello, se determinó su concentración tanto en los derivados de tomate utilizados, como en los productos cárnicos enriquecidos.

El contenido de licopeno en la PTS osciló entre 132-148 mg/100 g, mientras que en el TDD se obtuvieron concentraciones entre 92-140 mg/100 g. Esta variación era lógica de esperar ya que, aunque la variedad de tomate que se utilizó siempre fue la misma, *pero*, es muy difícil que el contenido de licopeno sea siempre el mismo. Es cierto que la composición química del tomate puede ser bastante diferente de una variedad a otra (Suárez y col., 2008), pero incluso dentro de la misma variedad, el contenido en licopeno depende de diferentes factores como el tipo de cultivar, la técnica utilizada para su cultivo,

el momento de la recolección y, por supuesto, el grado de maduración, que es uno de los factores que más influyen (Thompson y col., 2000). Las diferencias encontradas entre un derivado y otro también fueron lógicas teniendo en cuenta que la cantidad de licopeno es diferente en la piel que en la pulpa y así, Machmudah y col. (2012) describen cómo la piel de tomate puede llegar a contener hasta 5 veces más licopeno que la pulpa.

En los productos cárnicos frescos, la cantidad de licopeno fue la esperada en función de la cantidad del derivado incorporada. Sin embargo, en los productos madurados fue en torno a un 50% menos de la esperada. Es posible que el licopeno presente en cualquiera de los dos derivados de tomate utilizados pudiera reaccionar con algunos radicales libres formados durante la maduración del propio producto cárnico, lo que provocaría su propia destrucción, (Østerlie y Lerfall, 2005; Calvo y col., 2008; Rao y Rao, 2013). Además, se ha descrito que el proceso de saponificación puede interferir en la extracción del licopeno, haciendo que las cantidades determinadas no se correspondan exactamente a la cantidad de este carotenoide en el producto cárnico (Meléndez-Martínez y col., 2004; Calvo y col., 2008). Esta hipótesis también fue expuesta por Oliver y col. (1998) al determinar β -caroteno en productos cárnicos madurados (sobrasada).

El efecto de la irradiación fue diferente según el derivado de tomate adicionado. En el caso del TDD, el contenido en licopeno de los productos cárnicos irradiados disminuyó proporcionalmente al aumento de la dosis de irradiación, registrándose las mayores pérdidas en los productos cárnicos frescos (15%) frente a los madurados (8%).

Las pérdidas de licopeno pueden estar relacionadas con la capacidad de ionización de los electrones acelerados y/o con el diferente contenido en agua de los productos cárnicos, siempre mayor en los frescos que en los madurados. Así, las hamburguesas contienen en torno a un 75-80% de agua (Galán y col., 2010), mientras que los salchichones contienen un 30-34% (Ordoñez y col., 1999). La incidencia de la irradiación en los alimentos provoca la formación de radicales libres derivados de la ruptura y pérdida de estabilidad de los átomos y/o moléculas que los constituyen. Todos ellos son compuestos altamente reactivos como radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno o hidrógeno atómico y molecular (Farkas, 2006). Uno de los componentes de los alimentos que se ven más rápidamente afectados por la irradiación es el agua, proceso que provoca su ionización rindiendo radicales hidronio y electrones libres altamente reactivos e inestables, pudiéndose descomponer en un H^+ y en un radical OH^- que pueden reaccionar con los compuestos del entorno dando lugar a la aparición de una cascada de nuevos radicales libres. El licopeno, como agente antioxidante, contribuye a disminuir el número de

radicales libres y, por lo tanto la reacción de peroxidación lipídica (Rao y Rao, 2013). Como contrapartida, el licopeno va agotándose lo que haría disminuir su contenido en los productos cárnicos. Por esta razón, a mayor contenido de agua, mayor formación de radicales libres y mayor pérdida de licopeno.

Sin embargo, en el caso de la PTS, el contenido de licopeno en los productos madurados no se modificó por el tratamiento de irradiación. Este resultado podría estar relacionado con la estructura de las células de la piel de tomate. Tal y como se ha descrito (Pagalda y Ruiz-Altisent, 1983; López-Casado, 2006) estas células son más resistentes y más gruesas en comparación con el resto de células del tomate y por ello serían menos sensibles al tratamiento de irradiación. En consecuencia, sería necesario aplicar dosis más altas para provocar su rotura y la liberación del licopeno. Además, como se ha mencionado anteriormente, la matriz cárnica ejerce un papel fundamental; en este caso, al ser un producto madurado, su contenido en agua es menor y por ello el efecto de la irradiación se hace menos patente. También sería posible una combinación de ambas explicaciones; en cualquier caso, son hipótesis y sería necesario un estudio más profundo para poder llegar a conocer el efecto de la irradiación en este tipo de producto cárnico.

El tiempo de almacenamiento no provocó cambios significativos en el contenido de licopeno en ningún producto cárnico. En este sentido, existen numerosos estudios que indican que las condiciones más adecuadas de conservación del licopeno son: ausencia de luz, bajas temperaturas y niveles mínimos de oxígeno (Sharma y LeMaguer, 1996; Agarwal y Rao 2000; Anguelova y Warthesen, 2000; Gupta y col., 2010; Shi y col., 2015). La estabilidad del carotenoide en los productos cárnicos frescos y madurados puede deberse a que las condiciones en las que se almacenaron eran las descritas anteriormente como más favorables.

Finalmente, y a pesar de las pérdidas observadas, el contenido final de licopeno de los productos aquí desarrollados sería suficiente para que una hamburguesa de 100 g enriquecida con TDD aportara entre 4,3-11,7 mg de licopeno en función de la cantidad añadida y la ingesta de 100 g de salchichón, enriquecido con PTS o con TDD aportara en torno a 1,2 o 2,1 mg de licopeno, respectivamente.

Aunque no existe una ingesta diaria recomendada de licopeno, estudios llevados a cabo por Rao y Shen (2002), Rao y Rao (2007) y Devaraj y col. (2008) concluyeron que un consumo entre 5-10 mg diarios de licopeno contribuiría a mantener niveles séricos suficientes para disminuir la cantidad de algunos biomarcadores de estrés oxidativo en sangre y además ayudan en la prevención de enfermedades crónicas. En nuestro caso, la

concentraciones determinadas en los productos cárnicos contribuirían a incrementar la cantidad de licopeno ingerido con la dieta por lo que, de acuerdo con el Reglamento (UE) N° 1924/2006 ambos productos podrían ser considerados como *fuentes de licopeno*.

5.1.4. Color

El color es una de las características que más afecta a la apariencia de la carne y de los productos cárnicos, convirtiéndose en un factor decisivo en la elección del consumidor. Por ello es uno de los parámetros que más cuida la industria alimentaria (Dubé y Robles, 2000; Xia y col., 2008).

En términos generales la incorporación de derivados de tomate, hizo que los productos cárnicos adquirieran un ligero tono anaranjado que se vio reflejado en un aumento significativo de los parámetros de color a^* y b^* respecto al lote control al que no se adicionó ningún derivado de tomate. No hay que olvidar que el licopeno es un pigmento de color rojo que aporta una gama de colores comprendida entre el rojo y el anaranjado dependiendo de su nivel de degradación (Knoblich y col., 2005; Sikora y col., 2008). Resultados similares se han descrito en estudios llevados a cabo por Candogan (2002), Deda y col. (2007), Calvo y col. (2008), Eyiler y Otzan (2011), Kim y col. (2011), Savadoohki y col. (2014) y Namir y col. (2015) en diferentes productos cárnicos enriquecidos con otros derivados de tomate como puré, pasta, pulpa fresca, tomate entero deshidratado o fibra de tomate.

En general, la adición de los derivados del tomate provocó una reducción significativa en la luminosidad de ambos tipos de producto cárnico con respecto al lote control. Similares resultados fueron obtenidos por Calvo y col. (2008) y García y col. (2009) en los mismos productos cárnicos adicionados con PTS e indicaron que estos cambios podrían deberse a la presencia de la fibra presente en la piel de tomate. Nuestros resultados son también acordes a los descritos previamente por Fernández-López y col. (2002) quienes observaron que la incorporación de colorantes (en nuestro caso, licopeno) a los productos cárnicos, independientemente de su concentración, reduce la luminosidad del producto.

La aplicación de electrones acelerados a dosis de 2 y 4 kGy apenas influyó en el color de los productos cárnicos con PTS o TDD, ya que ninguno de los parámetros de color difirió significativamente de los lotes no irradiados. Es difícil predecir *a priori* el efecto que tendrá la irradiación en un determinado producto cárnico ya que, como han descrito

diferentes autores (Nam y Ahn, 2003; Brewer, 2004; Cambero y col., 2012), depende de numerosos factores tales como el tipo producto cárnico, la dosis de irradiación aplicada, las condiciones de almacenamiento del producto cárnico irradiado, el pH o la concentración y estado en el que se encuentra la mioglobina. Sin embargo, la mayoría de los trabajos publicados detectan cambios en la coloración de los productos cárnicos irradiados frente a la de los no irradiados (Millar y col., 2000; Brewer, 2004; Zhu y col., 2004; Feng y col., 2016). Dichos cambios varían también en función de la especie animal; en el caso de la ternera se produce un oscurecimiento posterior al tratamiento debido a la formación de metamioglobina; en el caso del pollo y el cerdo la carne toma un color rosado debido a la formación de carboximioglobina (Nam y Ahn, 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el poder colorante del licopeno es capaz de enmascarar los cambios de color que puedan aparecer como consecuencia del tratamiento de irradiación. Así, se pudo observar que los productos cárnicos frescos adquirirían una tonalidad rojiza que, tras el proceso culinario, pasaba a los colores pardos propios de una carne cocinada (Selgas y col., 2009); en los productos madurados, el licopeno les otorgaba un color rojizo que simulaba perfectamente el del pimentón lo que, junto con la mezcla de aditivos que se incorporan a este tipo de productos, puede enmascarar también los mencionados cambios asociados a la irradiación (Carrasco y col., 2005; Chouliara y col., 2006).

Además, el licopeno es antioxidante y podría estabilizar el color en los productos cárnicos irradiados, actividad que ha sido descrita por otros antioxidantes como el extracto de semilla de uva, el α -tocoferol y el aceite de sésamo añadidos a productos cárnicos irradiados (Mielnik y col. 2006; Liu y col. 2015; Yim y col., 2015). En este sentido, Sánchez-Escalante y col. (2003) incorporaron extracto de tomate a hamburguesas con el objetivo de estabilizar su color, obteniendo muy buenos resultados. La combinación de ambos efectos del licopeno, colorante y antioxidante, podría llegar a disminuir o atenuar los posibles cambios en el color provocados por la irradiación.

El tiempo de almacenamiento de los productos cárnicos apenas influyó en los parámetros de color. Es importante volver a recordar que se realizó en las condiciones descritas como más adecuadas (a vacío, en refrigeración y en oscuridad). Otros autores que tampoco han detectado influencia del tiempo de almacenamiento en productos cárnicos enriquecidos fueron Selgas y col. (2009) en hamburguesas con piel de tomate y Menegas y col. (2013) en salchichones con inulina.

5.1.5. Textura

La textura es una característica muy importante en los productos cárnicos ya que incide en la experiencia sensorial y puede llegar a marcar la aceptabilidad del producto.

Independientemente del derivado de tomate utilizado y del tipo de producto cárnico, los parámetros de textura que se vieron significativamente afectados fueron la dureza y la cohesión. La dureza incrementó de manera proporcional a medida que lo hizo la cantidad de derivado añadido; sin embargo, la cohesión disminuyó en los productos cárnicos con PTS y TDD. Resultados similares fueron obtenidos por García y col. (2009) y Calvo y col. (2014) en productos cárnicos con PTS. Estos cambios de dureza pueden estar asociados con el contenido de fibra insoluble en ambos derivados de tomate, mayor en la PTS. De hecho, Knoblich y col. (2005) describen cómo la piel de tomate es rica en celulosa y lignina, con un contenido aproximado de 30 g/100 g extracto seco, por lo que podría modificar la dureza de los productos cárnicos. Este mismo efecto ha sido descrito también por otros autores (García y col., 2002; Calvo y col., 2007; González-Navarro y col., 2011; Schmiele y col., 2015).

En las hamburguesas cocinadas los cambios de textura fueron mínimos. Quizá destacar un aumento de la dureza proporcional a la cantidad de TDD añadida, lo mismo que describieron García y col. (2009) en hamburguesas cocinadas elaboradas con PTS.

El efecto de la fibra también pudo ser la causa de los cambios en la cohesión ya que es capaz de interferir con las proteínas dificultándose la ligazón del producto. La cohesión sería más baja y podría llegar, en casos extremos, a constituir un problema en el manejo de los productos cárnicos. Este hecho ha sido descrito también por Calvo y col. (2008) en embutidos madurados elaborados con PTS. En nuestro trabajo se pudo observar que los productos madurados con TDD mostraban una cohesión menor que los elaborados con PTS. Sin embargo, aunque se evidenciaba una peor ligazón en los productos con la mayor cantidad de derivado del tomate, los cambios no llegaron a ser tan importantes como para comprometer de forma relevante la posible comercialización de estos productos.

En términos generales la irradiación no provocó cambios significativos en los parámetros de textura de los productos cárnicos con respecto de los no irradiados. Sin embargo, a dosis de 4 kGy se pudo apreciar una disminución de la dureza y un incremento de la cohesión en los productos cárnicos madurados con PTS. Este resultado está en la misma línea que los descritos por otros autores (Lee y Ahn, 2005; Cabeza y col., 2007; Hoz y col., 2008, Cabeza y col., 2009; Park y col., 2010; Shin y col., 2014) quienes indican que es

necesario aplicar una dosis de más de 3 kGy para llegar a observar alguna diferencia en la textura de la carne y los productos cárnicos irradiados.

Sin embargo, existe una gran disparidad de resultados en cuanto al efecto de la irradiación en la textura de los productos cárnicos ya que, de nuevo, hay muchos parámetros que pueden influir: el tamaño de la muestra a irradiar, las condiciones de la irradiación, la propia fuente de irradiación o el tipo y estructura del producto cárnico. Por una parte estarían los trabajos que no describen efecto alguno a bajas dosis de irradiación (anteriormente expuestos) y, por otra parte, los que detectan cambios en la textura siendo la dureza y la cohesión los parámetros más afectados (Yoon y col., 2003; Zhu y col., 2004; Galán y col., 2010; Galán y col., 2011b). Los cambios en la dureza podrían deberse a la rotura de fibras musculares (Yoon y col., 2003) o también al incremento de la solubilidad del colágeno producido por la irradiación (Kanatt y col., 2015); en ambos casos, se observaría un descenso de la dureza. El aumento de la cohesión podría estar relacionado con la formación de nuevos enlaces entre las proteínas como resultado de los cambios estructurales que se producen durante la irradiación (Galán y col., 2010).

Por último, el tiempo de almacenamiento no afectó a la textura de los productos cárnicos con derivados de tomate. Solo cabría mencionar un ligero endurecimiento del producto cárnico madurado a lo largo del tiempo de almacenamiento, probablemente debido a que la fibra insoluble que se encuentra en los derivados de tomate podría haber reaccionado con los componentes de la matriz cárnica formando nuevas redes que posiblemente modifiquen la estructura cárnica y por tanto su dureza. Andrés y col. (2006) también observaron este endurecimiento en productos madurados durante el almacenamiento, pero en su caso fue mucho más acusado debido posiblemente a que su conservación no fue a vacío.

5.1.6. Calidad sensorial

La aceptación en el mercado de un nuevo alimento va a depender fundamentalmente de su calidad sensorial independientemente de lo saludable que sea, por ello surge la necesidad de llevar a cabo pruebas sensoriales de los productos diseñados.

En términos generales, la calidad sensorial de ambos tipos de productos cárnicos fue descendiendo a medida que aumentaba la cantidad de PTS o TDD adicionadas.

En general, los catadores prefirieron las muestras control frente a las que contenían cualquiera de los derivados de tomate. Es indiscutible que el sabor de los productos

cárnicos con licopeno fue nuevo para los evaluadores, y por ello siempre obtuvieron una puntuación menor; sin embargo el sabor del tomate es muy apreciado en la cultura Mediterránea, sobre todo con hamburguesas, y el consumidor podría familiarizarse muy rápidamente al sabor de los nuevos productos cárnicos e incluso, demandarlo. De hecho, así lo hicieron constar en sus comentarios. No obstante, existen estudios en donde se valora con una puntuación más alta la calidad sensorial de productos cárnicos adicionados con derivados de tomate frente a los elaborados sin ellos, como es el caso de Eyiler y Oztan (2011) en salchichas con tomate en polvo y Doménech-Asensi y col. (2013) en mortadelas con pasta de tomate.

La aplicación de electrones acelerados afectó negativamente al olor y, sobre todo, al sabor de los productos cárnicos irradiados. Por lo general, la valoración fue significativamente peor en los lotes tratados con las mayores dosis (4kGy). Estos resultados están en la misma línea de los trabajos realizados por Ahn y Lee (2006), Cabeza y col. (2009), Brewer (2009) y Galán y col. (2010) en diferentes tipos de productos cárnicos.

Durante el proceso de irradiación se forman compuestos como el dimetilsulfuro, resultado de la reacción de degradación radiolítica de cadenas laterales de aminoácidos con grupos sulfuro (Zhu y col., 2004; Ahn y Lee, 2006; Brewer, 2009) y radicales hidroxilos capaces de oxidar los lípidos de la carne (Chen y col., 2012) que dotan al producto de un olor y sabor “típico a irradiado”. Una forma de minimizar este efecto, ha sido incorporar a la carne y los productos cárnicos compuestos que enmascaren estos olores y sabores típicos de los productos irradiados; así, se ha incorporado con éxito extracto de granada y uva a hamburguesas de ternera irradiadas (Schevey y col., 2013), compuestos fenólicos a carne de cerdo (Kim y col., 2013) o extracto de artemisa y ácido ascórbico a productos madurados de pollo (Hwang y col., 2015). En esta línea la incorporación de los derivados de tomate a los productos cárnicos podría enmascarar algunas características sensoriales negativas asociadas a la irradiación.

Se ha descrito que los posibles olores y sabores anómalos producidos durante la irradiación pueden ir desapareciendo a lo largo del almacenamiento, debido a que la cantidad de dimetilsulfuro y de los demás compuestos volátiles formados van evaporándose (Ahn y col., 2000; Cabeza y col., 2009; Medina y col., 2009; Cambero y col., 2012). Esta progresiva disminución podría deberse a que los radicales formados reaccionen entre ellos, con los componentes del propio alimento o con los propios derivados de tomate, causando la pérdida del “olor a irradiado”. También es importante destacar el carácter volátil de los compuestos formados durante la irradiación, lo que podría fomentar

su desaparición. Estas reacciones ocurren de manera lenta y progresiva, por lo que se hace más patente la pérdida de los olores cuando el tiempo de almacenamiento es más largo (Ahn y col., 2000; Cabeza y col., 2007). Por ello las diferencias significativas presentadas entre las muestras irradiadas y no irradiadas son mayores justo tras el tratamiento de irradiación que a lo largo del tiempo de almacenamiento. La desaparición de estos olores extraños asociados a la irradiación fue más evidente en el caso de los productos madurados en los que, la valoración sensorial fue baja en los primeros días y aumentó posteriormente llegando a ser similar a la del lote control después de tres meses de almacenamiento.

Sin embargo, no solo los cambios sensoriales sino también la calidad microbiológica son claves para determinar el tiempo de vida útil de los productos cárnicos. Por ello es necesario acompañar los análisis sensoriales de un control microbiológico a lo largo del tiempo de almacenamiento.

En este caso la determinación de la vida útil vino marcada por los resultados de los análisis sensoriales, pues los recuentos microbiológicos en los productos irradiados se mantuvieron muy por debajo (aproximadamente 10^2 ufc/g a 4 kGy) del límite que se considera indicador de alteración (10^8 ufc/g) (Javanmard y col. 2006; Cabeza y col. 2007, 2009; Fregonesi y col. 2014).

En los productos cárnicos frescos, la calidad sensorial se mantuvo aceptable hasta 5, 11 y 28 días en los lotes control y tratados con 2 kGy y 4 kGy, respectivamente. Los productos cárnicos madurados mantuvieron su vida útil hasta los 120 días, pero hay que tener en cuenta que ya, de por sí, tienen una vida útil superior.

5.2. Capacidad antioxidante del licopeno

Como se ha indicado en la Introducción de esta Tesis existen muchos factores que influyen en la isomerización y degradación del licopeno (apartado 1.3.4). Por ello surge la necesidad de estudiar cómo le afectan los tratamientos de irradiación ya que de nada serviría diseñar un nuevo producto cárnico funcional cuyas características sensoriales y tecnológicas fueran buenas si la capacidad funcional del licopeno se viese comprometida.

Para realizar esta parte, la autora de esta Tesis, se trasladó al Departamento de Patología General en la Facultad de Medicina de la Università Cattolica di Roma y, concretamente, al equipo dirigido por la Dra. Palozza, cuyos trabajos realizados sobre la capacidad antioxidante del licopeno son de reconocido prestigio.

En primer lugar se estudiaron los cambios que se producían en el licopeno presente en los dos derivados del tomate tras su irradiación a la mayor dosis aplicada (4 kGy). Al igual que sucedía en los productos cárnicos, el tratamiento con electrones acelerados provocó pérdidas de licopeno tanto en la PTS como en el TDD, pero en este caso fueron muy superiores a los valores obtenidos en los productos cárnicos, en torno a un 40-50%. Estos valores están por encima de las pérdidas descritas por otros autores como Girenavar y col. (2008) en pomelo. Estas diferencias muy posiblemente se deban a que en los derivados del tomate, el licopeno se encuentre más expuesto a la acción de la irradiación que en el producto cárnico, es decir, sin una matriz alimentaria que lo envuelva y proteja.

Así mismo, se observó que el tratamiento de irradiación produjo un aumento significativo de los isómeros *cis*, siendo más acusada esta isomerización en la PTS. En esta línea, destaca el estudio llevado a cabo por Strati y Oreopoulo (2011) quienes indican que la irradiación, al igual que otras técnicas de procesado, incluso el simple cocinado, estimula la isomerización de la forma *trans* a las *cis*. Estos resultados son muy interesantes ya que estudios llevados a cabo en modelos animales y humanos, apoyan la hipótesis que los isómeros *cis* son más biodisponibles (Boileau y col., 2002; Failla y col., 2008). Además, Böhm y col. (2002) observaron un mayor potencial antioxidante en estos isómeros, aunque también es importante tener en cuenta que son más inestables. En consecuencia, se podría esperar que el licopeno procedente de los productos RTE aquí diseñados pudiera tener una actividad biológica más relevante.

La capacidad antioxidante del licopeno se estudió en la línea celular RAT-1 de fibroblastos humanos. Esta línea se caracteriza por tener un crecimiento rápido y sencillo y se ha utilizado a tal fin de forma satisfactoria en diferentes estudios (Calviello y col., 2006; Lorenz y col., 2009; Palozza y col., 2010).

El primer paso fue obtener extractos de licopeno a partir de cada uno de los derivados del tomate utilizando para ello, tetrahidrofurano (THF) (apartado 3.4.8.1). Se prepararon 4 extractos diferentes (PTS y TDD sin irradiar e irradiados a 4 kGy); como control se utilizó solo THF. Los extractos se añadieron al cultivo celular y se cuantificó la cantidad de EROs producidas en las células tratadas. Tal y como se esperaba (Palozza y col., 2010), el licopeno contenido en los extractos de PTS y el TDD fue capaz de inhibir significativamente la producción de EROs en comparación con las células control lo que demuestra su capacidad antioxidante. Dicha actividad se puso más en evidencia cuando se forzó la oxidación realizando la incubación de las células con los extractos en presencia de peróxido de hidrógeno como agente pro-oxidante. Estos resultados están apoyados por los

obtenidos por Müller y col. (2016) en macrófagos (THP-1) tratados con aceite de semilla de tomate a varias concentraciones (desde 12,5 hasta 50 μg) y por Palozza y col. (2011) también con macrófagos en presencia de licopeno puro (2 μM) y óxidos de colesterol.

Seguidamente se procedió al estudio de la expresión de proteínas y del factor de transcripción nuclear NF- κB y su subunidad p65. Todos ellos son redox sensibles, su expresión se potencia en presencia de EROs y se inhiben, en consecuencia, en presencia de antioxidantes, como es el licopeno. Las proteínas redox sensibles estudiadas fueron las MAP-quinasas (ERK, JNK y p38), las proteínas Cox-2 (Ciclooxigenasa-2) y Nox-4 (NADPH oxidasa 4) y el factor transcripcional NF- κB y su subunidad p65 (ver apartado 1.3.2). Todas estas proteínas siguen una cascada de activación que comienza con la fosforilación de las MAP-quinasas en presencia de EROs. Una vez fosforiladas, estas proteínas activan al factor NF- κB , el cual se encuentra de manera inactiva en el citoplasma gracias a su unión a la proteína I κB . Una vez activado, se transloca al núcleo donde se une al ADN por medio de la subunidad p65, favoreciendo la expresión de genes productores de proteínas sintetizadoras de EROs como la Nox-4 y la Cox-2 (Fernández, 2015). En la **Figura 3** se presenta un esquema de esta cascada proteica (apartado 1.3.2.).

Los resultados obtenidos mostraron cómo los extractos de tomate fueron capaces de inhibir la expresión de las proteínas redox sensibles, pero lo más llamativo fue que la inhibición resultó ser mayor en el caso de los extractos irradiados y aún más significativa en los de PTS. Esta diferencia entre los dos extractos puede deberse a que la piel de tomate, como se ha dicho anteriormente, presenta mayor cantidad de licopeno.

El potencial antioxidante del licopeno, capaz de inhibir la expresión de proteínas redox sensibles, ha sido ampliamente estudiado por otros autores como Kim y col. (2004), Stefano y col. (2007), Hung y col. (2008), Chan y col. (2009), Sarkar y col. (2009), Joo y col. (2009), Feng y col. (2010), Palozza y col. (2010), Palozza y col. (2011), Simone y col. (2011) y Catalano y col. (2013). Sin embargo, lo que nunca se había estudiado hasta ahora es la capacidad antioxidante del licopeno sometido a irradiación, y a la vista de los resultados, este tratamiento parece mejorar dicha actividad. El posible motivo es que la irradiación provocó la isomerización del licopeno de la forma *todo-trans* a las formas *cis* las cuales presentan mayor capacidad antioxidante. En este sentido, Böhm y col. (2002) estudiaron la capacidad antioxidante de los isómeros *cis* de licopeno frente al *todo-trans*, concluyendo que la configuración geométrica *cis* le otorga mayor potencial antioxidante. Similares resultados fueron obtenidos por Phan-Thi y Waché (2014).

En líneas generales, se puede decir que los extractos de tomate, sobre todo aquellos sometidos a irradiación, fueron capaces de inhibir la expresión de proteínas y moléculas redox sensibles, en cantidades habituales en cualquier dieta (Bowen y col., 2015). Por último se podría concluir que la irradiación no solo mantiene la capacidad antioxidante de los extractos, sino que la potencia, por ello el uso de los electrones acelerados como método descontaminante de los productos cárnicos funcionales RTE enriquecidos en licopeno resulta altamente recomendable.

5.3. Accesibilidad del licopeno

El estudio de accesibilidad permite conocer el comportamiento de un compuesto bioactivo durante la secuencia de eventos que tiene lugar en el proceso de digestión y establecer en qué medida puede ser transportado a través de las células del epitelio intestinal y asimilado por el organismo.

Aunque lo más deseable sería realizar los estudios de intervención en humanos, son muchos los factores biológicos y tecnológicos a tener en cuenta durante su desarrollo que, junto con la inversión económica, dificultan su puesta en marcha (Waliszewski y Blasco, 2010). Los estudios *in vitro* se presentan como un gran aliado, ya que sus resultados son rápidos y objetivos y se consideran una buena aproximación a lo que puede suceder durante el proceso de la digestión gastrointestinal (Van de Wiele y col., 2007).

En el presente trabajo, se llevó a cabo un ensayo *in vitro* destinado a conocer la fracción de licopeno que quedaría disponible tras el proceso de digestión para ser transportado a través del epitelio intestinal. El método utilizado fue un modelo *in vitro* basado en los descritos por Oomen y col. (2003) y Granado-Lorencio y col. (2007). Dicho método se realiza mediante la incubación de la muestra homogeneizada con complejas soluciones salinas, enzimáticas y bilis, controlando en todo momento los parámetros como pH, temperatura y agitación para que fueran lo más próximas posible a las del proceso de digestión gastrointestinal. La separación de la fase que contenía el licopeno se hizo de acuerdo con Hedren y col. (2002); dicho método estima la cantidad máxima del carotenoide liberado, no necesariamente micelarizado, a partir de una matriz alimenticia, en nuestro caso el producto cárnico, y que en las condiciones fisiológicas y dietéticas óptimas podrían ser absorbidas por la mucosa intestinal.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre los productos cárnicos, siendo el licopeno más accesible en los madurados. Dicha accesibilidad osciló

entre 14,08-19,48% en los productos cárnicos frescos y entre 39,55-44,56% en los madurados, independientemente del derivado del tomate utilizado. La presencia conjunta de grasa y licopeno podría incrementar su absorción debido a que la grasa estimula la producción de bilis y favorece la solubilidad del licopeno (Boileau y col., 2002; During y Harrison, 2005). Así, Boileau y col. (2002) y Anese y col. (2013) describieron cómo la presencia de aceite de origen vegetal o grasa animal mejoraba la absorción del licopeno a nivel intestinal. Igualmente, Colle y col. (2012) describieron cómo añadiendo un 5% de grasa a un alimento, la cantidad de licopeno bioaccesible se incrementaba del 2 al 12%. Por ello, el mayor contenido en grasa de los productos cárnicos madurados podría incrementar la accesibilidad del licopeno. No obstante, es importante tener en cuenta que un elevado contenido graso podría limitar la absorción del licopeno, debido a que el proceso de formación de micelas se podría ver saturado (Degrou y col., 2013).

Sin embargo ni la irradiación, ni la fuente de licopeno (PTS o TDD) afectaron de manera significativa su accesibilidad. Es prácticamente inexistente la bibliografía que estudie el efecto de la irradiación en la accesibilidad del licopeno; sin embargo sí se ha demostrado que la aplicación de electrones acelerados favorece el paso de la forma *todo-trans* a las formas *cis* (Gámez y col., 2014). Las formas *todo-trans*, presentes en los alimentos, son moléculas lineales y rígidas, mientras que sus isómeros *cis*, son moléculas que ocupan menos espacio y que pueden ser más fácilmente solubilizadas, absorbidas y transportadas a nivel celular (Böhm y col., 2002; Failla y col., 2008; Cooperstone y col., 2015).

Por otra parte, la PTS y el TDD tienen un proceso de elaboración parecido, ambos son sometidos a deshidratación y molienda, operaciones que favorecen la ruptura de la célula vegetal en la que se encuentra el licopeno promoviendo su liberación e influyendo significativamente en su accesibilidad. En este sentido, se ha descrito que la accesibilidad del licopeno es mayor en los productos de tomate procesados que en los tomates frescos (Xianquan y col., 2005; Unlu y col., 2007; Svelander y col., 2010; Colle y col. 2012).

Por todo lo anteriormente descrito, se puede afirmar que los productos cárnicos aquí diseñados, tanto convencionales como RTE son viables desde el punto de vista tecnológico y sensorial y seguros al ser sometidos a un tratamiento que garantice su calidad higiénica. El tratamiento con electrones acelerados potencia la actividad antioxidante del licopeno en el derivado de tomate, garantizando una actividad biológica que haría a estos productos recomendables para su inclusión en la dieta. Aunque no existe una ingesta diaria recomendada de licopeno, el consumo de una hamburguesa de 100 g podría aportar hasta

11,7 mg de licopeno mientras que 100 g de salchichón, aportarían hasta 2,1 mg, dependiendo del derivado de tomate utilizado. Estas cantidades contribuirían a incrementar la ingesta diaria estimada en la dieta española (0,50-2,64 mg/día) (Brevik y col., 2004) hasta cantidades que podrían ayudar a la prevención de algunas enfermedades de carácter crónico. En consecuencia, los productos aquí diseñados se podrían considerar como *fuentes de licopeno*, Reglamento (UE) N° 1924/2006, encontrándonos por lo tanto, con nuevos alimentos adecuados para vehicular en la dieta este antioxidante.

6. CONCLUSIONES

1. La piel de tomate seca y el tomate desuerado y desecado son adecuados para su incorporación, como fuente de licopeno, a productos cárnicos tanto convencionales como “listos para el consumo” o RTE. La cantidad adecuada para su incorporación es un 4% en productos cárnicos frescos y entre 1,5 y 2 % en los madurados.

2. La aplicación de electrones acelerados a dosis de 2 kGy es eficaz para ampliar la vida útil de los productos cárnicos enriquecidos con licopeno. Con esta dosis se consigue alargar su vida útil hasta 11 días en el caso de los frescos y hasta 120 días en los madurados. Dosis superiores reducen significativamente la calidad sensorial del producto.

3. La aplicación de electrones acelerados puede provocar pérdidas de licopeno de hasta un 15%, dependiendo del derivado del tomate utilizado y del tipo de producto cárnico.

4. El licopeno presente en los derivados de tomate estudiados es capaz de inhibir de forma significativa la producción de EROs, lo que demuestra su capacidad antioxidante. Esta actividad es mayor en los extractos procedentes de la piel de tomate seca que en los procedentes del tomate desuerado y desecado.

5. La aplicación de electrones acelerados aumenta la capacidad antioxidante de los dos derivados de tomate estudiados y provoca la isomerización del licopeno con un aumento del contenido de formas *cis*.

6. La accesibilidad del licopeno es mayor en los productos cárnicos madurados que en los frescos, debido a su mayor contenido en grasa. Ni el tratamiento con electrones acelerados ni el tipo de derivado influyeron en la accesibilidad.

7. Los productos cárnicos desarrollados en este trabajo constituyen una nueva vía para aumentar el consumo de licopeno en la dieta incluso cuando se presentan en formato RTE. De acuerdo con el Reglamento (UE) N° 1924/2006, los productos desarrollados pueden considerarse como *fuentes de licopeno*.

6. CONCLUSIONS

1. Dry tomato peel and low serum tomato powder are suitable for the incorporation, as a source of lycopene, of conventional and Ready To Eat (RTE) meat products. The quantity with the best results is 4% in fresh meat products and between 1.5 and 2% in dry fermented sausages.

2. The irradiation treatment at doses of 2 kGy in hamburgers is an effective technology to increase their shelf life up to 11 days in the fresh products and up to 120 days in the case of dry fermented sausages. Higher doses significantly reduce the sensory quality of the product.

3. The irradiation treatment could induce losses of lycopene up to 15% depending on the tomato derivative added and the type of meat product.

4. The lycopene present in the tomato derivatives is able to significantly inhibit the production of ROS, demonstrating its antioxidant capacity. This activity is higher in the extracts from dry tomato peel than from low serum tomato powder.

5. The application of accelerated electrons increases the antioxidant capacity of the two tomato derivatives studied and causes the isomerization of lycopene with an increase in the content of *cis* forms.

6. The accessibility of lycopene is greater in dry fermented sausages than in fresh ones because of its higher fat content. Neither the irradiation treatment nor the type of derivative influenced its accessibility.

7. The meat products developed in this work constitute a new way to increase the consumption of lycopene in the diet even when presented in RTE products. According to Regulation (EU) N° 1924/2006 the developed products can be considered as *source of lycopene*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abourashed, E. A. (2013). Bioavailability of plant derived antioxidants. *Antioxidants*, 2, 309-325.
- ADA Reports. (2004). Position of the American dietetic association: functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 104, 814-826.
- AESA. (Agencia Española de Seguridad Alimentaria). (2004). Aplicación de radiaciones ionizantes a alimentos. Opinión del Comité Científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Presidencia de la AESA, en relación con la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos. *Revista del Comité Científico de la AESA*, 2, 11-43.
- AESA. (Agencia Española de Seguridad Alimentaria). (2005). Opinión del Comité Científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Presidencia de la AESA en relación con la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos. *Revista del Comité Científico de la AESA*, 2, 11-43.
- AESAN. (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). (2013). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre la aplicación de las radiaciones ionizantes para la higienización de la carne fresca, los preparados cárnicos y los productos cárnicos. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 18, 29-52.
- Agarwal, S., & Rao, A. V. (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal*, 163, 739-744.
- AGNS/FAO. (Food Quality and Standard Service/ Food and Drug Administration). (2007). Report on functional foods. Disponible en: http://www.hranomdozdravlja.com/slatkis/file.php?file=Functional_Foods_Report_Nov2007.pdf. Consultado el: 3 de Abril de 2017.
- Ahn, D. U., Jo, C., Du, M., Olson, D. G., & Nam, K. C. (2000). Quality characteristics of pork patties irradiated and stored in different packaging and storage conditions. *Meat Science*, 56, 203-209.
- Ahn, D. U., & Lee, E. J. (2006). Mechanisms and prevention of quality changes in meat by irradiation. *Food Irradiation Research and Technology*, 58, 127-142.
- Ahn, D. U., Kim, I. S., & Lee, E. J. (2013). Irradiation and additive combinations on the pathogen reduction and quality of poultry meat. *Poultry Science*, 92, 534-545.
- Al-Bachir, M., & Mehio, A. (2001). Irradiated luncheon meat: microbiological, chemical and sensory characteristics during storage. *Food Chemistry*, 75, 169-175.
- Alejandre, M., Poyato, C., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2016). Linseed oil gelled emulsion: A successful fat replacer in dry fermented sausages. *Meat Science*, 121, 107-113.

- Aliste, A., Vieira, F., & Mastro, N. del (2000). Radiation effects on agar, alginates and carrageenan to be used as food additives. *Radiation Physics and Chemistry*, 57, 305-308.
- Alshatwi, A. A., Al Obaaid, M. A., Al Sedairy, S. A., Al-Assaf, A. H., Zhang, J. J., & Lei, K. Y. (2010). Tomato powder is more protective than lycopene supplement against lipid peroxidation in rats. *Nutrition Research*, 30, 66-73.
- Alves, A. B., Bragagnolo, N., Silva, M. G., Skibsted, L. H., & Orlie, V. (2012). Antioxidant protection of high-pressure processed minced chicken meat by industrial tomato products. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 499-505.
- Andrés, S. C., García, M. E., Zaritzky, N. E., & Califano, A. N. (2006). Storage stability of low-fat chicken sausages. *Journal of food Engineering*, 72, 311-319.
- Andrés, A. I., Petró, M. J., Adámez, J. D., López, M., & Timón, M. L. (2016). Food by-products as potential antioxidant and antimicrobial additives in chill stored raw lamb patties. *Meat Science*, 129, 62-70.
- Anese, M., Mirolo, G., Beraldo, P., & Lippe, G. (2013). Effect of ultrasound treatments of tomato pulp on microstructure and lycopene *in vitro* bioaccessibility. *Food Chemistry*, 136, 458-463.
- Angiolillo, L., Conte, A. & Nobile, M. A. del (2015). Technological strategies to produce functional meat burgers. *LWT-Food Science and Technology*, 62, 697-703.
- Anguelova, T., & Warthesen, J. (2000). Lycopene stability in tomato powders. *Journal of Food Science*, 65, 67-70.
- Ansari, M. S., & Gupta, N. P. (2003). A comparison of lycopene and orchidectomy *vs* orchidectomy alone in the management of advanced prostate cancer. *BJU International*, 92, 375-378.
- Arai, S. (2000). Functional food science in Japan: State of the art. *Biofactors*, 12, 13-16.
- Aranda-Ruiz, J., Flores-Sandoval, D. A., Ruélas-Chacón, X., Olivares-Sáenz, E., Rodríguez-Fuentes, H., & Vidales-Contreras, J. A. (2012). Lycopene content in greenhouse-grown tomatoes and the effect of industrial processing on such content. *Food Science and Food Biotechnology Essentials: A Contemporary Perspective*, 49, 157-169.
- Ardawi, M. S. M., Badawoud, M. H., Hassan, S. M., Rouzi, A. A., Ardawi, J. M., AlNosani, N. M., & Mousa, S. A. (2016). Lycopene treatment against loss of bone mass, microarchitecture and strength in relation to regulatory mechanisms in a postmenopausal osteoporosis model. *Bone*, 83, 127-140.
- Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219-229.
- Ashwell, M. (2002). Conceptos sobre los alimentos funcionales. ILSI Europe Concise Monograph Series. Disponible en:

<http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/alimentosfuncionalesiLSI.pdf>.

Consultado el: 21 de Marzo de 2017.

- Aymerich, T., Picouet, P., & Monfort, J. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78, 114–129.
- Ayo, J., Carballo, J., Serrano, J., Olmedilla-Alonso, B., Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2007). Effect of total replacement of pork backfat with walnut on the nutritional profile of frankfurters. *Meat Science*, 77, 173-181.
- Badui, S. (2006). Vitaminas y nutrientes inorgánicos. En: *Química de los Alimentos*. Editorial Pearson Addison Wesley. México D. F. México. Pg 395-400. ISBN: 970-26-0670-5.
- Bahieldin, A., Gadalla, N. O., Al-Garni, S. M., Almehdar, H., Noor, S., Hassan, S. M., Shokry, A. M., Sabir, J. S. M., & Murata, N. (2014). Efficient production of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of synthetic genes from a plasmid harboring the ADH2 promoter. *Plasmid*, 72, 18-28.
- Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45, 722-734.
- Barba, C., Santa-María, G., Flores, G., Herraiz, M., & Calvo, M. M. (2010). Enantiomeric analysis of chiral compounds in irradiated foods using multidimensional gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 752-756.
- Barbosa-Cánovas, G. V. (2008). Global view of challenges of nonthermal technologies. Innovative application of nonthermal technologies in foods: Technology, safety, health and consumer acceptability. NDP-IFT/EFfOST Joint Workshop. Innovative Applications of Nonthermal Technologies in Foods: Technology, Safety, Health and Consumer Acceptability. Madrid. España. Pg 57-68.
- Barroeta, A., & Cortinas, L. (2004). Estrategias genéticas y nutricionales en la modificación de la composición de la carne. En: *La Carne y los Productos Cárnicos como Alimentos Funcionales*. Editorial editec@red. Madrid. España. Pg 59-74. ISBN 84-933122-6-6.
- Bartkiene, E., Juodeikiene, G., Zadeike, D., Viskelis, P., & Urbonaviciene, D. (2015). The use of tomato powder fermented with *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus sakei* for the Ready-to-Cook minced meat quality improvement. *Food Technology and Biotechnology*, 53, 163-168.
- Basu, S., Michaëlsson, K., Olofsson, H., Johansson, S., & Melhus, H. (2001). Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288, 275-279.
- Benakmoum, A., Abbeddou, S., Ammouche, A., Kefalas, P., & Gerasopoulos, D. (2008). Valorization of low quality edible oil with tomato peel waste. *Food Chemistry*, 110, 684-690.

- Berganza, J., Guijarro, J., & Garay, I. (2005). Posibilidades de aprovechamiento de subproductos vegetales como fuente de obtención de productos nutraceuticos. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 205, 63-66.
- Bermejo, L. M., López-Plaza, B., Weber, T. K., Palma-Milla, S., Iglesias, C., Reglero, G., & Gómez-Candela, C. (2014). Impact of cooked functional meat enriched with omega-3 fatty acids and rosemary extract on inflammatory and oxidative status; a randomised, double-blind, crossover study. *Nutritional Hospital*, 30, 1084-1091.
- Besbes, S., Attia, H., Deroanne, C., Makni, S., & Blecker, C. (2008). Partial replacement of meat by pea fiber and wheat fiber. Effect on the chemical composition, cooking characteristics and sensory properties of beef burgers. *Journal of Food Quality*, 31, 480-489.
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Robinson, R. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry: A critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 637-645.
- Böhm, V., Puspitasari-Nienaber, N. L., Ferruzzi, M. G., & Schwartz, S. J. (2002). Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 221-226.
- Boileau, T. W. M., Boileau, A. C., & Erdman, J. W. (2002). Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 914-919.
- Bonaccio, M., Iacoviello, L., Gaetano, G. de, & Moli-Sani Investigators. (2012). The Mediterranean diet: The reasons for a success. *Thrombosis research*, 129, 401-404.
- Borel, P. (2003). Factors affecting intestinal absorption of highly lipophilic food microconstituents (fat-soluble vitamins, carotenoids and phytosterols). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 41, 979-994.
- Bou, R., Guardiola, F., Tres, A., Barroeta, A. C., & Codony, R. (2004). Effect of dietary fish oil, α -tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poultry Science*, 83, 282-292.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62-66.
- Bowen, P. E., Stacewicz-Sapuntzakis, M., & Diwadkar-Navsariwala, V. (2015). Carotenoids in human nutrition. En: *Pigmentos, Frutas y Vegetales*. Editorial Springer. Nueva York. Estados Unidos. Pg 31-67.
- Bravo, S. (2012). Optimización del contenido y disponibilidad del licopeno y otros compuestos bioactivos en tomate y productos elaborados con tomate. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. España.
- Bravo, D., Alba, M. de, & Medina, M. (2014). Combined treatments of high-pressure with the lactoperoxidase system or lactoferrin on the inactivation of *Listeria monocytogenes*,

- Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in beef carpaccio. *Food Microbiology*, *41*, 27-32.
- Brevik, A., Andersen, L. F., Karlsen, A., Trygg, K. U., Blomhoff, R., & Drevon, C. A. (2004). Six carotenoids in plasma used to assess recommended intake of fruits and vegetables in a controlled feeding study. *European Journal of Clinical Nutrition*, *58*, 1166-1173.
- Brewer, M. S. (2004). Irradiation effects on meat color: A review. *Meat Science*, *68*, 1-17.
- Brewer, M. S. (2009). Irradiation effects on meat flavour: A review. *Meat Science*, *81*, 1-14.
- Britton, G. (1995). UV/Visible spectroscopy. En: *Carotenoids*. Editorial Birkhäuser Verlag. Berlín. Alemania. Pg 56-57. ISBN 978-3-0348-7836-4.
- Brown, M. J., Ferruzzi, M. G., Nguyen, M. L., Cooper, D. A., Eldridge, A. L., Schwartz, S. J., & White, W. S. (2004). Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *80*, 396-403.
- Bucio, S. L. (2015). Valoración de subproductos de la industria pesquera: obtención de derivados lipídicos ricos en ácidos grasos poliinsaturados y de concentrados de harina de pescado con bajo contenido en grasa. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Burgos. España.
- Buzrul, S. (2014). Multi-pulsed high hydrostatic pressure inactivation of microorganisms: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *26*, 1-11.
- Cabeza, M. C., Cambero, M. I., Hoz, L. de la, & Ordóñez, J. A. (2007). Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *8*, 299-305.
- Cabeza, M. C., Hoz, L. de la, Velasco, R., Cambero, I., & Ordóñez, J. A. (2009). Safety and quality of ready-to-eat dry fermented sausages subjected to E-beam radiation. *Meat Science*, *83*, 320-327.
- Cáceres, E., García, M. L., & Selgas, M. D. (2008). Effect of pre-emulsified fish oil as source of PUFA n-3 on microstructure and sensory properties of mortadella, a Spanish bologna type sausage. *Meat Science*, *80*, 183-193.
- Cabeza, M. C., Cambero, M. I., Nuñez, M., Medina, M., Hoz, L. de la, & Ordóñez, J. A. (2010). Lack of growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in temperature abuse of E-beam treated ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Food Microbiology*, *27*, 777-782.
- Calderón T. (2000). La irradiación de alimentos. Principios, realidades y perspectivas de futuro. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid. España. ISBN 84-481-2575-4.

- Calviello, G., Piccioni, E., Boninsegna, A., Tedesco, B., Maggiano, N., Serini, S., & Palozza, P. (2006). DNA damage and apoptosis induction by the pesticide mancozeb in rat cells. Involvement of the oxidative mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *211*, 87-96.
- Calvo, M. M., Rodríguez, M. J., Santa-María, J. G., Selgas, M. D., & García M. L. (2007). Productos cárnicos y de la pesca enriquecidos en licopeno mediante la adición de piel de tomate. Patente (P200701670).
- Calvo, M. M., García, M. L., & Selgas, M. D. (2008). Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel. *Meat Science*, *8*, 167-172.
- Calvo, M. M., Gámez, M. C., García, M. L. & Selgas, M. D. (2014). Tomato powder low in serum as a source of lycopene to meat products. *Fleischwirtschaft International*, *6*, 63-67.
- Cambero, M. I., Cabeza, M. C., Escudero, R., Manzano, S., García-Márquez, I., Velasco, R., & Ordóñez, J. A. (2012). Sanitation of selected ready-to-eat intermediate moisture foods of animal origin by E-beam irradiation. *Foodborne Pathogens and Disease*, *9*, 594-599.
- Cammarata, G. E. (2010). Conservación de alimentos por irradiación. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Belgrano. Italia.
- Candogan, K. (2002). The effect of tomato paste on some quality characteristics of beef patties during refrigerated storage. *European Food Research and Technology*, *215*, 305-309.
- Carpenter, R., O'grady, M. N., O'Callaghan, Y. C., O'Brien, N. M., & Kerry, J. P. (2007). Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. *Meat Science*, *76*, 604-610.
- Carranco, J. M., Calvo, C. M. L., & Romo, F. P. (2011). Carotenoids and their antioxidant function: A review. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, *61*, 233-241.
- Carrasco, A., Tárrega, R., Ramírez, M. R., Mingoarranz, F. J., & Cava, R. (2005). Colour and lipid oxidation changes in dry-cured loins from free-range reared and intensively reared pigs as affected by ionizing radiation dose level. *Meat Science*, *69*, 609-615.
- Casar, M. C. (2007). Nuevas tecnologías para alimentos inocuos. En: *Énfasis Alimentaria*. Editorial FLC. Madrid. España. Pg 54-56. ISBN 74-8426-054-8.
- Catalano, A., Simone, R., Cittadini, A., Reynaud, E., Caris-Veyrat, C., & Palozza, P. (2013). Comparative antioxidant effects of lycopene, apo-10'-lycopenoic acid and apo-14'-lycopenoic acid in human macrophages exposed to H₂O₂ and cigarette smoke extract. *Food and Chemical Toxicology*, *51*, 71-79.
- Chan, C. M., Fang, J. Y., Lin, H. H., Yang, C. Y., & Hung, C. F. (2009). Lycopene inhibits PDGF-BB-induced retinal pigment epithelial cell migration by suppression of PI3K/Akt and MAPK pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *388*, 172-176.

- Chan, W. (2004). Macronutrients in meat. En: *Enciclopedia de la Ciencia de la Carne*. Editorial Elsevier. Oxford. Reino Unido. Pg 614-618. ISBN 0-81586-360-4.
- Chawla, R., Patil, G. R., & Singh, A. K. (2011). High hydrostatic pressure technology in dairy processing: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 260-268.
- Chen, J. H., Ren, Y., Seow, J., Liu, T., Bang, W. S., & Yuk, H. G. (2012). Intervention technologies for ensuring microbiological safety of meat. Current and future trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 119-132.
- Chew, B. P., & Park, J. S. (2004). Carotenoid action on the immune response. *The Journal of Nutrition*, 134, 257S-261S.
- Chouliara, I., Samelis, J., Kakouri, A., Badeka, A., Savvaidis, I. N., Riganakos, K., & Kontominas, M. G. (2006). Effect of irradiation of frozen meat/fat trimmings on microbiological and physicochemical quality attributes of dry fermented sausages. *Meat Science*, 74, 303-311.
- CIE. (1971). *Colorimetry: Official recommendations of the International Commission on Illumination*. Publication CIE N°15 (E-1.3.1). Bureau Central de la CIE, Paris, Francia.
- Cleland, M. R. (2006). Advances in gamma ray, electron beam, and X-ray technologies for food irradiation. *Food Irradiation Research and Technology*, 11-35.
- Colle, I. J., Van Buggenhout, S., Lemmens, L., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2012). The type and quantity of lipids present during digestion influence the *in vitro* bioaccessibility of lycopene from raw tomato pulp. *Food Research International*, 45, 250-255.
- Comisión Europea. (2000). Comunicación de la Comisión relativa a alimentos e ingredientes alimentarios autorizados para el tratamiento con radiación ionizante en la Comunidad Europea. Disponible en: http://www.nutricion.org/publicaciones/pdf/ue_alimentosirradiados.pdf. Consultado el 1 de Abril de 2017.
- Contini, C., Álvarez, R., O'Sullivan, M., Dowling, D. P., Gargan, S. O., & Monahan, F. J. (2014). Effect of an active packaging with citrus extract on lipid oxidation and sensory quality of cooked turkey meat. *Meat Science*, 96, 1171-1176.
- Cooperstone, J. L., Ralston, R. A., Riedl, K. M., Haufe, T. C., Schweiggert, R. M., King, S. A., Timmers, C. D., Francis, D. M., Lesinski, G. B., Clinton, S. K., & Schwartz, S. J. (2015). Enhanced bioavailability of lycopene when consumed as *cis*-isomers from tangerine compared to red tomato juice, a randomized, cross-over clinical trial. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59, 658-669.
- Coral, S., Gómez, C., López, C., López, B. (2016). Seguridad alimentaria y crisis alimentarias. En: *Manual de Alimentación y Planificación Alimentaria*. Editado por la

- Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid. España. Pg 300-320. ISBN 978-84-362-7100-3.
- Coronado, S. A., Trout, G. R., Dunshea, F. R., & Shah, N. P. (2002). Effect of dietary vitamin E, fishmeal and wood and liquid smoke on the oxidative stability of bacon during 16 weeks frozen storage. *Meat Science*, 62, 51-60.
- Covarrubias, D. H., Pomares, C. F., & Aranda, G. E. (2010). El licopeno y su papel en la prevención del cáncer de próstata. *Revista de Neurobiología*, 4, 1-16.
- Cruz-Bojórquez, R. M., González Gallego, J., & Sánchez Collado, P. (2013). Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 6-15.
- Deda, M. S., Bloukas, J. G., & Fista, G. A. (2007). Effect of tomato paste and nitrite level on processing and quality characteristics of frankfurters. *Meat Science*, 76, 501-508.
- Degrou, A., Georgé, S., Renard, C. M., & Page, D. (2013). Physicochemical parameters that influence carotenoids bioaccessibility from a tomato juice. *Food Chemistry*, 136, 435-441.
- Dehghan-Shoar, Z., Hardacre, A. K., & Brennan, C. S. (2010). The physico-chemical characteristics of extruded snacks enriched with tomato lycopene. *Food Chemistry*, 123, 1117-1122.
- Desai, A. G., Qazi, G. N., Ganju, R. K., El-Tamer, M., Singh, J., Saxena, A. K., & Bhat, H. K. (2008). Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Current Drug Metabolism*, 9, 581-591.
- Devaraj, S., Mathur, S., Basu, A., Aung, H. H., Vasu, V. T., Meyers, S., & Jialal, I. (2008). A dose-response study on the effects of purified lycopene supplementation on biomarkers of oxidative stress. *Journal of the American College of Nutrition*, 27, 267-273.
- Dickson, J. S. (2004). Inactivación de microorganismos por radiación. En: *Irradiación de los Alimentos: Principios y Aplicaciones*. Editorial Acribia. Zaragoza. España. Pg 78-89. ISBN 9788420010205.
- Diehl, J. F. (1995). *Safety of Irradiated Foods*. Editorial Marcel Dekker. Nueva York. Estados Unidos. ISBN 0-8247-9344-7.
- Diplock, A. T. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81, S1-S27.
- Directiva 1986/355/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de diciembre de 1986 relativa a la prohibición de salida al mercado y de utilización de productos fitosanitarios que contengan determinadas sustancias activas.
- Directiva 1999/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de febrero de 1999, relativa a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros sobre alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes.

- Directiva 1999/3/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de febrero de 1999 relativa al establecimiento de una lista comunitaria de alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes.
- Doménech-Asensi, G., García-Alonso, F. J., Martínez, E., Santaella, M., Martín-Pozuelo, G., Bravo, S., & Periago, M. J. (2013). Effect of the addition of tomato paste on the nutritional and sensory properties of mortadella. *Meat Science*, *93*, 213-219.
- Du, M., Ahn, D. U., Nam, K. C., & Sell, J. L. (2000). Influence of dietary conjugated linoleic acid on volatile profiles, color and lipid oxidation of irradiated raw chicken meat. *Meat Science*, *56*, 387-395.
- Dubé, D. P., & Robles, G. A. (2000). Cambios de coloración de los productos cárnicos. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, *14*, 114-23.
- During, A., & Harrison, E. H. (2005). An *in vitro* model to study the intestinal absorption of carotenoids. *Food Research International*, *38*, 1001-1008.
- Dutra, M. P., Cássia A. G., Ramos, A. D. L. S., Silva, M. H. L., Pereira, M. T., Piccoli, R. H., & Ramos, E. M. (2016). Use of gamma radiation on control of *Clostridium botulinum* in mortadella formulated with different nitrite levels. *Radiation Physics and Chemistry*, *119*, 125-129.
- EFSA. (European Food and Safety Authority). (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses. *Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in European Food Safety Authority Journal*, *9*, 136-158.
- Egydio, J. A., Moraes, Â. M., & Rosa, P. T. (2010). Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato juice and characterization of its antioxidation activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, *54*, 159-164.
- Eim, V. S., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2008). Effects of addition of carrot dietary fibre on the ripening process of a dry fermented sausage (sobrassada). *Meat Science*, *80*, 173-182.
- Erdman, J. W. (2005). How do nutritional and hormonal status modify the bioavailability, uptake, and distribution of different isomers of lycopene?. *The Journal of Nutrition*, *135*, 150-157.
- Espinosa, J. (2007). *Evaluación Sensorial*. Editorial Universitaria. La Habana. Cuba. ISBN 978-959-16-0539-9.
- Eyiler, E., & Oztan, A. (2011). Production of frankfurters with tomato powder as a natural additive. *LWT-Food Science and Technology*, *44*, 307-311.
- Failla, M. L., Chitchumroonchokchai, C., & Ishida, B. K. (2008). *In vitro* micellarization and intestinal cell uptake of *cis* isomers of lycopene exceed those of all-*trans* lycopene. *The Journal of Nutrition*, *138*, 482-486.

- Fan, X., & Sokorai, K. J. B. (2008). Effect of ionizing radiation on furan formation in fresh cut fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 73, C79-C83.
- Fan, X., Sommers, C. H., & Sokorai, K. J. (2004). Ionizing radiation and antioxidants affect volatile sulfur compounds, lipid oxidation, and color of ready-to-eat turkey bologna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3509-3515.
- FAO/WHO. (Food and Drug Administration/World Health Organization). (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *FAO Food and Nutrition Paper*, 22, 1-22.
- Farkas, J. (2006). Irradiation for better foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 148-152.
- Farris, S., Schaich, K. M., Liu, L., Piergiovanni, L., & Yam, K. L. (2009). Development of polyion complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 316-332.
- FDA (Food and Drug Administration). (2007). Irradiation in the production, processing and handling of food. *Federal Register*, 72, 16291-16306.
- FDA (Food and Drug Administration). (2009). Purpose and Definitions. *Food Code*. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/guidanceregulation/retailfoodprotection/foodcode/ucm186464.htm>. Consultado el: 2 de Abril de 2017.
- FDA. (Food and Drug Administration). (2012). Irradiation in the production, processing and handling of good. *Code of Federal Regulations*, 21, 71312-71315.
- FDA/CFSAN. (Food and Drug Administration/Center for Food Safety and Applied Nutrition). (2009). Guidance for industry. Evidence-based review system for the scientific evaluation of health claims. Draft Guidance. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/LabelingNutrition/ucm073332.htm>. Consultado el: 1 de Abril de 2017.
- Feng, D., Ling, W. H., & Duan, R. D. (2010). Lycopene suppresses LPS-induced NO and IL-6 production by inhibiting the activation of ERK, p38, MAPK, and NF- κ B in macrophages. *Inflammation Research*, 59, 115-121.
- Feng, X., Moon, S. H., Lee, H. Y., & Ahn, D. U. (2016). Effect of irradiation on the degradation of nucleotides in turkey meat. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 88-94.
- Fernández, D. (2015) Derivados de tomate y aceite de oliva virgen extra. Calidad, compuestos bioactivos y alegaciones de salud. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérída, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods.

- From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46, 438-450.
- Fernández-Ginés, J. M., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., & Pérez-Alvarez, J. A. (2005). Meat products as functional foods: A review. *Journal of Food Science*, 70, R37-R43.
- Fernández-López, J., Pérez-Alvarez, J. A., Sayas-Barberá, E., & López-Santoveña, F. (2002). Effect of paprika (*Capsicum annum*) on color of Spanish type sausages during the resting stage. *Journal of Food Science*, 67, 2410-2414.
- Food and Nutrition Board. (1994). Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK224669/pdf/Bookshelf_NBK224669.pdf. Consultado el 28 de Marzo de 2017.
- Fontecha, J. (2008). Los prebióticos en los alimentos. Origen y efectos sobre el organismo humano. En: *Nuevos Alimentos para Nuevas Necesidades*. Editado por la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. Madrid. España. Pg 71-80. ISBN 84-688-3619-2.
- Fregonesi, R. P., Portes, R. G., Aguiar, A. M. M., Figueira, L. C., Gonçalves, C. B., Arthur, V., Lima, G. C., Fernandes, A. M. & Trindade, M. A. (2014). Irradiated vacuum-packed lamb meat stored under refrigeration: Microbiology, physicochemical stability and sensory acceptance. *Meat Science*, 97, 151-155.
- Galán, I., García, M. L., & Selgas, M. D. (2010). Effects of irradiation on hamburgers enriched with folic acid. *Meat Science*, 84, 437-443.
- Galán I., García, M. L., Selgas, M. D. (2011a). Effects of ionising irradiation on quality and sensory attributes of ready-to-eat dry fermented sausages enriched with folic acid. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 469-477.
- Galán, I., García, M. L., & Selgas, M. D. (2011b). Irradiation is useful for manufacturing ready-to-eat cooked meat products enriched with folic acid. *Meat Science*, 87, 330-335.
- Gámez, M. C., Calvo, M. M., Selgas, M. D., García, M. L., Erler, K., Böhm, V., Catalano A., Simone, R., & Palozza, P. (2014). Effect of E-Beam treatment on the chemistry and on the antioxidant activity of lycopene from dry tomato peel and tomato powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1557-1563.
- García, M. L., Cáceres, E., & Selgas, M. D. (2007). Utilisation of fruit fibres in conventional and reduced fat cooked meat sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 624-631.
- García, M. L., Calvo, M. M., & Selgas, M. D. (2009). Beef hamburgers enriched in lycopene using dry tomato peel as an ingredient. *Meat Science*, 83, 45-49.
- García, M. L., Dominguez, R., Galvez, M. D., Casas, C., & Selgas, M. D. (2002). Utilization of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented sausages. *Meat Science*, 60, 227-236.

- García-Íñiguez de Ciriano, M., Larequi, E., Rehecho, S., Calvo, M. I., Cavero, R., Navarro-Blasco, I., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2010). Selenium, iodine, ω -3 PUFA and natural antioxidant from *Melissa officinalis*. A combination of components from healthier dry fermented sausages formulation. *Meat Science*, *85*, 274-279.
- García-Márquez, I. (2015). Uso de electrones acelerados para aumentar la vida útil de lomo de cerdo. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Complutense Madrid. España.
- García-Márquez, I., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., & Cabeza, M. C. (2012). Shelf-life extension and sanitation of fresh pork loin by E-beam treatment. *Journal of Food Protection*, *75*, 2179-2189.
- García-Márquez, I., Narváez-Rivas, M., Gallardo, E., Cabeza, M. C., & León-Camacho, M. (2013). Changes in the phospholipid fraction of intramuscular fat from pork loin (fresh and marinated) with different irradiation and packaging during storage. *Grasas y Aceites*, *64*, 7-14.
- Garrett, D. A., Failla, M. L., & Sarama, R. J. (1999). Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 4301-4309.
- Garriga, M., & Aymerich, T. (2009). Advanced decontamination technologies: High hydrostatic pressure on meat products. En: *Seguridad de la Carne Procesada*. Editorial Springer. Nueva York. Estados Unidos. Pg. 183-208. ISBN 978-0-387-89026-5.
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Liu, Y., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (2002). A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, *94*, 391-398.
- Girenavar, B., Jayaprakasha, G. K., Mcllin, S. E., Maxim, J., Yoo, K. S., & Patil, B. S. (2008). Influence of electron-beam irradiation on bioactive compounds in grapefruits (*Citrus paradisi*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 10941-10946.
- Giri, D., Ozen, M., & Ittmann, M. (2001). Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer. *The American Journal of Pathology*, *159*, 2159-2165.
- Giroux, M., Ouattara, B., Yefsah, R., Smoragiewicz, W., Saucier, L., & Lacroix, M. (2001). Combined effect of ascorbic acid and gamma irradiation on microbial and sensorial characteristics of beef patties during refrigerated storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 919-925.
- Gloria, N. F., Soares, N., Brand, C., Oliveira, F. L., Borojevic, R., & Teodoro, A. J. (2014). Lycopene and β -carotene induce cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines. *Anticancer Research*, *34*, 1377-1386.
- Goñi, I., Serrano, J., & Saura-Calixto, F. (2006). Bioaccessibility of β -carotene, lutein, and lycopene from fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 5382-5387.

- González, L., James, T., Bispo, E., Dugan, M. E., & Franco, D. (2014). Effect of supplementing different oils. Linseed, sunflower and soybean, on animal performance, carcass characteristics, meat quality and fatty acid profile of veal from “Rubia Gallega”. *Meat Science*, *96*, 829-836.
- González-Navarro, I., García-Valverde, V., García-Alonso, J., & Periago, M. J. (2011). Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Research International*, *44*, 1528–1535.
- Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2012). A new technique for spray-dried encapsulation of lycopene. *Drying Technology*, *30*, 641-652.
- Granado-Lorenzo, F., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B., & Blázquez-García, S. (2007). *In vitro* bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chemistry*, *102*, 641-648.
- Grigelmo-Miguel, N., Soliva-Fortuny, R., Barbosa-Canovas, G. V., & Martín-Belloso, O. (2011). Use of oscillating magnetic fields in food preservation. *Nonthermal Processing Technologies for Food*, *45*, 222-243.
- Grolichová, M., Dvořák, P., & Musilova, H. (2004). Employing ionizing radiation to enhance food safety: A review. *Acta Veterinaria Brunensis*, *73*, 143-149.
- Gupta, R., Balasubramaniam, V. M., Schwartz, S. J., & Francis, D. M. (2010). Storage stability of lycopene in tomato juice subjected to combined pressure-heat treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 8305-8313.
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *12*, 600-609.
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, *46*, 412-429.
- Ham, Y. K., Kim, H. W., Hwang, K. E., Song, D. H., Kim, Y. J., Choi, Y. S., Song, B. S., Park, J. H. & Kim, C. J. (2017). Effects of irradiation source and dose level on quality characteristics of processed meat products. *Radiation Physics and Chemistry*, *130*, 259-264.
- Hardy, G. (2000). Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning. *Nutrition*, *16*, 688-697.
- Harms, C., Fuhrmann, H., Nowak, B., Wenzel, S., & Sallmann, H. P. (2003). Effect of dietary vitamin E supplementation on the shelf life of cured pork sausage. *Meat Science*, *63*, 101-105.
- Hasler, C. M. (1998). Functional foods. Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technology*, *52*, 63-70.

- Hayes, J. E., Canonico, I., & Allen, P. (2013). Effects of organic tomato pulp powder and nitrite level on the physicochemical, textural and sensory properties of pork luncheon roll. *Meat Science*, *95*, 755-762.
- Heber, D., & Lu, Q. Y. (2002). Overview of mechanisms of action of lycopene. *Experimental Biology and Medicine*, *227*, 920-923.
- Hedren, E., Diaz, V., & Svanberg, U. (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition*, *56*, 425-430.
- Hernández-Almanza, A., Montañez, J., Martínez, G., Aguilar-Jiménez, A., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2016). Lycopene: Progress in microbial production. *Trends in Food Science and Technology*, *56*, 142-148.
- Herrero, A. M., & Romero de Ávila, M. D. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, *50*, 71-74.
- Hierro, E. M., Barroso, E., Hoz, L. de la, Ordóñez, J. A., Manzano, S., & Fernández, M. (2011). Efficacy of pulsed light for shelf-life extension and inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat cooked meat products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *12*, 275-281.
- Honest, K. N., Zhang, H. W., & Zhang, L. (2011). Lycopene: Isomerization effects on bioavailability and bioactivity properties. *Food Reviews International*, *27*, 248-258.
- Hoz, L. de la, López-Bote, C. J., Cambero, M. I., D'Arrigo, M., Pin, C., Santos, C., & Ordóñez, J. A. (2003). Effect of dietary linseed oil and α -tocopherol on pork tenderloin (*Psoas major*) muscle. *Meat Science*, *65*, 1039-1044.
- Hoz, L. de la, Cambero, M. I., Cabeza, M. C., Herrero, A. M., & Ordóñez, J. A. (2008). Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by e-beam radiation. *Journal of Food Protection*, *71*, 2001-2006.
- Huang, L., Pu, Y., Yang, X., Zhu, X., Cai, J., & Xu, Z. (2015). Engineering of global regulator AMP receptor protein (CRP) in *Escherichia coli* for improved lycopene production. *Journal of Biotechnology*, *199*, 55-61.
- Huang, W., Li, Z., Niu, H., Li, D., & Zhang, J. (2008). Optimization of operating parameters for supercritical carbon dioxide extraction of lycopene by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, *89*, 298-302.
- Hung, C. F., Huang, T. F., Chen, B. H., Shieh, J. M., Wu, P. H., & Wu, W. B. (2008). Lycopene inhibits TNF- α -induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion. *European Journal of Pharmacology*, *586*, 275-282.

- Huq, T., Vu, K. D., Riedl, B., Bouchard, J., & Lacroix, M. (2015). Synergistic effect of (γ)-irradiation and microencapsulated antimicrobials against *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) meat. *Food Microbiology*, *46*, 507-514.
- Hwang, K. E., Kim, H. W., Song, D. H., Kim, Y. J., Ham, Y. K., Lee, J. W., Choi, Y. S. & Kim, C. J. (2015). Effects of antioxidant combinations on shelf stability of irradiated chicken sausage during storage. *Radiation Physics and Chemistry*, *106*, 315-319.
- Isik, F., & Topkaya, C. (2016). Effects of tomato pomace supplementation on chemical and nutritional properties of carckers. *Italian Journal of Food Science*, *28*, 525-535.
- ISO. (International Standard Organization). (2005). Sensory analysis. Methodology. General Guidance (ISO-DP 6658). Ginebra. Suiza.
- Jackson, M. J., Pye, D., & Palomero, J. (2007). The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, *102*, 1664-1670.
- James, W. P., Duthie, G. G., & Wahle, K. W. (1988). The Mediterranean diet: Protective or simply non-toxic?. *European Journal of Clinical Nutrition*, *43*, 31-41.
- Jáuregui, M. E. C., Calvo M. C., & Pérez-Gil, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *61*, 233-237.
- Javanmard, M., Rokni, N., Bokaie, S., & Shahhosseini, G. (2006). Effects of gamma irradiation and frozen storage on microbial, chemical and sensory quality of chicken meat in Iran. *Food Control*, *17*, 469-473.
- Jayamanne, V. S., & Adams, M. R. (2006). Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Letters in Applied Microbiology*, *42*, 189-194.
- Jayasena, D. D., & Jo, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *34*, 96-108.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., & Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products. Their role as functional foods. *Meat Science*, *59*, 5-13.
- Jiménez-Colmenero, F., Herrero, A., Cofrades, S., & Ruiz-Capillas, C. (2012). Meat and functional foods. *Handbook of Meat and Meat Processing*, *7*, 225-248.
- Jiménez-Colmenero, F. (2013). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, *52*, 64-74.
- Joo, Y. E., Karrasch, T., Mühlbauer, M., Allard, B., Narula, A., Herfarth, H. H., & Jobin, C. (2009). Tomato lycopene extract prevents lipopolysaccharide-induced NF- κ B signaling but worsens dextran sulfate sodium-induced colitis in NF- κ B EGFP mice. *PLoS One*, *4*, 4562-4583.

- Jouki, M., & Yazdi, F. T. (2014). The effect of gamma irradiation and vacuum packaging upon selected quality traits of refrigerated ostrich meat. Colour, texture and lipid oxidation properties. *Animal Science Papers and Reports*, *32*, 161-171.
- Kalogeropoulos, N., Chiou, A., Pyriochou, V., Peristeraki, A., & Karathanos, V. T. (2012). Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing byproducts. *LWT-Food Science and Technology*, *49*, 213-216.
- Kanatt, S. R., Chawla, S. P., & Sharma, A. (2015). Effect of radiation processing on meat tenderisation. *Radiation Physics and Chemistry*, *111*, 1-8.
- Kang, S. N., Jin, S. K., Yang, M. R., & Kim, I. S. (2010). Changes in quality characteristics of fresh pork patties added with tomato powder during storage. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *30*, 216-222.
- Keenan, D. F., Resconi, V. C., Kerry, J. P., & Hamill, R. M. (2014). Modelling the influence of inulin as a fat substitute in comminuted meat products on their physico-chemical characteristics and eating quality using a mixture design approach. *Meat Science*, *96*, 1384-1394.
- Kessy H. N., Zhang L., & Zhang H. (2013). Lycopene Z-isomers enrichment and separation. *International Journal of Food Science and Technology*, *48*, 2050–2056.
- Khan, M. I., Arshad, M. S., Anjum, F. M., Sameen, A., & Gill, W. T. (2011). Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. *Food Research International*, *44*, 3125-3133.
- Kim, G. Y., Kim, J. H., Ahn, S. C., Lee, H. J., Moon, D. O., Lee, C. M., & Park, Y. M. (2004). Lycopene suppresses the lipopolysaccharide induced phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells through inhibition of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B. *Immunology*, *113*, 203-211.
- Kim, I. S., Jin, S. K., Nam, S. H., Nam, Y. W., Yang, M. R., Min, H. S., & Kim, D. H. (2008). Effect of hot-air dried tomato powder on the quality properties of pork patties during cold storage. *Journal of Animal Science and Technology*, *50*, 255-264.
- Kim, I. S., Jin, S. K., Kang, S. N., Hur, I. C., & Choi, S. Y. (2009). Effect of olive oil prepared tomato powder (OPTP) and refining lycopene on the physicochemical and sensory characteristics of seasoned raw pork during storage. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *29*, 334-339
- Kim, I. S., Jin, S. K., Mandal, P. K., & Kang, S. N. (2011). Quality of low-fat pork sausages with tomato powder as colour and functional additive during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology*, *48*, 591-597.
- Kim, J. H., Ahn, H. J., Lee, J. W., Park, H. J., Ryu, G. H., Kang, I. J., & Byun, M. W. (2005). Effects of gamma irradiation on the biogenic amines in pepperoni with different packaging conditions. *Food Chemistry*, *89*, 199-205.

- Kim, K. H., Kim, Y. S., Hong, M. S., & Yook, H. S. (2016). Quality characteristics of bagel added with tomato powder. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 45, 360-365.
- Kim, L., Rao, A. V., & Rao, L. G. (2002). Effect of lycopene on prostate LnCap cancer cells in culture. *Journal of Medicinal Food*, 5, 181-187.
- Kim, S. J., Cho, A. R., & Han, J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Control*, 29, 112-120.
- Knoblich, M., Anderson, B., & Latshaw, D. (2005). Analyses of tomato peel and seed byproducts and their use as a source of carotenoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1166-1170.
- Ko, E. Y., & Moon, A. (2015). Natural products for chemoprevention of breast cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 20, 223-231.
- Koch, H. W., & Eisenhower, E. H. (1965). Electron accelerators for food processing. *Radiation Preservation of Foods*, 149-180.
- Kong, K. W., Khoo, H. E., Prasad, K. N., Ismail, A., Tan, C. P., & Rajab, N. F. (2010). Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules*, 15, 959-987.
- Krishnakumar V. & Gordon I. R. (2001). Probiotics: Challenges and opportunities. *Dairy Industries International*, 66, 38-40.
- Kruk, Z. A., Kim, H. J., Kim, Y. J., Rutley, D. L., Jung, S., Lee, S. K., & Jo, C. (2014). Combined effects of high pressure processing and addition of soy sauce and olive oil on safety and quality characteristics of chicken breast meat. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27, 256.
- Kuhad, A., Sethi, R., & Chopra, K. (2008). Lycopene attenuates diabetes associated cognitive decline in rats. *Life Sciences*, 83, 128-134.
- Kwak N. S. & Jukes D. J. (2001). Functional foods. The development of a regulatory concept. *Food Control*, 12, 99-107.
- Lacroix, M., & Lafortune, R. (2004). Combined effects of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on bacterial resistance in grated carrots (*Daucus carota*). *Radiation Physics and Chemistry*, 71, 79-82.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2002). Alternative food-preservation technologies. Efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4, 433-440.
- Lai, L., Kang, J. X., Li, R., Wang, J., Witt, W. T., Yong, H. Y., & Samuel, M. (2006). Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nature Biotechnology*, 24, 435-436.

- Lario, Y., Sendra, E., García, J., Fuentes, C., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., & Perez-Alvarez, J. A. (2004). Preparation of high dietary fiber powder from lemon juice by-products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 113-117.
- Lean, J. M., Jagger, C. J., Kirstein, B., Fuller, K., & Chambers, T. J. (2005). Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology*, 146, 728-735.
- Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2005). Quality characteristics of irradiated turkey breast rolls formulated with plum extract. *Meat Science*, 71, 300-305.
- Lee, M. T., & Chen, B. H. (2002). Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chemistry*, 78, 425-432.
- Lewis, S. J., Velasquez, A., & Cuppett, S. L. (2002). Effect of electron beam irradiation on poultry meat safety and quality. *Poultry Science*, 81, 896-903.
- Ley 22/2011 de residuos y suelos contaminados por el que se regula la gestión de residuos y suelos contaminados (BOE 29 de Julio 2011).
- Li, Z. Z., Lu, X. Z., Ma, C. C., & Chen, L. (2009). Serum lycopene levels in patients with diabetic retinopathy. *European Journal of Ophthalmology*, 20, 719-723.
- Lim, G. B., Lee, S. Y., Lee, E. K., Haam, S. J., & Kim, W. S. (2002). Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. *Biochemical Engineering Journal*, 11, 181-187.
- Liu, F., Xu, Q., Dai, R., & Ni, Y. (2015). Effects of natural antioxidants on colour stability, lipid oxidation and metmyoglobin reducing activity in raw beef patties. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia alimentaria*, 14, 37-44.
- Loaharanu, P. (2003). *Irradiated Foods*. Editorial American Council on Science and Health. Nueva York. Estados Unidos.
- López-Casado, G. M. (2006). Biomecánica de la epidermis y la cutícula del fruto del tomate (*Solanum lycopersicum*) y su relación con el agrietado. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. España.
- López-López, I., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Low-fat frankfurters enriched with n-3 PUFA and edible seaweed: Effects of olive oil and chilled storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics. *Meat Science*, 83, 148-154.
- López-López, I., Cofrades, S., Cañeque, V., Díaz, M. T., López, O., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). Effect of cooking on the chemical composition of low-salt, low-fat wakame/olive oil added beef patties with special reference to fatty acid content. *Meat Science*, 89, 27-34.

- Lorenz, M., Stangl, V., Jacob, C., Daemen, K., Boehm, V., Fröhlich, K., & Palozza, P. (2009). Delivery of lycopene to physiologically relevant vascular cells. *Journal of Food Lipids*, *16*, 259-272.
- Lugasi, A., Biró, L., Hóvárie, J., Sági, K. V., Brandt, S., & Barna, É. (2003). Lycopene content of foods and lycopene intake in two groups of the Hungarian population. *Nutrition Research*, *23*, 1035-1044.
- Lupton, J. R. (2009). Scientific substantiation of claims in the USA: Focus on functional foods. *European Journal of Nutrition*, *48*, 27.
- LYCOCARD: Role of lycopene for the prevention of cardiovascular disease. (2017). Disponible en: http://www.lycocard.com/index.php/lyco_pub/tomatoes/. Consultado el: 17 de Marzo de 2017.
- Machmudah, S., Zacaria, B., Winardi, S., Sasaki, M., Goto, M., Kusumoto, N. & Hayakawa, K. (2012). Lycopene extraction from tomato peel by-product containing tomato seed using supercritical carbon dioxide. *Journal Food Engineering*, *108*, 290-296.
- Maiani, G., Castón, M. J. P., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I. G., Bysted, A., & Schlemmer, U. (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, *53*, 194-218.
- Mapiye, C., Aalhus, J. L., Turner, T. D., Rolland, D. C., Basarab, J. A., Baron, V. S., McAllister, D. A., Block, H. C., Uttaro, B., López-Campos, O., Proctor, S. D., & Dugan, M. E. R. (2013). Effects of feeding flaxseed or sunflower-seed in high-forage diets on beef production, quality and fatty acid composition. *Meat Science*, *95*, 98-109.
- Marchetti, L., Andrés, S. C., & Califano, A. N. (2014). Low-fat meat sausages with fish oil: Optimization of milk proteins and carrageenan contents using response surface methodology. *Meat Science*, *96*, 1297-1303.
- Marchioni, E. (2006). Detection of irradiated foods. *Food Irradiation Research and Technology*, *6*, 85-103.
- Martínez, L., Cilla, I., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2006). Antioxidant effect of rosemary, borage, green tea, puerh tea and ascorbic acid on fresh pork sausages packaged in a modified atmosphere. Influence of the presence of sodium chloride. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*, 1298-1307.
- Martínez-Hernández, G. B., Boluda-Aguilar, M., Taboada-Rodríguez, A., Soto-Jover, S., Marín-Iniesta, F., & López-Gómez, A. (2016). Processing, packaging, and storage of tomato products: Influence on the lycopene content. *Food Engineering Reviews*, *8*, 52-75.
- Martínez-Tomás, R., Pérez-Llamas, F., Sánchez-Campillo, M., González-Silvera, D., Cascales, A. I., García-Fernández, M., & Wellner, A. (2012). Daily intake of fruit and

vegetable soups processed in different ways increases human serum β -carotene and lycopene concentrations and reduces levels of several oxidative stress markers in healthy subjects. *Food Chemistry*, 134, 127-133.

Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G., & Chesson, A. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 323-330.

Matthäus, F., Ketelhot, M., Gatter, M., & Barth, G. (2014). Production of lycopene in the non-carotenoid-producing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 1660-1669.

Mayer-Miebachr, E., Behsnilian, D., Regier, M., & Schuchmann, H. P. (2005). Thermal processing of carrots: Lycopene stability and isomerisation with regard to antioxidant potential. *Food Research International*, 38, 1103-1108.

McHugh, T., & Toepfl, S. (2016). Pulsed electric field processing for fruits and vegetables. *Food Technologies*, 70, 73-5.

McMillan, D. C., Talwar, D., Sattar, N., Underwood, M., O'Reilly, D. S. J., & Mcardle, C. (2002). The relationship between reduced vitamin antioxidant concentrations and the systemic inflammatory response in patients with common solid tumours. *Clinical Nutrition*, 21, 161-164.

Medina, M., Cabeza, M. C., Bravo, D., Cambero, M. I., Montiel, R., Ordóñez, J. A., & Hoz, L. de la (2009). A comparison between E-beam irradiation and high pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: Microbiological aspects. *Food Microbiology*, 26, 224-227.

Mehta, B. J., Obraztsova, I. N., & Cerdá-Olmedo, E. (2003). Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of β -carotene and lycopene. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4043-4048.

Meléndez-Martínez, A. J., Vicario Romero, I., & Mira, H. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54, 209-215.

Menegas, L. Z., Pimentel, T. C., García, S. & Prudencio, S. H. (2013). Dry fermented chicken sausage produced with inulin and corn oil: Physicochemical, microbiological, and textural characteristics and acceptability during storage. *Meat Science*, 93, 501-506.

Mercadante, A. Z., Capitani, C. D., Decker, E. A., & Castro, I. A. (2010). Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. *Meat Science*, 84, 718-726.

Mercasa. (2016). Alimentación en España. Disponible en:

<http://www.mercasa->

- ediciones.es/alimentacion_2016/pdfs/Alimentacion_en_Espana_web_2016_150px.pdf. Consultado el: 20 de Marzo de 2017.
- Mielnik, M. B., Olsen, E., Vogt, G., Adeline, D., & Skrede, G. (2006). Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *LWT-Food Science and Technology*, *39*, 191-198.
- Mikelsen C. (1967). La ciencia de la nutrición. En: *Manuales Uteba*. N° 347. México D. F. México.
- Millar, S. J., Moss, B. W., & Stevenson, M. H. (2000). The effect of ionising radiation on the colour of leg and breast of poultry meat. *Meat Science*, *55*, 361-370.
- Monk, J., Beuchat, L., & Doyle, M. (1995). Irradiation inactivation of food-borne microorganisms. *Journal of Food Protection*, *58*, 197-208.
- Monselise, J. J., & Berck, Z. (1954). Some observation on the oxidative destruction of lycopene during the manufacture of tomato puree. *Bulletin Research Council Israel*, *4*, 188-191.
- Mora-Gallego, H., Guardia, M. D., Serra, X., Gou, P., & Arnau, J. (2016). Sensory characterisation and consumer acceptability of potassium chloride and sunflower oil addition in small-caliber non-acid fermented sausages with a reduced content of sodium chloride and fat. *Meat Science*, *112*, 9-15.
- Morehouse, K. M., & Komolprasert, V. (2004). Irradiation of food and packaging: An overview. *American Chemical Society*, *1*, 1-11.
- Moreno, R. (2000). *Nutrición y Dietética para Tecnólogos de los Alimentos*. Editorial Díaz de Santos. Madrid. España.
- Mortensen, A. (2006). Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry*, *78*, 1477-1491.
- Muguerza, E., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2003). Improvement of nutritional properties of chorizo de Pamplona by replacement of pork backfat with soy oil. *Meat Science*, *65*, 1361-1367.
- Müller, L., Caris-Veyrat, C., Lowe, G., & Böhm, V. (2016). Lycopene and its antioxidant role in the prevention of cardiovascular diseases a critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*, 1868-1879.
- Nam, K. C., & Ahn, D. U. (2002). Mechanisms of pink color formation in irradiated precooked turkey breast meat. *Journal of Food Science*, *67*, 600-607.
- Nam, K. C., & Ahn, D. U. (2003). Effects of ascorbic acid and antioxidants on the color of irradiated ground beef. *Journal of Food Science*, *68*, 1686-1690.

- Namir, M., Siliha, H., & Ramadan, M. F. (2015). Fiber pectin from tomato pomace: Characteristics, functional properties and application in low-fat beef burger. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 9, 305-312.
- Narvaiz, P. (2015). Irradiated food for special diets. *Stewart Postharvest Review*, 11, 1-7.
- Neffe-Skocińska, K., Jaworska, D., Kolożyn-Krajewska, D., Dolatowski, Z., & Jachacz-Jówko, L. (2015). The effect of LAB as probiotic starter culture and green tea extract addition on dry fermented pork loins quality. *BioMedical Research International*, 12, 37-51.
- Nour, V., Ionica, M. E., & Trandafir, I. (2015). Bread enriched in lycopene and other bioactive compounds by addition of dry tomato waste. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 8260-8267.
- Novelli, E., Fasolato, L., Cardazzo, B., Carraro, L., Taticchi, A., & Balzan, S. (2014). Addition of phenols compounds to meat dough intended for salami manufacture and its antioxidant effect. *Italian Journal of Food Safety*, 3, 1704-1721.
- Odrizola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Effect of minimal processing on bioactive compounds and color attributes of fresh-cut tomatoes. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 217-226.
- Ohlsson, T. (2000). Minimal processing of foods with thermal methods. *Innovations in Food Processing*, 12, 123-140.
- Oliver, J., Palou, A., & Pons, A. (1998). Semi-quantification of carotenoids by high-performance liquid chromatography: Saponification-induced losses in fatty foods. *Journal of Chromatography*, 829, 393-399.
- Olmedilla, B., Granado, F., Southon, S., Wright, A. J., Blanco, I., Gil-Martinez, E., & Thurnham, D. I. (2001). Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. *British Journal of Nutrition*, 85, 227-238.
- Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., & Vaquero, M. (2003). Lutein, but not α -tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: Two-double-blind, placebo-controlled pilot study. *Nutrition*, 19, 21-24.
- Olmedilla, B., & Granado, F. (2004). Evaluación del efecto funcional. Biomarcadores. *En: la Carne y los Productos Cárnicos como Alimentos Funcionales*. Editorial Editec@Red. Madrid. España. Pg 91-109. ISBN 84-933122-6-6.
- Omer, E., Thapa, M., Hong, L., & Lianfu, Z. (2014). The influence of lycopene and other natural antioxidants on refined sunflower oil stability. *International Journal of Engineering Research and Technology*, 3, 86-91.
- Oomen, A. G., Rempelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., & Sips, A. J. A. M. (2003). Development of an *in vitro* digestion model for

- estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 281-287.
- Ordóñez, J. A., Cambero, M. I., Fernández, L., García, M. L., García de Fernando, G., & Hoz, L. de la. (1998). Características generales de la carne y componentes fundamentales. En: *Tecnología de los Alimentos*. Editorial Síntesis. Madrid. España. Pg 170-184. ISBN 84-7738-575-0.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & Hoz, L. de la. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 329-367.
- Østerlie, M., & Lerfall, J. (2005). Lycopene from tomato products added minced meat: Effect on storage quality and colour. *Food Research International*, 38, 925-929.
- Pagalda, L., & Ruiz-Altisent, M. (1983). Estructura histológica de la piel de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en relación con su resistencia mecánica. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Serie Agrícola*, 22, 71-83.
- Palacios N., C. (2014). Papel de los carotenoides en la industria alimentaria. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana. México.
- Palozza, P., Parrone, N., Catalano, A., & Simone, R. (2010). Tomato lycopene and inflammatory cascade: Basic interactions and clinical implications. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 2547-2563.
- Palozza, P., Simone, R., Catalano, A., Monego, G., Barini, A., Mele, M. C., Parrone, N., Trombino, S., Picci, N., & Ranelletti, F. O. (2011). Lycopene prevention of oxysterol-induced proinflammatory cytokine cascade in human macrophages: Inhibition of NF- κ B nuclear binding and increase in PPAR γ expression. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22, 259-268.
- Palozza, P., Catalano, A., Simone, R., & Cittadini, A. (2012). Lycopene as a guardian of redox signalling. *Acta Biochimica Polonica*, 59, 21.
- Parada, J. & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72, R21-R32.
- Parés, D., Sagner, E., Saurina, J., Suñol, J. J., & Carretero, C. (1998). Functional properties of heat induced gels from liquid and spray dried porcine blood plasma as influenced by pH. *Journal of Food Science*, 63, 958-961.
- Park, J. G., Yoon, Y., Park, J. N., Han, I. J., Song, B. S., Kim, J. H., & Lee, J. W. (2010). Effects of gamma irradiation and electron beam irradiation on quality, sensory, and bacterial populations in beef sausage patties. *Meat Science*, 85, 368-372.
- Park, P. K., Kima, E. Y., & Chub, K. H. (2007). Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology*, 53, 148-152.

- Parker, R. S. (1996). Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *The FASEB Journal*, *10*, 542-551.
- Pascacio, V. G. T., Quintero, A. R., & Sánchez, B. T. (2016). Evaluación y caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de biodiesel. Un caso de estudio. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, *32*, 303-313.
- Patterson, R. L. S., & Stevenson, M. H. (1995). Irradiation induced off-odour in chicken and its possible control. *British Poultry Science*, *36*, 425-441.
- Paz X. M., de la, Dauber, C., Mussio, P., Delgado, E., Maquieira, A., Soria, A., & López, T. (2014). Use of mild irradiation doses to control pathogenic bacteria on meat trimmings for production of patties aiming at provoking minimal changes in quality attributes. *Meat Science*, *98*, 383-391.
- Pedrero, F., Pangborn, D. L., & Marie, R. (1989). *Evaluación Sensorial de los Alimentos; Métodos Analíticos*. Editorial Alhambra Mexicana. México D. F. México. ISBN 978-959-16-0539-9.
- Peleg, M., Corradini, M. G., & Normand, M. D. (2012). On quantifying nonthermal effects on the lethality of pressure assisted heat preservation processes. *Journal of Food Science*, *77*, 47-56.
- Periago, M. J., Martínez-Valverde, I., Ros, G., Martínez, C., & López, G. (2001). Chemical and biological properties and nutritional value of lycopene. *Anales Veterinaria*, *17*, 51-66.
- Phan-Thi, H., & Waché, Y. (2014). Isomerization and increase in the antioxidant properties of lycopene from *Momordica cochinchinensis* by moderate heat treatment with UV-Vis spectra as a marker. *Food Chemistry*, *156*, 58-63.
- Pollak, M. (2001). Insulin like growth factors and prostate cancer. *Epidemiologic Reviews*, *23*, 59-66.
- Rababah, T., Hettiarachchy, N. S., Eswaranandam, S., Meullenet, J. F., & Davis, B. (2005). Sensory evaluation of irradiated and nonirradiated poultry breast meat infused with plant extracts. *Journal of Food Science*, *70*, S228-S235.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., & Rengasamy, R. (2007). Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *74*, 517-523.
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, *26*, 3100-3112.
- Rao, A. V., & Shen, H. (2002). Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. *Nutrition Research*, *22*, 1125-1131.
- Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, *55*, 207-216.

- Rao, L. G., & Rao, A. V. (2013). Oxidative stress and antioxidants in the risk of osteoporosis, role of the antioxidants lycopene and polyphenols. En: *Topics in Osteoporosis*. Editorial InTech. Toronto. Canadá. Pg 117-161. ISBN 978-953-51-1066-8.
- Real Decreto 348/2001, del 5 de Abril, (BOE, 5 de Abril de 2001) por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes.
- Reboul, E., Borel, P., Mikail, C., Abou, L., Charbonnier, M., Caris-Veyrat, C., & Amiot, M. J. (2005). Enrichment of tomato paste with 6% tomato peel increases lycopene and β -carotene bioavailability in men. *The Journal of Nutrition*, 135, 790-794.
- Reglamento (UE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de Diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.
- Reglamento (UE) N° 1129/2011 de la Comisión, de 11 de Noviembre de 2011, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (UE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión.
- Reglamento (UE) N° 432/2012 de la Comisión del 16 de Mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños.
- Reglamento (UE) N° 536/2013 de la Comisión de 11 de Junio de 2013 que modifica el Reglamento (UE) N° 432/2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños.
- Reglamento (UE) N° 851/2013 de la Comisión de 3 de Septiembre de 2013 por el que se autorizan determinadas declaraciones de propiedades saludables en los alimentos, distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños, y se modifica el Reglamento (UE) N° 432/2012.
- Reglamento (UE) N° 1018/2013 de la Comisión de 23 de octubre de 2013 que modifica el Reglamento (UE) N° 432/2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños.
- Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., & Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1251-1260.
- Renehan, A. G., Zwahlen, M., Minder, C., O'Dwyer, S., Shalet, S. M., & Egger, M. (2004). Insulin like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: Systematic review and meta-regression analysis. *The Lancet*, 363, 1346-1353.

- Revilla, I., Martín, P., Miralles, A., Otal, J., Palacios, C., Alvarez, S., & Cubero, M. J. (2015). Modification of the chicken meat quality from organic production due to the addition of ground garlic (ZooAllium®). XVI En: *Jornadas sobre Producción Animal*. Zaragoza. España. Pg 702-704.
- Reyes-Gavilán, C. G. de los, Fernández, M., Hudson, J. A., & Korpela, R. (2015). Role of microorganisms present in dairy fermented products in health and disease. *BioMed Research International*, 7, 15-21.
- Ried, K., & Fakler, P. (2011). Protective effect of lycopene on serum cholesterol and blood pressure: Meta-analyses of intervention trials. *Maturitas*, 68, 299-310.
- Rizk, E. M., El-Kady, A. T., & El-Bialy, A. R. (2014). Characterization of carotenoids (lyco-red) extracted from tomato peels and its uses as natural colorants and antioxidants of ice cream. *Annals of Agricultural Sciences*, 59, 53-61.
- Roberfroid, M. B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: The European perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1660s-1664s.
- Roberts, P. B. (2014). Food irradiation is safe: Half a century of studies. *Radiation Physics and Chemistry*, 105, 78-82.
- Rocha, G. A., Fávaro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2012). Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 37-42.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 438-447.
- Romero, M. G., Mendonca, A. F., Ahn, D. U., & Wesley, I. V. (2005). Influence of dietary vitamin E on behavior of *Listeria monocytogenes* and color stability in ground turkey meat following electron beam irradiation. *Journal of Food Protection*, 68, 1159-1164.
- Rossi, L., Watson, D., Escandarani, S., Miranda, A., & Troncoso, A. (2009). La radiación a la mesa. *Revista Chilena de Infectología*, 26, 318-330.
- Ruusunen, M., & Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, 70, 531-541.
- Sahin, N., Akdemir, F., Orhan, C., Kucuk, O., Hayirli, A., & Sahin, K. (2008). Lycopene-enriched quail egg as functional food for humans. *Food Research International*, 41, 295-300.
- Salazar, P., García, M. L., & Selgas, M. D. (2009). Short-chain fructooligosaccharides as potential functional ingredient in dry fermented sausages with different fat levels. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1100-1107.

- Salazar-Marroquín, E. L., Galán-Wong, L. J., Moreno-Medina, V. R., Reyes-López, M. A., & Pereyra-Alfárez, B. (2016). Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*. Generalities and potential applications. *Reviews in Medical Microbiology*, 27, 95-107.
- Salcedo-Sandoval, L., Cofrades, S., Pérez, C. R. C., Solas, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (2013). Healthier oils stabilized in konjac matrix as fat replacers in n-3 PUFA enriched frankfurters. *Meat Science*, 93, 757-766.
- Salvá-Vila, L. (2008). Productos cárnicos para el siglo XXI: Seguros, nutritivos y saludables (Carnisenusa). *Eurocarne*, 167, 114-126.
- Samelis, J., Kakouri, A., Savvaidis, I. N., Riganakos, K., & Kontominas, M. G. (2005). Use of ionizing radiation doses of 2 and 4kGy to control *Listeria* spp. and *Escherichia coli* O157: H7 on frozen meat trimmings used for dry fermented sausage production. *Meat Science*, 70, 189-195.
- Sánchez-Escalante, A., Torrescano, G., Djenane, D., Beltran, J. A., & Roncales, P. (2003). Stabilisation of colour and odour of beef patties by using lycopene-rich tomato and peppers as a source of antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 187-194.
- Sánchez-Zapata, E., Muñoz, C. M., Fuentes, E., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas, E., & Pérez-Alvarez, J. A. (2010). Effect of tiger nut fibre on quality characteristics of pork burger. *Meat Science*, 85, 70-76.
- Santos, N. W., Yoshimura, E. H., Machado, E., Matumoto-Pintro, P. T., Montanher, P. F., Visentainer, J. V. & Zeoula, L. M. (2016). Antioxidant effects of a propolis extract and vitamin E in blood and milk of dairy cows fed diet containing flaxseed oil. *Livestock Science*, 191, 132-138.
- Sarkar, F. H., Li, Y., Wang, Z., & Kong, D. (2009). Cellular signaling perturbation by natural products. *Cellular Signalling*, 21, 1541-1547.
- Satin, M. (2002). Use of irradiation for microbial decontamination of meat: Situation and perspectives. *Meat Science*, 62, 277-283.
- Savadkoochi, S., Hoogenkamp, H., Shamsi, K., & Farahnaky, A. (2014). Color, sensory and textural attributes of beef frankfurter, beef ham and meat-free sausage containing tomato pomace. *Meat Science*, 97, 410-418.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Brenes, A., & Goñi, I. (2009). Effect of grape antioxidant dietary fiber on the lipid oxidation of raw and cooked chicken hamburgers. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 971-976.
- Schevey, C. T., Toshkov, S., & Brewer, M. S. (2013). Effect of natural antioxidants, irradiation, and cooking on lipid oxidation in refrigerated, salted ground beef patties. *Journal of Food Science*, 78, S1793-S1799.

- Schmiele, M., Mascarenhas, M. C. C. N., da Silva Barretto, A. C., & Pollonio, M. A. R. (2015). Dietary fiber as fat substitute in emulsified and cooked meat model system. *LWT-Food Science and Technology*, *61*, 105-111.
- Schwartz, B. (1921). Effects of x-rays on *Trichinae*. *Journal of Agricultural Research*, *20*, 845-854.
- Schwarz, S., Obermüller-Jevic, U. C., Hellmis, E., Koch, W., Jacobi, G., & Biesalski, H. K. (2008). Lycopene inhibits disease progression in patients with benign prostate hyperplasia. *The Journal of Nutrition*, *138*, 49-53.
- Selgas, M. D., García, M. L., & Calvo, M. M. (2009). Effects of irradiation and storage on the physico-chemical and sensory properties of hamburgers enriched with lycopene. *International Journal of Food Science and Technology*, *44*, 1983-1989.
- Sesso, H. D., Buring, J. E., Norkus, E. P., & Gaziano, J. M. (2004). Plasma lycopene, other carotenoids, and retinol and the risk of cardiovascular disease in women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *79*, 47-53.
- Sharma, P., Bremer, P., Oey, I., & Everett, D. W. (2014). Bacterial inactivation in whole milk using pulsed electric field processing. *International Dairy Journal*, *35*, 49-56.
- Sharma, S. K., & Le Maguer, M. (1996). Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. *Food Research International*, *29*, 309-315.
- Shen, H. M., & Tergaonkar, V. (2009). NF- κ B signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis*, *14*, 348-363.
- Shi, J., & Le Maguer, M. (2000). Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, *40*, 1-42.
- Shi, J., Le Maguer, M., Bryan, M., & Kakuda, Y. (2003). Kinetics of lycopene degradation in tomato puree by heat and light irradiation. *Journal of Food Process Engineering*, *25*, 485-498.
- Shi, J., Dai, Y., Kakuda, Y., Mittal, G., & Xue, S. J. (2008). Effect of heating and exposure to light on the stability of lycopene in tomato puree. *Food control*, *19*, 514-520.
- Shi, J., Yi, C., Xue, S. J., Jiang, Y., Ma, Y., & Li, D. (2009). Effects of modifiers on the profile of lycopene extracted from tomato skins by supercritical CO₂. *Journal of Food Engineering*, *93*, 431-436.
- Shi, J., Xue, S. J., Wang, B., Wang, W., Ye, X., & Quek, S. Y. (2015). Optimization of formulation and influence of environmental stresses on stability of lycopene-microemulsion. *LWT-Food Science and Technology*, *60*, 999-1008.
- Shin, M. H., Lee, J. W., Yoon, Y. M., Kim, J. H., Moon, B. G., Kim, J. H., & Song, B. S. (2014). Comparison of quality of bologna sausage manufactured by electron beam or

- X-ray irradiated ground pork. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34, 464-471.
- Sikora, E., Cieřlik, E., & Topolska, K. (2008). The sources of natural antioxidants. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 7, 5-17.
- Singh, S., & Shalini, R. (2016). Effect of hurdle technology in food preservation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 641-649.
- Siler, U., & Goralczyk, R. (2004). The role of lycopene in human health. En: *Fitoquímicos en la Salud y la Enfermedad*. Editorial CRC Press. Florida. Estados Unidos. Pg 285-309. ISBN 97-808-247-402-38.
- Simone, R., Russo, M., Catalano, A., Monego, G., Froehlich, K., Böhm, V., & Palozza, P. (2011). Lycopene inhibits NF- κ B-mediated IL-8 expression and changes redox and PPAR γ signalling in cigarette smoke stimulated macrophages. *Plos One*, 6, 19-26.
- Simonin, H., Durantou, F., & Lamballerie, M. de. (2012). New insights into the high-pressure processing of meat and meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 285-306.
- Sinha, R. P., & Häder, D. P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 1, 225-236.
- Siró, I., Kápolnab, E., Kápolnac, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance: A review. *Appetite*, 51, 456-467.
- Skuladottir, H., Tjoenneland, A., Overvad, K., Stripp, C., & Olsen, J. H. (2006). Does high intake of fruit and vegetables improve lung cancer survival?. *Lung Cancer*, 51, 267-273.
- 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.
- Soto, A. M., García, M. L., & Selgas, M. D. (2016). Technological and sensory properties of calcium-enriched dry fermented sausages: A study of the calcium bioavailability. *Journal of Food Quality*, 39, 476-486.
- Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2015). Lycopene; chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 41-53.
- Stahl, W., Ale-Agha, N., & Polidori, M. C. (2002). Non-antioxidant properties of carotenoids. *Biological Chemistry*, 383, 553-558.
- Stahl, W., Laar, J. von, Martin, H. D., Emmerich, T., & Sies, H. (2000). Stimulation of gap junctional communication: Comparison of acyclo-retinoic acid and lycopene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373, 271-274.

- Stanton C., Ross R. P., Fitzgerald G. F. & Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 198–203.
- Stefano, D. de, Maiuri, M. C., Simeon, V., Grassia, G., Soscia, A., Cinelli, M. P., & Carnuccio, R. (2007). Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN- γ . *European Journal of Pharmacology*, 566, 192-199.
- Stefanova, R., Toshkov, S., Vasilev, N. V., Vassilev, N. G., & Marekov, I. N. (2011). Effect of gamma-ray irradiation on the fatty acid profile of irradiated beef meat. *Food Chemistry*, 127, 461-466.
- Strati, I. F., & Oreopoulou, V. (2011). Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chemistry*, 129, 747-752.
- Strati, I. F., & Oreopoulou, V. (2016). Recovery and isomerization of carotenoids from tomato processing by-products. *Waste and Biomass Valorization*, 7, 843-850.
- Suárez, R. (2001). Conservación de alimentos por irradiación. *Revista de Investigación Académica*, 6, 85-124.
- Suárez, M. H., Rodríguez, E. R., & Romero, C. D. (2008). Analysis of organic acid content in cultivars of tomato harvested in Tenerife. *European Food Research and Technology*, 226, 423-435.
- Svelander, C. A., Tibäck, E. A., Ahrné, L. M., Langton, M. I., Svanberg, U. S., & Alming, M. A. (2010). Processing of tomato: Impact on *in vitro* bioaccessibility of lycopene and textural properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 9, 1665-1672.
- Tang, F. Y., Shih, C. J., Cheng, L. H., Ho, H. J., & Chen, H. J. (2008). Lycopene inhibits growth of human colon cancer cells via suppression of the Akt signaling pathway. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, 646-654.
- Tang, G., Ferreira, A. L. A., Grusak, M. A., Qin, J., Dolnikowski, G. G., Russell, R. M., & Krinsky, N. I. (2005). Bioavailability of synthetic and biosynthetic deuterated lycopene in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 229-235.
- Tang, M., Qian, L., Jiang, S., Zhang, J., Song, P., Chen, Y., & Li, K. (2014). Functional and safety evaluation of transgenic pork rich in omega-3 fatty acids. *Transgenic Research*, 23, 557-571.
- Tang, X., & Cronin, D. A. (2007). The effects of brined onion extracts on lipid oxidation and sensory quality in refrigerated cooked turkey breast rolls during storage. *Food Chemistry*, 100, 712-718.
- Tang, Y., Parmakhtiar, B., Simoneau, A. R., Xie, J., Fruehauf, J., Lilly, M., & Zi, X. (2011). Lycopene enhances docetaxel's effect in castration resistant prostate cancer associated with insulin-like growth factor I receptor levels. *Neoplasia*, 13, 108-119.

- Thompson, K. A., Marshall, M. R., Sims, C. A., Wei, C. I., Sargent, S. A., & Scott, J. W. (2000). Cultivar, maturity, and heat treatment on lycopene content in tomatoes. *Journal of Food Science*, *65*, 791-795.
- Thornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins-implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, *70*, 493-508.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C., Mora, L., & Reig, M. (2012). Innovations in value addition of edible meat by-products. *Meat Science*, *92*, 290-296.
- Tournour, H. H., Segundo, M. A., Magalhães, L. M., Costa, A. S., & Cunha, L. M. (2016). Effect of touriga nacional grape extract on characteristics of mechanically deboned chicken meat kept under frozen storage. *Journal of Food Process Engineering*, *7*, 1-10.
- Unlu, N. Z., Bohn, T., Francis, D. M., Nagaraja, H. N., Clinton, S. K., & Schwartz, S. J. (2007). Lycopene from heat-induced *cis*-isomer rich tomato sauce is more bioavailable than from all-*trans* rich tomato sauce in human subjects. *British Journal of Nutrition*, *98*, 140-146.
- Upritchard, J. E., Sutherland, W. H., & Mann, J. I. (2000). Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E, and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *23*, 733-738.
- Valduga, E., Valério, A., Tatsch, P. O., Treichel, H., Furigo, A., & Luccio, M. (2009). Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). *Food and Bioprocess Technology*, *2*, 234-238.
- Valle, M. del, Cámara, M., & Torija, M. E. (2006). Chemical characterization of tomato pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*, 1232-1236.
- Vallverdú-Queralt, A., Odriozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., Lamuela-Raventós, R. M., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2013). Impact of high-intensity pulsed electric fields on carotenoids profile of tomato juice made of moderate-intensity pulsed electric field-treated tomatoes. *Food Chemistry*, *141*, 3131-3138.
- Valsta, L. M., Tapanainen, H., & Männistö, S. (2005). Meat fats in nutrition. *Meat Science*, *70*, 525-530.
- Valtierra-Rodríguez, D., Heredia, N. L., García, S., & Sánchez, E. (2010). Reduction of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry skin by fruit extracts. *Journal of Food Protection*, *73*, 477-482.
- Van de Wiele, T. R., Oomen, A. G., Wragg, J., Cave, M., Minekus, M., Hack, A., & Van Wijnen, J. (2007). Comparison of five *in vitro* digestion models to *in vivo* experimental results. Lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *Journal of Environmental Science and Health*, *42*, 1203-1211.

- Van Haute, S., Raes, K., Van Der Meeren, P., & Sampers, I. (2016). The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. *Food Control*, *68*, 30-39.
- Van het Hof, K. H., de Boer, B. C., Tijburg, L. B., Lucius, B. R., Zijp, I., West, C. E., & Weststrate, J. A. (2000). Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. *The Journal of Nutrition*, *130*, 1189-1196.
- Vendrell, M. O. S. (2016). Aprovechamiento de los subproductos del jamón como fuente de péptidos antioxidantes. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Venkata-Reddy, B., Sivakumar, A. S., Jeong, D. W., Woo, Y. B., Park, S. J., Lee, S. Y., & Hwang, I. (2015). Beef quality traits of heifer in comparison with steer, bull and cow at various feeding environments. *Animal Science Journal*, *86*, 1-16.
- Verma, A. K., Sharma, B. D., & Banerjee, R. (2016). Efficacy of sunflower oil levels on the physico-chemical and sensory properties of low salt functional chicken nuggets. *Journal of Veterinary Public Health*, *7*, 53-57.
- Vitale, A. A., Bernatene, E. A., & Pomilio, A. B. (2010). Carotenoides en quimioprevención. Licopeno. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, *44*, 195-238.
- Viuda-Martos, M., Sanchez-Zapata, E., Sayas-Barberá, E., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., & Fernandez-Lopez, J. (2014). Tomato and tomato byproducts. Human health benefits of lycopene and its application to meat products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*, 1032-1049.
- Vuyst, L. de, Falony, G., & Leroy, F. (2008). Probiotics in fermented sausages. *Meat Science*, *80*, 75-78.
- Waliszewski, K. N., & Blasco, G. (2010). Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud Pública de México*, *52*, 254-265.
- Wang, L., Liu, S., Manson, J. E., Gaziano, J. M., Buring, J. E., & Sesso, H. D. (2006). The consumption of lycopene and tomato-based food products is not associated with the risk of type 2 diabetes in women. *The Journal of Nutrition*, *136*, 620-625.
- Wang, Q., Xiong, Z., Li, G., Zhao, X., Wu, H., & Ren, Y. (2016). Tomato peel powder as fat replacement in low-fat sausages: Formulations with mechanically crushed powder exhibit higher stability than those with airflow ultra-micro crushed powder. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *118*, 175-184.
- Wei, M. Y., & Giovannucci, E. L. (2012). Lycopene, tomato products, and prostate cancer incidence: A review and reassessment in the PSA screening era. *Journal of Oncology*, *12*, 1-7.

- WHO. (World Health Organization). (1988). Food irradiation: A technique for preserving and improving the safety of food. Ginebra, Suiza. Pg. 33-44.
- WHO. (World Health Organization). (2009). Global health risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Ginebra. Suiza. Pg. 32-54.
- Willcox, J. K., Catignani, G. L., & Lazarus, S. (2003). Tomatoes and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 1-18.
- Willstätter R, & Escher, H. H. Z. (1910). Lycopene extracted from tomato. *Physiology and Chemistry*, 76, 214–225.
- Won, J. S., Kim, M. H., Han, G. J., Noh, B. S., & Min, S. C. (2015). Preservation of strawberry juice by dynamic high-pressure processing. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 47, 480-485.
- WPTC. (World Processing Tomato Council). (2015). AMITOM & WPTC: Crop update as of 16 September 2015. *Tomato News*, 15, 6-11.
- Xia, J., Weaver, A., Gerrard, D. E., & Yao, G. (2008). Heating induced optical property changes in beef muscle. *Journal of Food Engineering*, 84, 75-81.
- Xianquan, S., Shi, J., Kakuda, Y., & Yueming, J. (2005). Stability of lycopene during food processing and storage. *Journal of Medicinal Food*, 8, 413-422.
- Xiao, S., Zhang, W. G., Lee, E. J., Ma, C. W., & Ahn, D. U. (2011). Effects of diet, packaging, and irradiation on protein oxidation, lipid oxidation, and color of raw broiler thigh meat during refrigerated storage. *Poultry Science*, 90, 1348-1357.
- Yan, H. J., Lee, E. J., Nam, K. C., Min, B. R., & Ahn, D. U. (2006). Effects of dietary functional ingredients and irradiation on the quality of cooked turkey breast meat during storage. *Journal of Food Science*, 71, C556-C563.
- Yang, S. H., Sharrocks, A. D., & Whitmarsh, A. J. (2003). Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene*, 320, 3-21.
- Yang, S. H., Lee, E. J., Moon, S. H., Paik, H. D., Nam, K., & Ahn, D. U. (2011). Effect of garlic, onion, and their combination on the quality and sensory characteristics of irradiated raw ground beef. *Meat Science*, 89, 202-208.
- Yildiz, H., & Baysal, T. (2007). Color and lycopene content of tomato puree affected by electroplasmolysis. *International Journal of Food Properties*, 10, 489-495.
- Yılmaz, I., Şimşek, O., & Işıklı, M. (2002). Fatty acid composition and quality characteristics of low-fat cooked sausages made with beef and chicken meat, tomato juice and sunflower oil. *Meat Science*, 62, 253-258.
- Yim, D. G., Ahn, D. U., & Nam, K. C. (2015). Effect of packaging and antioxidant combinations on physicochemical properties of irradiated restructured chicken rolls. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35, 248-257.

- Yonekura, L., & Nagao, A. (2007). Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Molecular Nutrition and Food Research*, *51*, 107-115.
- Yoon, K. S. (2003). Effect of gamma irradiation on the texture and microstructure of chicken breast meat. *Meat Science*, *63*, 273-277.
- Yuangklang, C., Vasupen, K., Wongnen, C., Wongsuthavas, S., Beynen, C., Wittayakun, S., & Srenanul, P. (2015). Digestibility of sundried tomato pomace in dogs. *Journal of Applied Animal Science*, *8*, 35-42.
- Zanardi, E., Battaglia, A., Ghidini, S., Conter, M., Badiani, A., & Ianieri, A. (2007). Evaluation of 2-alkylcyclobutanones in irradiated cured pork products during vacuum-packed storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 4264-4270.
- Zaripheh, S., Boileau, T. W. M., Lila, M. A., & Erdman, J. W. (2003). [14C]-lycopene and [14C]-labeled polar products are differentially distributed in tissues of F344 rats prefed lycopene. *The Journal of Nutrition*, *133*, 4189-4195.
- Zhang, S., Lu, F., Liu, Q., Liu, Y., Guan, X., Wei, Y., & Shi, D. (2016). Efficient generation of sFat-1 transgenic rabbits rich in n-3 polyunsaturated fatty acids by intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction, Fertility and Development*, *28*, 310-318.
- Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E., & Ahn, D. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, *86*, 15-31.
- Zhou, G. H., Xu, X. L., & Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat: A review. *Meat Science*, *86*, 119-128.
- Zhu, M. J., Mendoca, A., Min, B., Lee, E. J., Nam, K. C., Park, K., Du, M., Ismail, H. A., & Ahn, D. U. (2004). Effects of electron beam irradiation and antimicrobials on the volatiles, color and texture of ready-to-eat turkey breast roll. *Journal of Food Science*, *69*, 382-386.

