

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

**Pigmentos de la piel de *Dosidicus gigas* y *Octopus vulgaris*:
Caracterización químico-estructural, actividad antioxidante,
antimicrobiana y su aplicación en hamburguesas de pollo**

The seal of the University of Sonora is a circular emblem. It features a central shield with a sunburst at the top, a banner across the middle with the motto "TODO-LO-LUMINAN", and a base with horizontal lines. The shield is flanked by two figures holding a banner. The outer ring of the seal contains the text "UNIVERSIDAD DE SONORA" and the year "1942" at the bottom.

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta:

Esparza Espinoza Dania Marisol

Hermosillo, Sonora
2020

Septiembre de

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

**Pigmentos de la piel de *Dosidicus gigas* y *Octopus vulgaris*:
Caracterización químico-estructural, actividad antioxidante,
antimicrobiana y su aplicación en hamburguesas de pollo**

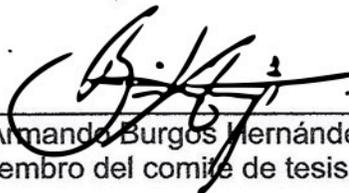
Dania Marisol Esparza Espinoza



Dra. Josafat Marina Ezquerra Brauer
Directora de tesis



Dr. José Luis Cárdenas López
Miembro del comité de tesis



Dr. Armando Burgos Hernández
Miembro del comité de tesis

ANGEL ANTONIO | Firmado digitalmente por
CARBONELL | ANGEL ANTONIO |
BARRACHINA | CARBONELL|BARRACHINA
Fecha: 2020.08.22 09:18:47
+02'00'

Dr. Ángel Antonio Carbonell Barrachina
Miembro del comité de tesis

Hermosillo, Sonora a septiembre de 2020.

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada "Pigmentos de la piel de *Dosidicus gigas* y *Octopus vulgaris*: Caracterización químico-estructural, actividad antioxidante, antimicrobiana y su aplicación en hamburguesas de pollo", en los sucesivos LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

A T E N T A M E N T E


LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA


Dania Marisol Esparza Espinoza

Nombre y Firma del Autor

AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis a mi familia en especial a mis padres Víctor García y Marisol Espinoza que con su amor, trabajo y apoyo me educaron y formaron a la persona que soy en la actualidad.

Agradezco a la Universidad de Sonora por ser parte integral en mi formación profesional durante estos últimos 7 años.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) por darme la oportunidad de continuar con mis estudios.

A todos los profesores de la Universidad de Sonora que me transmitieron una parte de sus conocimientos durante mis estudios de licenciatura y posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de maestría.

Agradezco enormemente a mi directora de tesis Dra. Marina Ezquerra, por su confianza, orientación, apoyo, comprensión y gran paciencia.

A los miembros de mi comité de tesis:

- Dr. José Luis Cárdenas, gracias por ayudarme con los estadísticos y tener siempre una gran disponibilidad a asesorarme.

- Dr. Armando Burgos, por su orientación y amabilidad.

- Dr. Ángel Carbonell, por su asesoría en el sensorial, que a pesar de la distancia siempre tuvo la disponibilidad para apoyar.

Al Dr. Jesús E. Chan, por su disponibilidad, apoyo, guía y asesorías.

A la Dra. Hisila Santacruz, por su ayuda en la caracterización estructural y su valiosa asesoría en la interpretación de los resultados.

A los integrantes del laboratorio de microbiología que fueron muy amables y apoyaron cada que tenía dudas. Gracias en especial a la maestra Violeta Parra por su confianza que me facilitó los equipos necesarios para trabajar la parte de microbiología y siempre estuvo al pendiente sobre mi estadía. A la Dra. Carina Rosas y Dra. Maribel Plascencia por su atención y asesorías.

A la Dra. Carmen María López Saiz, por su ayuda en el ensayo de Ames que salió de un proyecto de clases.

A Sol y Fernanda por ayudarme en los ensayos de antioxidantes, que necesité repetir más de una vez.

A las personas que me ayudaron en el sensorial Gaby, Sócrates, Haydeé, Angel, Sam y Lidianys, muchas gracias por su disposición y acudir cada que se necesitaba.

A María del Socorro Favela (Coty), por estar siempre al pendiente de recordarnos los trámites y papeleos.

A mis compañeros de la maestría, muchas gracias por su amistad y apoyo.

Existen muchas personas que me ayudaron y a las cuales les estaré profundamente agradecida ¡MUCHAS GRACIAS!

RESUMEN

El deterioro de los alimentos representa un reto para la industria alimentaria ya que, puede causar daños a la salud del consumidor y pérdidas económicas para la empresa. Por ello, con el fin de retardar el deterioro se hace uso de conservadores, en su mayoría sintéticos; sin embargo, derivado de las demandas de los consumidores, la búsqueda productos de origen natural se ha incrementado. Dentro de estos, se ha establecido que los extractos de pigmentos de calamar tienen un efecto de prevención en el deterioro de alimentos. Además, el calamar es un cefalópodo que también expresa diversa pigmentación, por lo que su piel puede representar una alternativa de fuente de compuestos pigmentados con actividad biológica. Por otra parte, a la fecha, la información de la aplicación de los extractos pigmentados del pulpo es escasa. Más aún el efecto del disolvente sobre la extracción de compuestos pigmentados bioactivos no se ha estudiado del todo, usando como sistema modelo la piel de calamar y pulpo. Por lo anterior, este estudio se dividió en tres grandes etapas: 1) Comparar la actividad antioxidante de extractos pigmentados de la piel de pulpo y calamar extraídos con dos disolventes, metanol acidificado y etanol acidificado, así como caracterizar estructuralmente por métodos espectrofotométricos los extractos pigmentados; por otra parte, 2) evaluar la actividad antimutagénica de extractos obtenidos de ambos organismos usando el disolvente metanol acidificado y, finalmente, 3) comparar la capacidad de los extractos pigmentados obtenidos de pulpo y calamar, de inhibir la oxidación de lípidos y el desarrollo de microorganismos, utilizando como sistema modelo hamburguesas de pollo almacenadas por 9 días a 4°C.

Los extractos pigmentados se extrajeron empleando dos disolventes (metanol-HCl y etanol-HCl) y se evaluó su capacidad antioxidante *in vitro*. Empleando el disolvente metanol-HCl se obtuvieron extractos con mayor actividad antioxidante. Los extractos pigmentados de la piel de pulpo presentaron una mayor actividad antioxidante y mejor rendimiento que los pigmentos de la piel de calamar. Los cuatro extractos presentaron señales relacionadas con xantomatina y dihidroxantomatina, pigmentos del grupo de los omocromos, así como la quinurenina, un precursor de estos compuestos. Los extractos de calamar

presentaron una mayor proporción de quirunenina y aparentemente una menor concentración de grupos amino-aromáticos.

Al evaluar la actividad antimutagénica en los extractos metanólicos, se detectó que los extractos de calamar presentaron una mayor capacidad de inhibir el efecto negativo del mutágeno aflatoxina B₁ sobre ambas cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100), que los de pulpo.

Durante el almacenamiento los extractos pigmentados lograron prolongar la vida de anaquel de las hamburguesas de pollo siendo los extractos obtenidos del calamar más eficientes como antimicrobianos y los extractos obtenidos del pulpo más eficientes como inhibidores de las primeras etapas de reacciones de oxidación de los lípidos.

Tanto el disolvente utilizado para la extracción, como la especie de cefalópodo, tuvieron un efecto sobre la actividad antioxidante de los extractos obtenidos. Los extractos pigmentado de la piel de calamar tienen una alta capacidad de inhibir la mutación inducida por la aflatoxina B₁ (AFB₁) en *Salmonella typhimurium* a concentraciones muy bajas. Bajo las condiciones de este estudio, los extractos pigmentados de pulpo presentaron una mayor capacidad antioxidante *in vitro* y en el sistema modelo, mientras que los de calamar fueron más eficientes en inhibir la mutación de la AFB₁ y el desarrollo de microorganismos en las hamburguesas de pollo. Los principales componente identificados en los pigmentos obtenidos en ambos cefalópodos pertenecen al grupo de los omocromos, xantomantina, dehidroxhantomantina y su precursor querunina. Las diferencias en las actividades biológicas se atribuyen a la diferencia en la proporción de la querunina y aromáticos aminados detectadas por resonancia magnética nuclear.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|------|
| APROBACIÓN..... | ii |
| DERECHOS DE AUTOR | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| RESUMEN..... | vii |
| TABLA DE CONTENIDO..... | viii |
| LISTA DE TABLAS..... | ix |
| LISTA DE FIGURAS..... | x |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| ANTECEDENTES..... | 4 |
| Deterioro de Alimentos..... | 4 |
| Oxidación Lipídica | 4 |
| Deterioro Microbiano | 6 |
| Aditivos | 7 |
| Aditivos Naturales..... | 7 |
| Omocromos | 13 |
| Cefalópodos..... | 15 |
| Sistema de Pigmentación..... | 16 |
| Importancia Comercial..... | 18 |
| Disolventes y Extracción de Compuestos Bioactivos..... | 20 |
| HIPÓTESIS..... | 20 |
| OBJETIVOS..... | 22 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 23 |
| Materia Prima..... | 23 |
| Extracción de Pigmentos de Piel de Pulpo y Calamar..... | 23 |
| Ensayos de Actividad Antioxidante <i>in vitro</i> | 23 |
| Caracterización Espectrofotométrica de los Extractos Pigmentados..... | 25 |
| Prueba de Antimugenicidad..... | 27 |
| Estudio de Vida de Anaquel de una Hamburguesa de Pollo..... | 27 |
| Análisis Estadístico..... | 35 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 35 |
| Rendimiento de Extracción y Actividad Antioxidante..... | 36 |
| Análisis Espectrofotométrico..... | 38 |
| UV-Visible..... | 38 |
| Resonancia Magnética Nuclear ^1H | 39 |
| Prueba de Antimugenicidad..... | 42 |
| Análisis Vida de Anaquel..... | 44 |
| Determinación del pH..... | 44 |
| Análisis Microbiológico..... | 46 |
| Análisis Oxidación de Lípidos..... | 50 |
| Análisis Sensorial..... | 56 |
| CONCLUSIONES..... | 58 |
| RECOMENDACIONES | 59 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|--------|
| 1. Lista de aditivos clasificados según su función. | 8 |
| 2. Estudio de pigmentos en cefalópodos..... | 19 |
| 3. Formulaciones hamburguesas de pollo adicionadas con α -tocoferol y los extractos pigmentados de pulpo (PPT1) y de calamar (PCT1)..... | 29 |
| 4. Medios utilizados para el análisis microbiológico..... | 31 |
| 5. Escala empleada en la evaluación de calidad sensorial aplicada a la hamburguesa de pollo..... | 34 |
| 6. Rendimiento de extracción y actividad antioxidante de pigmentos de piel de pulpo y calamar extraídos con dos solventes..... | 37 |
| 7. Efecto de la piel de pulpo y pigmentos de piel de calamar extraídos con metanol-HCl sobre la mutagenicidad inducida por AFB ₁ , basado en el ensayo <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 y TA100..... | 43 |
| 8. Valores pH en hamburguesas de pollo a 4°C..... | 45 |
| 9. Recuento de bacterias ácido lácticas (log ₁₀ ufc/ g) en hamburguesas de pollo almacenadas a 4°C | 48 |
| 10. Recuento de <i>enterobacteriaceae</i> (log ₁₀ ufc/ g) en hamburguesas de pollo almacenadas a 4°C..... | 49 |
| 11. Recuento de levaduras y hongos (log ₁₀ ufc/ g) en hamburguesas pollo almacenadas a 4°C..... | 50 |
| 12. Valor de peróxido (meq/kg) en hamburguesas de pollo almacenadas a 4°C..... | 52 |
| 13. Valor de anisidina en hamburguesas de pollo almacenadas a 4°C | 53 |
| 14. Evaluación sensorial de hamburguesa de pollo con extractos de piel pulpo almacenada a 4°C..... | 57 |
| 15. Evaluación sensorial de hamburguesa de pollo con extractos de piel de calamar almacenada a 4°C..... | 58 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|--------|
| 1. Mecanismo de oxidación lipídica..... | 5 |
| 2. Estructuras básicas de antioxidantes naturales..... | 10 |
| 3. Estructura química base de omocromos | 14 |
| 4. Diagrama de piel de cefalópodo y las estructuras cerebrales que controlan el cambio de color en cefalópodos..... | 17 |
| 5. Espectro de absorción de UV-Vis de los extractos pigmentados..... | 40 |
| 6. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H del extracto pigmentados..... | 41 |

INTRODUCCIÓN

El deterioro de los alimentos es uno de los mayores retos de la industria alimentaria, debido a las grandes pérdidas económicas y los daños a la salud que puede provocar en los consumidores (Carrillo Inungaray y Reyes Munguía, 2014). Las principales causas del deterioro son los microorganismos como las bacterias y reacciones químicas como la rancidez oxidativa y la hidrólisis (Torres y col., 2016). Por lo que con el fin de prolongar la vida útil de los alimentos se ha implementado el uso de los aditivos, agentes antimicrobianos o antioxidantes que retardan o inhiben la proliferación de bacterias y las reacciones de oxidación (Carocho y col., 2015).

Los antioxidantes, por su origen, pueden clasificarse en sintéticos o naturales. Los antioxidantes sintéticos son los utilizados por la industria y los más destacados son el butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno, la terbutilhidroquinona; sin embargo, los consumidores tienen preocupaciones sobre su consumo, ya que existen estudios que indican que pueden tener efectos tóxicos y cancerígenos. Mientras tanto, los antioxidantes naturales tienen potencial reducir la incidencia de tipos particulares de cánceres, hipertensión, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Ben Atitallah y col., 2019).

Entre los antioxidantes naturales destacan los carotenoides, lecitina, derivados fenólicos, tocotrioles y tocoferoles, los extractos de especies como clavo, orégano y pimienta que provienen principalmente de plantas terrestres; sin embargo, en el mar también existe gran biodiversidad de flora y fauna donde se pueden obtener compuestos antioxidantes (Carocho y col., 2018).

Así, se ha establecido que los desechos generados durante el manejo, procesamiento y producción comercial de estos, como son cabezas, esqueletos, vísceras, escamas, piel y aletas, son una excelente fuente de compuestos bioactivos (Pinteus y col., 2018). Dentro de los organismos marinos de relevancia económica y que representan una excelente fuente de compuestos bioactivos se encuentran los cefalópodos.

La pesca de cefalópodos en México se estima que es de aproximadamente 42 mil toneladas, dentro de los cuales destacan el pulpo (*Octopus vulgaris*) y

calamar gigante (*Dosidicus gigas*) (CONAPESCA, 2018). En diversos trabajos se ha detectado que diversos compuestos químicos extraídos de diferentes regiones anatómicas como las aletas, los tentáculos y los brazos de estos cefalópodos, como proteínas, carbohidratos complejos como la quitina, poseen actividades biológicas. En el caso concreto de la piel de calamar, además se han extraído compuestos pigmentados, los cuales presentaron la capacidad de prolongar la vida de anaquel de algunos sistemas alimentarios como el aceite de pescado, pescados almacenados en hielo y paté de atún (Aubourg y col., 2016; Ezquerria-Brauer y col., 2016; y col., 2017; Chan-Higuera y col. 2019a). Así mismo, se comprobó que los extractos obtenidos no representaban un riesgo al consumidor (Ezquerria-Brauer y col., 2017; Chan-Higuera y col., 2019a).

Los principales compuestos pigmentados identificados en la piel de los cefalópodos son los omocromos. Romero y Martínez (2015) reportaron que estos compuestos químicos pueden actuar como donadores de electrones y estabilizar a radicales libres. Chan-Higuera y col. (2019b) establecieron que los principales omocromos con actividad antioxidante provenientes de la piel de *Dosidicus gigas* eran la xantomantina y la dehidrohantomatina.

Por otro lado, se ha establecido que la concentración y eficacia del compuesto bioactivo extraído de cualquier sistema biológico dependerá, entre otros factores, del disolvente empleado (Ngo y col., 2017). Fatimah Zahara y Rabeta (2017) detectaron que la actividad antioxidante de extractos obtenidos de la tinta de la pluma de *Loligo duvauceli* era mayor cuando se empleaba etanol como disolvente que hexano. Cruz-Ramírez y col. (2015) en extractos obtenidos de tentáculos de *Paraoctopus limaculatus*, la actividad antimutagénica fue mayor cuando se trabajó con hexano que con metanol o con acetona. Este comportamiento se atribuye a que dependiendo de las características químicas del compuesto bioactivo es su polaridad y puede ser más o menos soluble en un determinado disolvente (Ngo y col., 2017).

A la fecha se ha establecido la propiedad antioxidante, antimutagénica y antimicrobiana de extractos pigmentados solamente de la piel de calamar empleando metanol acidificado como disolvente (Chan-Higuera y col., 2019c) y

antioxidante del mismo organismo de extractos obtenido con etanol acidificado (Aubourg y col., 2016). Sin embargo, no se ha realizado una comparación del disolvente empleado, ni se ha evaluado el potencial bioactivo de los omocromos presentes en la piel de pulpo.

Por lo tanto, la idea central de este estudio fue determinar si la piel de pulpo puede representar una fuente de compuestos bioactivos y emplearse como un aditivo alimentario, así como el de determinar el efecto de dos disolventes (metanol-HCl y etanol-HCl) sobre la extracción de pigmentos de la piel de pulpo (*Octopus vulgaris*) y calamar gigante (*Dosidicus gigas*) con actividad antioxidante.

ANTECEDENTES

Deterioro de Alimentos

El deterioro es una alteración negativa en un alimento, cambiando sus propiedades sensoriales y nutricionales, haciendo que el alimento sea inaceptable para el consumidor. Para evitar este tipo de alteraciones se hace uso de los aditivos alimentario, tema que se retomará más adelante. Los factores que producen el deterioro de los alimentos se dividen en tres tipos: cambios físicos, biológicos o químicos. Los golpes y daños producidos con la manipulación, preparación o conservación de los alimentos son del tipo de deterioro físico (Carrillo Inungaray y Reyes Munguía, 2014; Lianou y col., 2016).

El deterioro biológico puede ser causado por infestación de insectos o roedores y proliferación de microorganismos, siendo este último uno de los principales factores de deterioro. Los microorganismos pueden alterar los alimentos de diferentes maneras, la presencia de ciertas especies puede provocar infecciones o producir toxinas que causan intoxicación siendo un problema para la salud del consumidor, además las enzimas de los microorganismos producen subproductos que afectan a las características organolépticas (Villalobos-Delgado y col., 2019).

El deterioro químico sucede cuando diferentes componentes que constituyen el alimento reaccionan entre sí o con algún componente agregado que altera sus características organolépticas y nutricionales, ejemplos de esto incluyen: pardeamiento enzimático, no enzimático y oxidación lipídica (Nasery. y col., 2016)

Oxidación Lipídica

Los alimentos más susceptibles al deterioro oxidativo son los que se encuentran ricos en componentes lipídicos (Romain y col., 2013). La autooxidación es su principal mecanismo (**Figura 1**), el cual sucede a través de la formación de radicales libres y consta de 3 fases: iniciación, propagación y terminación (Gonzalo y col., 2012).

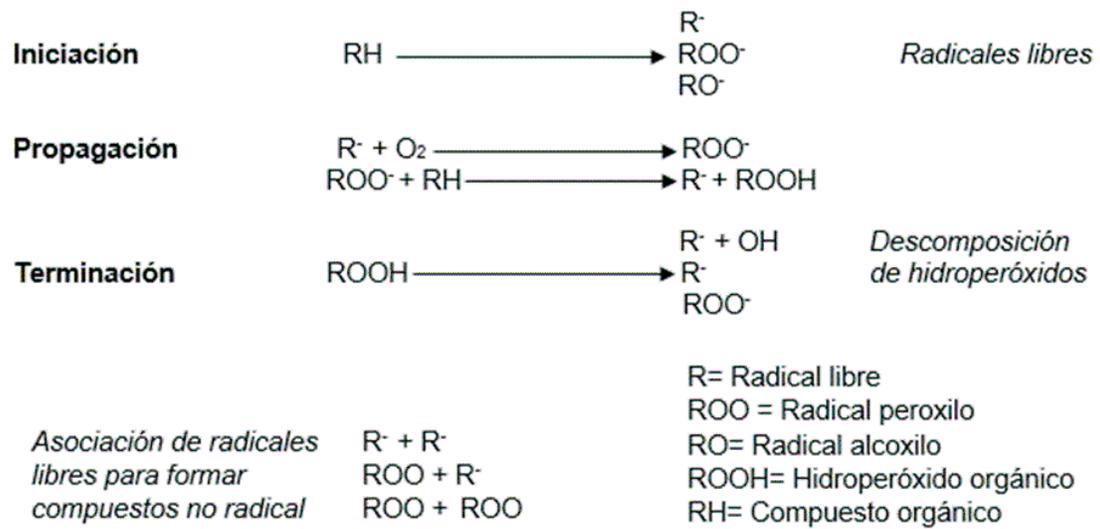


Figura 1. Mecanismo de oxidación lipídica

Fuente: Gonzalo y col., 2012

La fase de iniciación se da por la presencia de factores externos como luz, altas temperaturas y presencia de iones metálicos, generando inestabilidad en las insaturaciones de los ácidos grasos. Esta inestabilidad rompe la insaturación y forma un radical libre (Schaich, 2013).

En la fase de propagación el radical formado $R\cdot$ reacciona con el oxígeno atmosférico para formar un radical peroxilo $ROO\cdot$ y este reacciona con una nueva molécula insaturada para originar el hidroperóxido $ROOH$ y un nuevo radical $R\cdot$ que repite la secuencia de reacciones con otra molécula insaturada (Schaich, 2013; Xiong y col., 2020).

La terminación es la eliminación de radicales del sistema para formar compuestos no radicales estables. Después de la formación de los primeros radicales, las dos etapas de oxidación ocurren simultáneamente, pero a diferentes velocidades que cambian a lo largo del proceso (Ladikos y Lougovois, 1990; Gonzalo y col., 2012).

Deterioro Microbiano

Los microorganismos causantes del deterioro de alimentos pueden clasificarse en dos grandes grupos: los mohos y levaduras y las bacterias.

Los mohos y levaduras se desarrollan principalmente en condiciones ambientales especialmente difíciles, son muy resistentes al procesado de los alimentos. Las levaduras, en concreto, son resistentes a pH bajos y se asocian al deterioro de alimentos con alta actividad de agua y alto contenido de azúcar. Los hongos filamentosos son resistentes al pH bajo y, algunas especies, también al calor. Generalmente, se asocian a alimentos procesados y formulados para evitar el crecimiento de otros microorganismos (Petruzzi y col., 2017).

Las bacterias que deterioran los alimentos pueden dividirse principalmente en dos tipos lipolíticas y proteolíticas. Las bacterias lipolíticas liberan ácidos grasos por acción enzimática provocando sabores y olores a rancio aún en concentraciones muy bajas. Mientras que las bacterias proteolíticas provocan la hidrólisis enzimática de proteína causando alteraciones tanto en el olor como en el sabor y textura. Existen otros tipos de bacterias que se pueden encontrar en los alimentos como las patógenas que son responsables de las enfermedades de transmisión alimentaria y

también se pueden encontrar bacterias indicadoras de contaminación (Shao y col. 2011).

Aditivos

El *Codex Alimentarius* (1995) define como aditivo alimentario “cualquier sustancia que tal cual no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte directa o indirectamente por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características”. Dicho de otra manera, los aditivos alimentarios sirven para los procesos tecnológicos (facilitar elaboración de productos), prevenir y evitar riesgos provocados por las alteraciones del deterioro y mantener sus características organolépticas, nutricionales y su inocuidad. Existen diferentes tipos de aditivos según su función (**Tabla 1**).

Los aditivos también son clasificados según su origen, pueden ser sintéticos o naturales. Los aditivos sintéticos son aquellos obtenidos de productos de síntesis no presentes en la naturaleza, mientras que, los aditivos naturales son aquellos que se obtienen de productos presentes en la naturaleza (Gutiérrez-del-Río y col., 2018).

Los aditivos sintéticos son ampliamente utilizados en la industria alimentaria, ya que, son los más económicos. Sin embargo, se les ha relacionado con enfermedades como el cáncer, causando gran preocupación principalmente a los consumidores. Debido a esto existe una tendencia en consumir alimentos con aditivos naturales por parte de los consumidores, mientras que la industria alimentaria intenta cumplir con la demanda del consumidor, se dedican a la búsqueda de potenciales aditivos naturales (Lavilla, 2019).

Aditivos Naturales

Los aditivos de origen natural, como ya se ha mencionado, se encuentran entre la preferencia de los consumidores, debido a que promueven una dieta saludable. Siendo los colorantes, edulcorantes, antioxidantes y conservantes los aditivos naturales de mayor interés (Carocho y col., 2015).

Tabla 1. Lista de aditivos clasificados según su función.

| Tipo de aditivos | Función |
|----------------------------------|---|
| Acidificantes | Sustancias que modifican o mantienen la acidez de los productos. |
| Antioxidantes | Sustancias que prolongan la vida de almacén de los productos, protegiéndolos del deterioro ocasionado por la oxidación. |
| Colorantes | Sustancia que da o restituye color a un producto. |
| Conservadores | Sustancias o mezcla de sustancias que previenen, retardan o detienen cualquier alteración causada por microorganismos. |
| Edulcorantes | Sustancias diferentes de los mono- y disacáridos, que imparten un sabor dulce a los productos. |
| Emulsionantes/ Emulsificantes | Sustancias o mezcla de sustancias que forman o mantienen una emulsión uniforme en un producto. |
| Espesantes | Sustancias que incrementan la viscosidad de los productos. |
| Estabilizantes | Sustancias que posibilitan el mantenimiento de una dispersión uniforme de dos o más sustancias. |
| Saborizante (aromatizante) | Sustancia o mezcla de sustancias con o sin otros aditivos que se utilizan para proporcionar o intensificar el sabor o aroma de los productos. |

Fuente: Secretaría de Salud-Estados Unidos Mexicanos. DOF aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias.

Los conservadores de origen natural provienen principalmente de las plantas. Estas sintetizan diferentes metabolitos durante su crecimiento, los cuales poseen diferentes actividades biológicas. Se ha estudiado su aplicación en la conservación de alimentos, los cuales destacan estructuralmente compuestos fenólicos, terpenos, y los que contienen nitrógeno o azufre (Shao y col., 2011; Gutiérrez-del-Río y col., 2018)

Antioxidantes naturales. Se han encontrado compuestos con importante actividad antioxidante en la naturaleza como lo son los flavonoides, carotenoides, ácidos hidroxicinámicos y terpenos que destacan gracias a su estructura de dobles enlaces conjugados (**Figura 2**) (Oswell y col., 2018; Ribeiro y col., 2019). Los antioxidantes naturales se pueden clasificar en:

- Antioxidantes tipo I: Son capaces de interrumpir la cadena de radicales cediendo un radical de hidrógeno a un radical químico libre. Este tipo de antioxidantes impide que los lípidos reaccionen (Chandra y col., 2020).
- Antioxidantes de tipo II: Son compuestos que impiden o disminuye la formación de radicales libres. Su acción depende del pH y la temperatura (Chandra y col., 2020).
- Antioxidantes tipo III: Estos compuestos protegen contra la oxidación. Protegen tanto el interior como el exterior de la célula. Dentro de este grupo se encuentran los carotenoides, vitamina E (tocoferol), o la vitamina C (ácido ascórbico). (Amarowicz y Pegg, 2019).

Los flavonoides son una de las principales clases de compuestos de fenoles de vegetales y frutas. Pueden quelar iones metálicos por la formación de complejos con cationes divalentes. Además, la presencia de grupos hidroxilo libres en los anillos aromáticos permiten la eliminación de los radicales libres y entre más grupos hidroxilos libres su capacidad antioxidante aumenta (Carocho y col., 2018).

Los carotenoides capturan los radicales piróxilos, que reaccionan con ellos para formar radicales estabilizados por resonancia. Su capacidad de eliminar radicales piróxilos puede interrumpir la secuencia de reacción de oxidación lipídica. La capacidad antioxidante de los carotenoides aumenta con el número creciente de dobles insaturados (Amarowicz y Pegg, 2019).

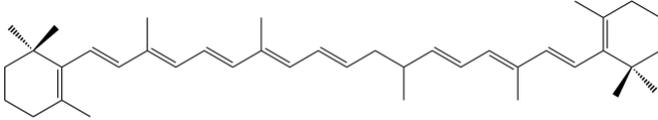
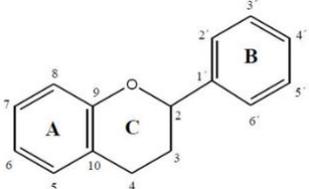
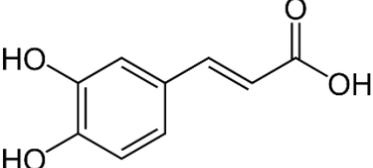
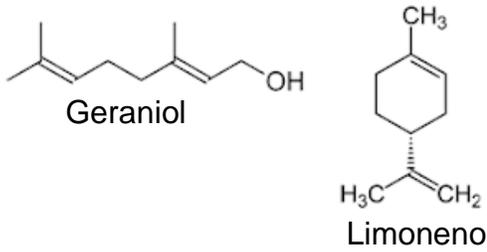
| |
|---|
| Carotenoides |
|  <p>β-Caroteno</p> |
| Flavonoides |
|  <p>Base flavonoides</p> |
| Ácidos hidroxicinámicos |
|  <p>Ácido 3,4-dihidroxicinámico</p> |
| Terpeno |
|  <p>Geraniol</p> <p>Limoneno</p> |

Figura 2. Estructuras básicas de antioxidantes naturales
Fuente: Oswell y col., 2018

Los ácidos hidroxicinámicos son capaces de donar un átomo de hidrógeno a los radicales libres dando como resultado la formación de un radical antioxidante estabilizado por resonancia. Los ácidos hidroxicinámicos son frecuentes en las pepitas, bayas, semillas, hierbas, granos de cereales, verduras de hoja verde, así como espárragos, canela, clavo y papa (Oswell y col., 2018).

Los terpenos son antioxidantes que se encuentran en especias como la hoja de laurel de la India, orégano, romero, comino, tomillo, alcaravea negra, canela, cilantro, aceite de nuez moscada, salvia y anís estrellado. Su capacidad antioxidante se le atribuyen a sus dobles enlaces (Carocho y col., 2015; Amarowicz y Pegg, 2019)

Antioxidantes de origen marino. Ya se ha mencionado los hallazgos de la investigación de los antioxidantes naturales provenientes de fuentes naturales terrestres, sin embargo, en el mar existen una gran biodiversidad de flora y fauna que pueden contener componentes con actividad antioxidante. En algas se pueden encontrar compuestos como los polisacáridos sulfatados y florotaninos.

Los polisacáridos sulfatados son polímeros con estructuras diversas que poseen una cantidad de grupos sulfatos esterificados con los azúcares que los conforman. Se encuentran principalmente en tres grupos de algas marinas: algas pardas, algas rojas y algas verdes. Los principales polisacáridos sulfatados de las algas rojas son los carragenanos, las algas pardas son fucoidanos y en algas verdes ulvanas (Ngo y Kim, 2013). La actividad antioxidante de los polisacáridos sulfatados depende de sus características estructurales como el nivel de sulfatación y su distribución a lo largo de la cadena principal del polisacárido, el peso molecular, la composición de azúcares y su estereoquímica (Vega y col., 2020). Se ha demostrado que los polisacáridos sulfatados de bajo peso molecular presentan mayor actividad antioxidante que los de alto peso molecular, ya que, los polisacáridos sulfatados de bajo peso molecular pueden incorporar a las células de manera más eficiente y donar protones comparado con los de alto peso molecular (Ngo y Kim, 2013).

Los florotaninos se producen en distintas algas pardas como protección ante radiación UV y condiciones de estrés. Estructuralmente los florotaninos son ácidos

fenólicos, su monómero es el floroglucinol (1,3,4 trihidroxibenceno) y, según los tipos de enlaces, pueden ser clasificados en 4 subclases: fualoles y floretoles (con un enlace éter), fucoles (con un enlace fenilo), fucofloroetoles (con enlaces éter y fenilo) y eckoles (con un enlace dibenzodioxina). Los florotaninos extraídos de las algas pardas presentan actividad antioxidante actuando como agentes reductores, quelantes de metales y atrapan los radicales libres, siendo efectivos para inhibir la oxidación de lípidos (Hannan y col., 2020).

Entre los animales marinos, también se han encontrado compuestos con potencial actividad antioxidante. Principalmente se intenta hacer uso de los subproductos de la pesca, ya que, el 40 % de la pesca son desecho como cabezas, esqueletos, vísceras, escamas y aletas. Los péptidos y los pigmentos son algunos de los compuestos antioxidantes que se pueden encontrar en los animales marinos (Choksawangkarn y col., 2018).

Se ha demostrado que los péptidos derivados de proteínas de pescados presentan potencial actividad antioxidantes y antimicrobiana siendo de utilidad para productos farmacéuticos, procesamiento y preservación de alimentos. Un péptido se conforma de 2 a 20 residuos de aminoácidos, se encuentran inactivos en la secuencia de las proteínas y puede liberarse por hidrólisis enzimática durante la digestión gastrointestinal en el cuerpo o durante el procesamiento de alimentos (Lorenzo y col., 2018). Es importante mencionar que los péptidos se pueden obtener a partir de los subproductos del procesamiento de pescado mediante la hidrólisis de proteínas con enzimas endógenas (presentes en el pescado) o exógenas (externas al pescado). Se desconoce el mecanismo exacto de los péptidos, sin embargo, se conoce que los aminoácidos hidrofóbicos, aromáticos contribuyen a su potencial actividad antioxidante (Sila y Bougatef, 2016).

Los omocromos son pigmentos naturales que pueden ser encontrados en la piel de cefalópodos; más adelante se detallará más sobre los omocromos y los cefalópodos (Board, 2005; Hendry y Houghton, 1996). Existen varios estudios donde se observaron extractos de pigmentos de la piel de calamar que presentaron capacidad antioxidante y antimicrobiana en diferentes sistemas alimenticios representado una alternativa para la prevención del deterioro alimentario (Aubourg

y col., 2016; Ezquerra-Brauer y col., 2016; Ezquerra-Brauer y col., 20167; Chan-Higuera y col., 2019a).

Omocromos

Estructuralmente son compuestos N-heterocíclicos basado en sistemas de fenoxazina (**Figura 3A**) y fenotiazina (**Figura 3B**); estos proporcionan un sistema de deslocalización electrónica debido a sus anillos aromáticos; además, permite la absorción de fotones de baja energía como resultado de su momento dipolar alto, proveniente de la unión de estos dos sistemas a cadenas polares. Los omocromos se dividen en omatinas, omatin D, omminas y ommidinas (Hendry y Houghton, 1996; Beyer y Walter, 1987; Figon y Casas, 2018).

Las omatinas presentan coloración amarillo o rojo, son moléculas de peso molecular bajo, del tipo fenoxazina, inestables en condiciones básicas y sensibles a la autooxidación. Están subdivididas en xantomatina, xantomatina descarboxilada y su forma reducida dihidroxantomatina, rodomatín y omatina D (Zhang y col., 2016). En la **Figura 3C** se muestra la estructura base de las omatinas (xantomatina) (Ziegler, 1961; Figon y Casas, 2018).

Las omminas son compuestos de alto peso molecular del tipo fenotiazina, no sufren de autooxidación y presenta color púrpura; en esta subdivisión solo se ha estudiado la ommina A (**Figura 3D**), estructuralmente se puede diferenciar de las omatinas ya que contiene azufre (Kayser, 1985; Figon y Casas, 2018).

Las ommidinas constituyen el grupo de omocromos del cual existe menor información. Su coloración es amarilla y estructuralmente pueden estar basadas en el sistema fenotiazina, ya que contiene azufre (Kayser, 1985; Figon y Casas, 2018).

Cada una de las estructuras mencionadas confiere propiedades particulares a los omocromos, así como su solubilidad en medio básicos y su rápida degradación en este medio, debido a que se comportan como ácidos con excepción de los conjugados hidrofílicos de dihidroxantomatina.

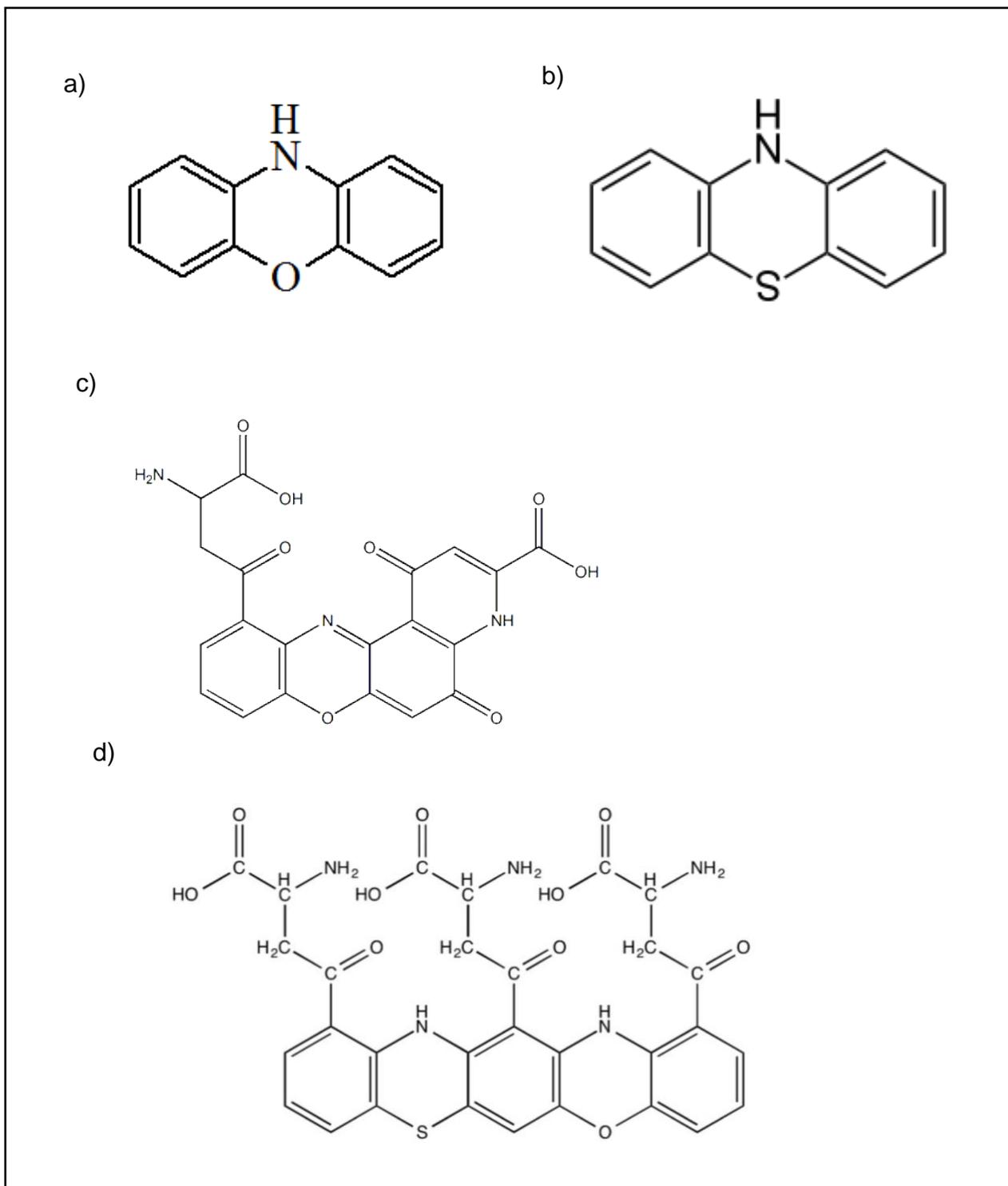


Figura 3. Estructura química base de omocromos **A)** estructura fenoxazina **B)** estructura fenotiazina, **C)** estructura base de las omatinas (xantomatina), **D)** estructura base ommina (Omina A)

Los omocromos son poco soluble en agua y disolventes orgánicos neutros; sin embargo, son solubles en disolventes orgánicos acidificados, por ejemplo ácido fórmico y el metanol acidificado con ácido clorhídrico; este último permite la extracción de la mayoría de los omocromos con excepción de omatina D y rodomatin, debido a la presencia de sulfato y glucosa, respectivamente; también se pueden extraer en solución acuosa neutra (Linzen, 1974; Kayser, 1985; Markaida y Gilly, 2016; Williams y col., 2016).

Actividad Antiradical de los Omocromos

La actividad antioxidante es una propiedad importante que está dada por el sistema de fenoxazina; detiene la propagación de radicales libres (Romero y Martínez, 2015; Figon y Casas, 2018). Romero y Martínez (2015) realizaron un estudio teórico sobre la actividad antioxidante en xantomatina y omatina D por los mecanismos de transferencia de electrón y el de transferencia de átomos de hidrógeno; para el primero se analizó la energía de ionización vertical y la afinidad de electrones vertical y para el segundo mecanismo se analizó la energía de disociación y la energía libre de Gibbs; se concluyó que ambos mecanismos son termodinámicamente posibles, siendo, omatina D el mejor antioxidante. Mientras tanto, Figon y Casas (2018) realizaron un estudio del mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno en xantomatina y omatina D, resultando omatina D la que presenta mayor actividad antioxidante. Chan-Higuera y col. (2019b) encontraron omocromos con actividad biológica en extractos pigmentados de un cefalópodo, el calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Los omocromos identificados en dicho extracto fueron estructuras de la clase omatina: xantomatina, hidroxantomatina y dihidroxantomatina y su mecanismo antioxidante fue descrito por la transferencia de átomos de hidrógeno y la transferencia de electrones.

Cefalópodos

Los cefalópodos son invertebrados marinos que pertenecen a una clase dentro del filo *Mollusca*, son clasificados en pulpos (octópodos, ocho brazos), sepias y calamares (decápodos, ocho brazos más dos tentáculos) y nautilus (Barord y Boyle, 2019). Se encuentran alrededor del mundo en diferentes hábitats, desde aguas frías hasta las temperaturas templadas. Además, se pueden encontrar tanto en

zonas bentónicas como pelágicas de mares y océanos, así como cerca de la superficie del agua y a una profundidad de 5000 m (Hoving y col., 2014). Estos moluscos son de cuerpo blando, carecen de un caparazón externo y su anatomía se divide en tres regiones: el manto; una estructura muscular en forma de bolsa que contiene la mayoría de los órganos internos, la cabeza; donde se encuentran los ojos, cerebro y boca y los brazos y tentáculos; normalmente cubiertos por ventosas (Barord y Boyle, 2019). Debido a su anatomía los cefalópodos tienen sistemas únicos de locomoción y movilidad, además tienen un sistema nervioso y de pigmentación desarrollados. Este último les permite tener la capacidad de adaptarse rápidamente a su entorno mediante el camuflaje (Orenstein y col., 2016); a continuación, se abundará más sobre su sistema de pigmentación.

Sistema de Pigmentación

El uso de color, contraste y cambio de textura en los patrones de los cefalópodos son de gran importancia para su supervivencia, ya que se encuentran involucrados en actividades de apareamiento, caza y defensa. Estos cambios de color suceden gracias a que los cefalópodos tienen debajo de la epidermis capas de tejido conectivo, células de color activo (cromatóforos), cuerpos reflectores (iridóforos, leucóforos) y un sistema complejo de fibras musculares para mover la piel sobre la superficie muscular (Kennedy, 1979; Orenstein y col., 2016). Los cambios de coloración son producidos por los cromatóforos conducidos neuronalmente (**Figura 4**). Estos se encuentran en el saco pigmentario elástico entre las fibras musculares. En estado relajado, el saco pigmentario se retrae pasivamente a un punto oscuro microscópico, las fibras musculares se extienden y la superficie de la piel aparece blanca debido a la reflexión del músculo. Mientras que, en estado activo (contracción), las fibras musculares del cromatóforo se contraen, extendiendo el saco pigmentario y extendiendo el área cubierto por su pigmento continuo. El pigmento se filtra al músculo, la luz incidente es absorbida selectivamente por el pigmento y las longitudes de onda reflejadas dan color a la superficie. Estos músculos se pueden contraerse y relajarse entre 200 y 300 picosegundos y así cambiar la apariencia completa en milésima de segundos.

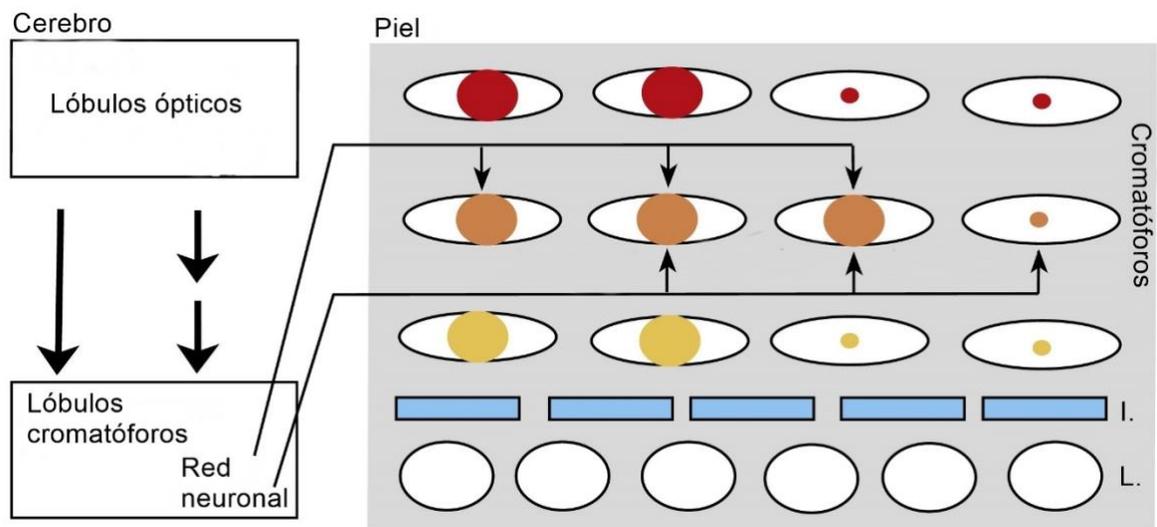


Figura 4. Diagrama de piel de cefalópodo y las estructuras cerebrales que controlan el cambio de color en cefalópodos. La piel tiene diferentes capas de cromatóforos, encima se encuentra una capa de iridóforos (I.) que contienen elementos reflectantes y una capa de leucóforos (L.) que contienen un pigmento blanco difuso para formar un fondo a los colores cromatóforos. En el cerebro, los lóbulos ópticos son importantes para producir movimientos de coordinación y controlar la expresión de los patrones principales del cuerpo. Los lóbulos ópticos se conectan a través de vías directas e indirectas a los lóbulos cromatóforos, que contienen las redes neuronales del cromatóforo.

Fuente: Osorio, 2014

Además, los cromatóforos se encuentran en nervios conectados directamente al cerebro, controlando una variedad de patrones y contrastes (Gartner y Towner, 1995 ; Hanlon, 2007; Orenstein y col., 2016). Los pigmentos de los cromatóforos que se encuentran en los cefalópodos se han identificado como omocromos (**Tabla 2**).

Importancia Comercial

Los cefalópodos, además de ser importantes como organismo de investigación por su desarrollado sistema nervioso y pigmentación tienen un gran valor comercial, siendo el calamar y pulpo los más destacables como fuentes de alimento e ingresos para el mundo principalmente para los países del sudeste asiático, Europa y América del Sur. El Departamento de Pesca y Acuicultura (FAO) reportó aproximadamente 3.8 millones de toneladas métricas de capturas de cefalópodos en el 2017. En México, la pesca total de cefalópodos es de aproximadamente 42 mil toneladas entre pulpo y calamar (CONAPESCA, 2018). El pulpo por su volumen se encuentra posicionado en el lugar 11 de la producción pesquera en México, su captura recae principalmente en dos especies el pulpo rojo (*Octopus maya*) y el pulpo patón (*Octopus vulgaris*), que se encuentran en los litorales del Golfo de México y el Caribe, siendo Yucatán, Campeche y Baja California los principales estados productores del país con 27, 035 mil, 9,460 mil y 819 toneladas, respectivamente. Respecto al calamar, se captura solo un tipo de especie *Dosidicus gigas* que distribuye a lo largo del Océano Pacífico, su producción nacional es de 2,598 toneladas, siendo Sinaloa el principal productor. El calamar, por su volumen, se encuentra posicionado en el lugar 48 de la producción pesquera en México (CONAPESCA, 2017).

En términos generales se ha estimado qué, del total de la producción pesquera, un 64 % se descarta (Torre Cossio, 2017). Partiendo qué del pulpo, la principal región anatómica que se consume son sus tentáculos (OctopusWorlds, 2020) y del calamar es su músculo, aproximadamente 26 mil toneladas de desechos se estarían generando durante el manejo, procesamiento y comercialización de estos organismos. Los cuáles podrían ser aprovechados para la obtención de compuestos bioactivos, como son los pigmentos.

Tabla 2. Estudio de pigmentos en cefalópodos.

| Especie | Pigmentos identificados | Autores |
|----------------------------|---|-----------------------------|
| <i>Loligo pealei</i> | Hidroxantomatina, una forma reducida de xantomatina | Liu y col. (2012) |
| <i>Sepia officinalis</i> | Pigmentos omocromos | Deravi y col. (2014) |
| <i>Doryteuthis pealeii</i> | Xantomatina y xantomatina descarboxilada | Williams y col. (2016) |
| <i>Dosidicus gigas</i> | Xantomatina y dihidroxantomatina | Chan-Higuera y col. (2019b) |

DISOLVENTES Y EXTRACTABILIDAD DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Dentro los factores que influyen en la extracción y la actividad biológica de compuestos provenientes de fuentes naturales está el disolvente empleado (Mohsen-Nia y col., 2010; Hussain y col., 2011; Cruz-Ramírez y col., 2015; Ngo y col., 2017; Fatimah Zahara y Rabeta, 2017). De los disolventes más empleados para extraer compuestos bioactivos de organismos marinos y más específico de cefalópodos están acetona, etanol, hexano y metanol.

En una investigación donde se evaluó la actividad antioxidante de extractos obtenido de la tinta de calamar, utilizando etanol y hexano como disolventes, se concluyó que, aunque los dos disolventes tuvieron la capacidad de extraer compuestos que exhibieron la capacidad para eliminar el radical DPPH y reducir el ion férrico, los extractos obtenidos con etanol presentaron la mayor actividad antioxidante (Fatimah Zaharah y Rabeta, 2017).

Asimismo, en un estudio realizado en extractos crudos de pulpo *Paroctopus limaculatus*, empleando 3 disolventes: metanol, acetona y hexano, se estableció que los extractos hexánicos poseían la mayor actividad antimutagénica y antiproliferativa, mientras que los metanólicos exhibían la mayor capacidad antiradical (Cruz-Ramírez y col., 2015).

Si bien se han obtenidos pigmentos bioactivos de la piel de calamar (Aubourg y col., 2016; Ezquerra-Brauer y col., 2016; Ezquerra-Brauer y col., 2017; Chan-Higuera 2019 a,b,c), en ninguno de esos estudios se ha comparado el impacto que tienen los disolventes empleados hasta ahora, metanol acidificado y etanol acidificado, en la eficacia de la extracción y capacidad antioxidante de los pigmentos obtenidos.

HIPÓTESIS

En este estudio se plantean dos preguntas:

1. ¿Habrá diferencias en la actividad antioxidante de extractos pigmentados de la piel de cefalópodos, empleando metanol acidificado, comparado contra etanol acidificado?
2. ¿Los extractos pigmentados de la piel de pulpo presentarán diferente bioactividad que los de calamar?

Partiendo de esas preguntas se plantearon las siguientes hipótesis del estudio:

1. Los extractos pigmentados de la piel de cefalópodos obtenidos con metanol serán más abundantes que aquellos obtenidos con etanol.
2. Los extractos de pigmentos de la piel del pulpo tienen una capacidad similar de inhibir la oxidación de lípidos y el desarrollo de microorganismos que los extractos de pigmentos de la piel de calamar en hamburguesas de pollo.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante de los pigmentos presentes en la piel de pulpo (*Octopus vulgaris*) y de calamar (*Dosidicus gigas*), extraídos con metanol-HCl y etanol-HCl y determinar la capacidad de los extractos metanólicos para prolongar la vida de anaquel de hamburguesas de pollo almacenadas en refrigeración.

Objetivos Específicos

1. Comparar la actividad antioxidante de extractos pigmentados obtenidos de la piel de *Octopus vulgaris*, contra aquellos provenientes de la piel de *Dosidicus gigas*, extraídos con metanol acidificado y con etanol acidificado.
2. Establecer y comparar la naturaleza química de los extractos metanólicos de la piel de pulpo y calamar.
3. Evaluar y comparar la actividad antimutágena de los extractos pigmentados de la piel de pulpo y calamar obtenidos empleando como disolvente el metanol acidificado.
4. Determinar la potencial aplicación como aditivo de los extractos metanólicos obtenidas de la piel del *O. vulgaris* y de *D. gigas* en la formulación de hamburguesas de pollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

El pulpo (*Octopus vulgaris*) y el calamar (*Dosidicus gigas*) fueron capturados en la Bahía de Kino (Sonora, México 28 ° 49'22 " N 111 ° 56'27 " W), fueron transportados en hielo al Laboratorio de Marinos de la Universidad de Sonora. La piel se retiró manualmente, se liofilizó (LABONCO, Kansas City, MO, EE. UU.) y se almacenó en bolsas de polietileno. El pollo usado para la elaboración de hamburguesas (estudio de vida de anaquel) se obtuvo de un establecimiento local en Hermosillo, México (29 ° 05'44 " N 110 ° 57'03 " W)

Extracción de Pigmentos de Piel de Pulpo y Calamar

La extracción de los pigmentos se llevó a cabo de acuerdo con el método reportado por Chan-Higuera y col. (2019) con modificaciones. Se mezcló 1 g de piel liofilizada en dos tratamientos diferentes: (T1) 20 mL de MeOH-HCl al 1% y (T2) 20 mL de EtOH-HCl al 1%. La mezcla se homogenizó 5 min en vortex y después se sonicó 5 min a temperatura ambiente. La solución se centrifugó (Modelo Biofuge Stratos, Thermo Scientific, Alemania) a 10,000 × g durante 30 min y se recogió el sobrenadante pigmentado. El disolvente se eliminó utilizando un rotavapor (R-100, Büchi, Suiza) y los extractos se concentraron aún más por evaporación en una campana de flujo laminar durante 24 h. Los extractos pigmentados concentrados se liofilizaron (LABONCO, Kansas City, MO, EE. UU.). El rendimiento de los extractos pigmentados se calculó utilizando la ecuación (1)

$$\text{Rendimientos (\%)} = \left[\frac{\text{peso del extracto}}{\text{peso de la piel}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Ensayos de Actividad Antioxidante *in vitro*

Los compuestos antioxidantes son capaces de estabilizar los radicales libres para evitar la oxidación de lípidos. Existen dos mecanismos por los cuales los antioxidantes pueden estabilizar los radicales libres, un mecanismo se basa en la estabilización de los radicales por la donación de un electrón (SET), mientras que el otro por la donación de un átomo de hidrógeno (HAT). Al determinar la actividad antioxidante es necesario más de un ensayo, ya que miden su actividad en los

diferentes mecanismos, en el presente trabajo se utilización los ensayos de DPPH•, ABTS•+ y FRAP.

Ensayo de inhibición del radical catiónico 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•)

El ensayo DPPH se realizó mediante el método de Brand-Williams y col. (1995), el cual cuantifica la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo en la 2,2-difenil-1-picril hidrazina por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos hidroxilos que decoloran el reactivo. El mecanismo que evalúa el ensayo de DPPH es de transferencia de hidrógenos (HAT). Para este ensayo se utilizaron 20 µL de muestra a diferentes concentraciones (2.5, 1.3, 0.75, 0.38, 0.19 mg/mL) y se le añadieron 200 µl de solución DPPH (1.25 mg / 50 mL de metanol). La absorbancia se determinó a los 30 min en una longitud de onda de 515 nm utilizando un espectrofotómetro UV (Thermo Scientific, Multiskan GO). El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calculó utilizando la Ecuación (2).

$$\text{Inhibición radical DPPH \%} = [(A_1 - A_2) / (A_1)] \times 100 \quad (2)$$

donde: A_1 es la absorbancia del control; A_2 es la absorbancia de la muestra.

Ensayo de inhibición del radical catiónico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinal 6-sulfanato) (ABTS•+)

El ensayo ABTS se realizó mediante el método de Re y col. (1999), el cual cuantifica la decoloración del radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinal 6-sulfanato) debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El ensayo ABTS se basa en dos mecanismos, el de transferencia de hidrógenos (HAT) y el de transferencia de electrones (SET). Para este ensayo se preparó una solución del radical ABTS con 19.3 mg de ABTS disuelto en 5 mL de agua. La mezcla se mantuvo a 25 °C en la oscuridad durante 16 h antes de su uso. Se diluyó 1 mL de solución radical ABTS en 88 mL de etanol. En 270 µL de solución de radical ABTS se añadieron 20 µL de muestra a distintas concentraciones (2.5, 1.3, 0.75, 0.38, 0.19 mg/mL). La absorbancia se determinó a los 30 min en una longitud de onda de

734 nm utilizando un espectrofotómetro UV (Thermo Scientific, Multiskan GO). El porcentaje de inhibición del radical ABTS se calculó utilizando la Ecuación (3).

$$\text{Inhibición radical ABTS \%} = [(A_1 - A_2) / (A_1)] \times 100 \quad (3)$$

donde: A_1 es la absorbancia del control; A_2 es la absorbancia de la muestra.

Para los ensayos de DPPH y ABTS la actividad antioxidante, los resultados fueron expresados como la concentración de la muestra requerida para inhibir el 50 % del radical DPPH o ABTS (IC_{50}). El valor de IC_{50} se determinó utilizando una curva elaborada con los valores del % de inhibición contra las diferentes concentraciones empleadas de los pigmentos.

Ensayo FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power)

El ensayo se realizó de acuerdo al método descrito por Benzie y Strain (1999), que mide la reducción de un complejo formado por TPTZ (2, 4, 6- tripiridil-s-triazina), y hierro férrico (Fe^{+3}) incoloro a un complejo ferroso Fe^{+2} de un intenso color azul verdoso en presencia de antioxidantes en un medio ácido. Para este ensayo se preparó un buffer de ácido acético-acetato de sodio (pH 3.4), que contiene TPTZ y cloruro de ($FeCl_3$), en relación 10:1:1. Para la medición de los extractos pigmentados se tomaron 20 μ L de muestra y 280 μ L de solución buffer, se puso en reposo 30 min, se determinó su absorbancia a 638 nm. Se realizó una curva estándar de trolox y los resultados se reportaron en μ mol ET/g muestra.

Partiendo de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante, se decidió continuar con las evaluaciones de antimutagenicidad y de vida de anaquel de la hamburguesa de pollo solamente con los extractos metanólicos (T1).

Caracterización Espectrofotométrica de los Extractos Pigmentados

Para el presente trabajo la caracterización se realizó por medio de técnicas espectroscópicas UV-Visible y resonancia magnética nuclear. Estos métodos se basan en la capacidad de las sustancias de absorber o emitir radiación electromagnética, permitiendo elucidar posibles estructuras (Millán, 2016).

UV-Visible

La espectroscopía UV-Vis se utiliza para la identificación de los grupos funcionales presentes en una molécula y se basa en la luz absorbida por una molécula. La absorción de la radiación de la luz causa la promoción de un electrón a un estado excitado. Los electrones que se excitan al absorber radiación de esta frecuencia son los electrones de enlace de las moléculas, por lo que los picos de absorción se pueden correlacionar con los distintos tipos de enlace presentes en el compuesto. Las bandas anchas que aparecen en un espectro UV-Vis es debido a la superposición grupos (Millán, 2016). Los extractos pigmentados se caracterizaron por espectroscopía UV-visible (Cary 50 UV-VIS, Agilent Technologies) en el rango de longitud de onda de 200-600 nm.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN_{1H})

La técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) se fundamenta en el comportamiento de los núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones en presencia de un campo magnético externo. El campo magnético aplicado produce un desdoblamiento de los niveles de energía del spin nuclear, de modo que pueden inducirse transiciones entre ellos como consecuencia de la radiación electromagnética. La transición entre estos niveles por la absorción de energía por parte de los núcleos atómicos puede ser detectada, amplificada y registrada (señales). En RMN de protón (RMN_{1H}) el área de una señal de resonancia es proporcional al número de núcleos que producen esa señal, lo que permite su integración. Además, no todas las líneas espectrales son simples, sino que, como resultado de acoplamientos entre espines nucleares de núcleos vecinos se producen desdoblamientos de señales, separados por una frecuencia característica o constante de acoplamiento (Sanders y Hunter, 1988).

La muestra se preparó con 1 mg de los extractos pigmentados y se disolvieron en óxido de deuterio (D_2O) acidificado con cloruro de deuterio (DCI). El espectro de RMN_{1H} se obtuvo en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Avance 400 que funciona a 400 MHz. Para la asignación de las señales se apoyó en espectros de 2D, utilizando espectroscopía de correlaciones (COSY).

Prueba de Antimugenicidad

El ensayo de Ames evalúa el potencial mutagénico de los compuestos químicos que se estén estudiando. La prueba utiliza cepas de *Salmonella typhimurium* alteradas genéticamente, las cuales tienen mutaciones en los genes implicados en la síntesis de histidina. A causa de estas mutaciones, la bacteria requiere de un suministro externo de histidina para su crecimiento. El ensayo pone a prueba la capacidad del compuesto químico para provocar una alteración genética en *S. typhimurium* y que sea capaz de crecer sin la fuente histidina externa (Levy y col., 2019).

La prueba de antimugenicidad se realizó de acuerdo con el ensayo de mutagenicidad descrito por Maron y Ames (1983). El ensayo se realizó usando 100 µL de cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 cultivadas durante 12 h (1 x 10⁹ células/mL), 100 µL de los extractos pigmentados (0.002, 0.02, 0.2 y 2.0 mg/mL) y el agente mutagénico aflatoxina B₁ (AFB₁) con sistema de activación (500 µL de mezcla S9) en placas de agar mínimamente glucosado, por triplicado. Se usó DMSO (100 µL) sin AFB₁ como control negativo. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C y se contaron las colonias de bacterias revertantes por placa. El porcentaje inhibición de la actividad mutagénica se calculó utilizando la ecuación (4).

$$\text{Inhibición (\%)} = [(1 - (M - R)) / (A - M)] \times 100 \quad (4)$$

donde: *M* es el número de revertantes por placa de muestra de prueba; *R* es el número de revertantes espontáneas por placa en el control negativo; *A* es el número de revertantes por placa en el control positivo, después de restar el número de revertantes espontáneos del numerador y denominador.

Estudio de Vida de Anaquel de una Hamburguesa de Pollo

La vida de anaquel es una herramienta que se utiliza para conocer el tiempo que un alimento conservará sus atributos de calidad y seguridad alimentaria. Durante la vida de anaquel se miden parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y evaluaciones organolépticas. Para este trabajo la determinación de vida de anaquel

se llevó a cabo con un análisis microbiológico, oxidación de lípidos, medición de pH y un análisis sensorial.

Preparación de la Hamburguesa de Pollo

Se utilizaron seis tratamientos diferentes para la formulación de las hamburguesas (**Tabla 3**), sin embargo, la elaboración de todas fue la misma y se describe a continuación.

Las hamburguesas de pollo se prepararon utilizando carne de pollo molida, la cual se mezcló con sal (2 %), almidón (1 %) y diferentes concentraciones (0.05 y 0.1 %) de cada extracto pigmentado (PPT1 y PCT1). Las hamburguesas fueron moldeadas de forma circular de aproximadamente 10 g, 3 cm de diámetro y 1 cm de espesor. Se usaron hamburguesas sin extractos pigmentados y otras con α -tocoferol como controles. Para asignar el contenido de α -tocoferol se consideró la NOM-213-SSA1-2018. Se empaquetaron en porciones de 6 hamburguesas en bolsas selladas de polietileno, las cuales fueron almacenadas a 5 ± 1 °C y se hicieron muestreos en los días 0, 2, 4, 7 y 9.

Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico de las hamburguesas de pollo se realizó por cuenta en placa de bacterias, levaduras y hongos en los días 0, 7 y 9 de almacenamiento. Se utilizaron tres medios selectivos para bacterias y uno selectivo para hongos y levaduras (**Tabla 4**). Para la cuenta en placa todos los medios se prepararon según las instrucciones para cada medio y se almacenaron en refrigeración. La preparación de las muestras se realizó según la NOM-110-SSA1-1994, se pesaron 10 gr de la muestra, se licuó con 90 mL de peptona y después se procedió hacer cinco diluciones seriadas 1:10. De las diluciones preparadas se tomaron 100 μ L los cuales se distribuyeron en las placas con la ayuda de una espátula Drigalsky. Las bacterias se incubaron durante 48 h a 35 ± 2 °C (NOM-092-SSA1-1994), mientras que las levaduras y hongos se incubaron durante 5 días a 25 ± 2 °C (NOM-111-SSA1-1994). En todos los casos, la cuenta microbiana se transformó en \log_{10} UFC/g de muestra antes de realizar los análisis estadísticos. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Tabla 3. Formulaciones hamburguesas de pollo adicionadas con α -tocoferol y los extractos pigmentados de pulpo (PPT1) y de calamar (PCT1).

| Tratamiento | Pollo (%) | Sal (%) | Almidón (%) | α-tocoferol (%) | PPT1 (%) | PCT1 (%) |
|--------------------|------------------|----------------|--------------------|--|-----------------|-----------------|
| Sin antioxidante | 97 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Con antioxidante | 96.97 | 2 | 1 | 0.03 | 0 | 0 |
| PPT1 0.05 % | 96.95 | 2 | 1 | 0 | 0.05 | 0 |
| PPT1 0.1 % | 96.9 | 2 | 1 | 0 | 0.10 | 0 |
| PCT1 0.05 % | 96.95 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0.05 |
| PCT1 0.1 % | 96.9 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0.10 |

Tabla 4. Medios utilizados para el análisis microbiológico.

| Nombre del medio | Microorganismo selectivo |
|--|--|
| Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) | <i>Lactobacilos</i> y bacterias ácido lácticas |
| Agar Baird-Parker | <i>Estafilococos</i> |
| Agar Bilis Glucosa con cristal violeta y rojo neutro | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| Agar dicloran rosa de bengala | Hongos y levaduras |

Análisis Oxidación de Lípidos

La oxidación de lípidos es uno de los principales causantes del deterioro en los alimentos, por ende, es importante su determinación durante la vida de anaquel. El grado de oxidación puede conocerse por los diferentes metabolitos que se producen durante tres etapas de la autooxidación. Se considera importante identificar los productos de las primeras etapas como los ácidos grasos libres y los radicales peróxidos, sin embargo, los productos de última etapa como los aldehídos y cetonas también son importantes, ya que, son los responsables del mal olor y sabor en los alimentos, además las tres etapas ocurren simultáneamente (Ladikos y Lougovois, 1990). Para este trabajo se evaluaron los valores de peróxidos para determinar el grado de la segunda etapa y el valor de anisidina para la tercera etapa.

Valor de peróxidos. Durante las primeras etapas de la oxidación de los lípidos se producen los radicales peróxidos debido a la interacción de lípidos con el oxígeno, indicando el inicio del deterioro. Para la determinación de la presencia de los peróxidos se utilizó el método descrito por la ISO 3960, para el cual se pesó entre 1 y 4 gr de muestra, se le agregaron 10 mL de cloroformo y se agitó durante 1 minuto, después se agregaron 15 mL de ácido acético, seguido de 1 mL de solución de yoduro de potasio saturada, se agitó durante 1 minuto; después se reposó 1 minuto en oscuridad, se agregaron 75 mL agua y finalmente se tituló utilizando tiosulfato de sodio 0.002 M como titulante y almidón soluble (1%) como indicador, se observa un cambio de color de azul a incoloro. Se corrió un blanco solo reactivos sin muestras. El valor de los peróxidos se calculó utilizando la Ecuación (5).

$$\text{Valor de peróxido} = \frac{(V-V_0)T}{M} \times 10^3 \text{ mEq/kg} \quad (5)$$

donde: V es el volumen gastado de titulación por muestra (mL); V_0 es el volumen gastado de titulación por blanco (mL); T es la molaridad exacta (0,002 M); M es el peso de la muestra (g).

Valor de anisidina. Durante la tercera etapa de la oxidación de los lípidos se producen compuestos estables como los aldehídos y cetonas. Para la determinación de la presencia de los compuestos aldehídos se utilizó el método

descrito por IAFFM (1981), para el cual se pesaron entre 0.5 y 4 gr de muestra, se disolvieron en 25 mL de iso-octano, se midió la absorbancia a 350 nm (solución grasa), se utilizó como blanco solo solvente para referencia. En un tubo se tomaron 5 mL de la solución grasa, se le agregó 1 mL de *p*-anisidina, se agitó durante 1 minuto y seguido de un reposo por 10 minutos se midió la absorbancia después de la reacción, utilizándose como blanco solo los reactivos sin muestra para referencia. El valor de *p*-anisidina se calculó utilizando la Ecuación 6.

$$\text{Valor de Anisidina} = \frac{25 \times (1.2A_s - A_b)}{M} \quad (6)$$

donde: A_s es la absorbancia de la solución grasa después de la reacción en el reactivo de *p*-anisidina; A_b es la absorbancia de la solución grasa; M es el peso de la muestra (g).

Análisis Sensorial

Durante el almacenamiento las características organolépticas cambian produciendo el rechazo del alimento por el consumido, para el estudio de la vida de anaquel es importante darse un seguimiento a la calidad sensorial del producto. La calidad sensorial de las hamburguesas de pollo con diferentes tratamientos se evaluó durante los días 0, 2, 4, 7 y 9 de almacenamiento, con 5 panelistas semi-entrenados. Tal entrenamiento consistió en la explicación detallada de las características de cada uno de los atributos a evaluar, se utilizaron imágenes de referencia como apoyo. El análisis se realizó con una escala hedónica de 5 puntos nombradas E, A, B, C y D, donde la puntuación más alta (E) significa la mejor calidad y siendo C para cualquier descriptor el punto de rechazo en el cual la hamburguesa ya no es comestible. Los descriptores sensoriales de la hamburguesa fueron olor, color y lama (**Tabla 5**).

Tabla 5. Escala empleada en la evaluación de calidad sensorial aplicada a la hamburguesa de pollo

| Atributo descriptor | Excelente (E) | Bueno (A) | Justo (B) | Malo (C) | Inaceptable (D) |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|--|---|
| Olor | Olor débil a pollo | Olor moderado a pollo | Olor fuerte a pollo | Olor débil pútrido y amoniacado | Olor pútrido y amoniacado |
| Color | Coloración atractiva y brillante | Coloración atractiva sin brillo | Coloración opaca | Coloración opaca, áreas pequeñas gris | Coloración opaca y gris |
| Lama | Ausencia completa de lama | Gotas de lama transparente | Lama o moho transparente en toda la hamburguesa | Mucílago entre gris-blanco alrededor de la hamburguesa | Mucílago entre gris-blanco en toda la hamburguesa |

Adaptado de Chan-Higuera y col. (2019a)

Análisis Estadístico

Para el estudio de actividad antioxidante se aplicó un diseño completamente al azar de dos vías, siendo los factores: la especie de cefalópodo (dos niveles, *Octopus vulgaris* y *Dosidicus gigas*) y el disolvente de extracción (dos niveles, MeOH-HCl 1% y EtOH-HCl1%). Los datos obtenidos de la prueba de Ames y microbiológicos se analizaron mediante la prueba de ANOVA para establecer las diferencias por efecto de la adición de los extractos pigmentados. La oxidación de lípidos de las muestras de pollo fue evaluada a través de una ANOVA de dos vías. Todos los ensayos se realizaron mínimo por triplicado y se reportan como el promedio \pm la desviación estándar. La comparación de medias se realizó aplicando la prueba de rangos múltiples de Tukey ($\alpha < 0.05$). Para lo análisis UV-VIS y RMN- ^1H se aplicó estadística descriptiva y para el análisis sensorial se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, comparando los tratamientos en cada tiempo y a lo largo del tiempo para las tres variables (olor, color y lama). El paquete estadístico empleado fue el JMP (SAS, Cary, NC, USA). Las diferencias entre los tratamientos se consideraron significativas utilizando una alfa de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de Extracción y Actividad Antioxidante

Se analizaron las características físicas y el comportamiento de solubilidad de los extractos obtenidos. El color rojizo sugiere la presencia de compuestos omocromos en los pigmentos obtenidos de la piel de cefalópodos (Deravi y col., 2014). La naturaleza de los extractos metanólicos y etanólicos se determinó mediante una prueba de solubilidad utilizando diferentes solventes (Kiyomoto y col., 1969). Todos los extractos fueron insolubles en acetona, éter etílico o cloroformo, pero solubles en 77 % de H₂SO₄; por lo tanto, se descartó la presencia de carotenoides y melaninas. En contraste, la alta solubilidad en metanol-HCl al 1 % lleva a la suposición de que los principales compuestos presentes en los extractos pigmentados obtenidos pueden pertenecer al grupo omocromos (Van den Branden y Declair, 1976).

Los resultados que se muestran en la **Tabla 6** indicaron que se logró un alto rendimiento de recuperación y una alta actividad antioxidante cuando se usó metanol-HCl (T1) como disolvente de extracción y cuando se empleó la piel de *Octopus vulgaris* como fuente ($p < 0.05$). Los valores de rendimiento obtenidos en este estudio fueron inferiores a los reportados anteriormente (Chan-Higuera y col., 2019a). Las diferencias en recuperación de pigmentos podría ser atribuido a las variaciones intrínsecas dentro de las especies, edad, época de captura, entre otros, que pueden explicar las diferencias en el contenido de compuestos químicos en cefalópodos (Zumholz, 2005; Özyurt y col., 2006).

Con respecto a la actividad antioxidante, los resultados indicaron que los extractos obtenidos tienen la capacidad de realizar transferencia de electrones individuales (SET) y transferencia de átomos de hidrógeno (HAT). La capacidad antioxidante de algunos compuestos naturales mediante el ensayo DPPH y ABTS en extractos de subproductos del camarón varió de 1.43 a 7.94 mg/mL (Kim y col., 2014) y en extractos de omocromo de *Dosidicus gigas* de 2.6 a 10.2 mg/mL (Chan-Higuera y col., 2019c), en la melanina de *Loligo formosana* (Vate y Benjakul, 2013) se detectó un valor de FRAP de 171 mmol ET/g.

Tabla 6. Rendimiento de extracción y actividad antioxidante de pigmentos de piel de pulpo y calamar extraídos con dos solventes (metanol– HCl, T1 y etanol – HCl, T2)¹

| Determinación | Pulpo | | Calamar | |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | T1 | T2 | T1 | T2 |
| Rendimiento (g/100g) | 206 ± 7 ^{Aa+} | 104 ± 7 ^{Ab+} | 111 ± 5 ^{Ba+} | 72 ± 5 ^{Bb+} |
| IC₅₀ DPPH (mg/mL) | 0.48±0.04 ^{Bb+} | 1.24±0.03 ^{Ba+} | 1.14±0.02 ^{Ab+} | 1.74±0.04 ^{Aa+} |
| IC₅₀ ABTS (mg/mL) | 0.52±0.01 ^{Bb+} | 0.99±0.04 ^{Ba+} | 1.11±0.02 ^{Aa+} | 1.01±0.02 ^{Ab+} |
| FRAP (μmol ET/g) | 304±32 ^{Aa+} | 124±13 ^{Bb+} | 185±42 ^{Ba+} | 145±27 ^{Ab+} |

¹Los valores representan la media ± desviación estándar de cuatro réplicas. Las letras mayúsculas indican diferencias debido al efecto de la fuente de extracción ($p < 0.05$). Las letras minúsculas denotan diferencias debido a un efecto de tratamiento ($p < 0.05$). Los signos positivos indican diferencias debido al efecto de la interacción del factor ($p < 0.05$).

Con base en lo anterior se establece que los extractos pigmentados obtenidos, presentan una actividad antioxidante efectiva, principalmente la de los extractos metanólicos.

Las diferencias detectadas entre las especies pueden atribuirse a las condiciones de vida y comportamientos específicos de cada organismo. Los pulpos son altamente sedentarios, mientras que los calamares son muy activos, lo que puede afectar la composición química de sus tejidos (Morales y col., 2000). Con respecto a los solventes, el metanol es uno de los disolventes más empleados durante los procesos de extracción debido a que es muy eficiente (Hussain y col, 2011) y las diferencias entre el metanol y el etanol se atribuyen a que el primero tiene una mayor constante dieléctrica y polaridad que el segundo (Mohsen-Nia y col., 2010). La metodología utilizada para preparar extractos de fuentes naturales es el factor clave que afecta la actividad antioxidante de dichos extractos, ya que puede inducir la deslocalización electrónica de las moléculas extraídas (Hussain et al., 2011). La capacidad antioxidante de los principales pigmentos reportados en la piel del calamar, los omocromos, se asoció con las aminas primarias y secundarias presentes en los anillos aromáticos (Chan-Higuera et al., 2019c), los resultados obtenidos sugieren que las moléculas obtenidas con T1 pueden poseer omocromos más reducidos que los de T2, presentando a su vez una mejor capacidad antioxidante. Sin embargo, serían necesarios más estudios para confirmar esto.

Análisis Espectrofotométrico

UV-Visible

Para confirmar la presencia de omocromos en los extractos de la piel del pulpo y del calamar, se obtuvieron los espectros de absorbancia usando espectrofotometría UV-Visible (**Figura 5**). Los espectros UV-Visibles de los cuatro extractos obtenidos fueron similares; todos mostraron dos picos: 266 nm (pico principal) y 518 nm (banda ancha 428–630 nm). Los espectros fueron similares a los reportados para el grupo omatinas de los compuestos omocrómicos (Sawada y col., 2000). Mientras tanto, las bandas anchas (360–650 nm) se atribuyen a una combinación de diferentes compuestos omocrómicos (Liu y col., 2012; Francikowski y col., 2019).

Se ha reportado, que los principales picos de absorbancia que presentan los omocromos pueden variar ligeramente; sin embargo, en términos generales los rangos para xantomomatina y dihidroxantomomatina se han identificado principalmente en la región del UV, cercano a UV y entre los 430–520 nm (Sun Wada y col. 2000 ; Riou y Christides , 2010 ; Figon y Casas, 2019). Así mismo, se ha reportado que la quinurenina puede presentar absorbancias entre los 248–363 nm (Romero y Martínez, 2015). Por lo tanto, los espectros obtenidos sugieren que, en los pigmentos obtenidos, están presentes compuestos omocromáticos, principalmente quinurenina, dihidroxantomomatina y xantomomatina.

Resonancia Magnética Nuclear ^1H

Se emplearon análisis de espectroscopía de RMN ^1H para proporcionar información sobre la composición química y la conformación de los pigmentos obtenidos. Los espectros de NMR ^1H de los extractos pigmentados (**Figura 6**) se compararon con trabajos previos y bases de datos espectrales.

Las señales detectadas para cada pigmento obtenido fueron similares; sin embargo, la intensidad de algunos picos varió. La porción de espectros entre $\delta = 9.0$ y 6.5 ppm está asociada con protones aromáticos y protones del grupo amino. Los cambios químicos de $\delta = 5.0$ a 3.0 ppm indicaron grupos de aminas aromáticas. Las señales observadas en $\delta = 3.0 - 2.0$ ppm indicaron protones unidos a compuestos de carbonilo y nitrógeno. La última sección ($\delta = 2.0 - 0.5$ ppm) indicó compuestos alifáticos. Al hacer coincidir la porción de espectro de $\delta = 9.0 - 6.5$ ppm con las bases de datos espectrales de compuestos orgánicos (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), se identificaron en los extractos la presencia de quinurenina, dihidroxantomomatina y xantomomatina (**Figura 6E**).

Al calcular las integrales de las señales detectadas en la región $\delta = 9.0$ y 6.5 ppm, se obtuvo la relación entre quinurenina, xantomomatina y dihidroxantomomatina en cada uno de los extractos estudiados.

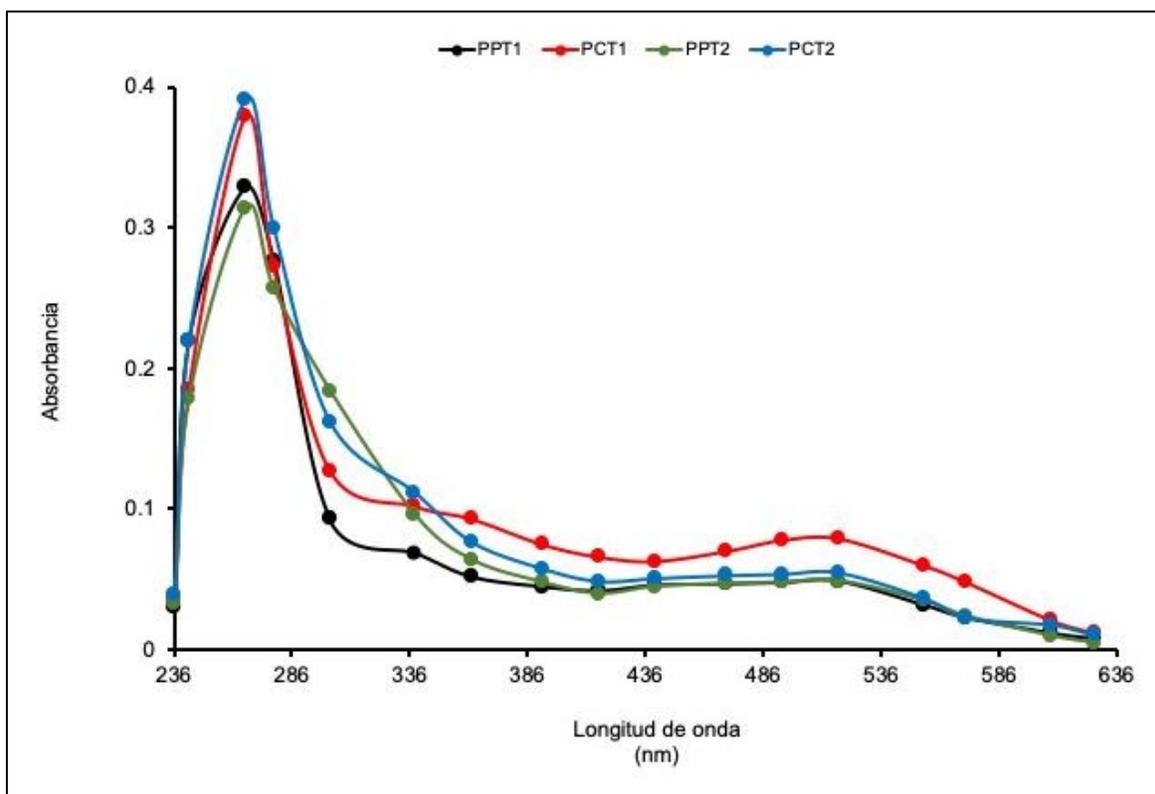


Figura 5. Espectro de absorción de UV-Vis de los extractos pigmentados de la piel de pulpo (PP) y calamar (PC), obtenidos con metanol-HCl (T1) y etanol-HCl (T2).

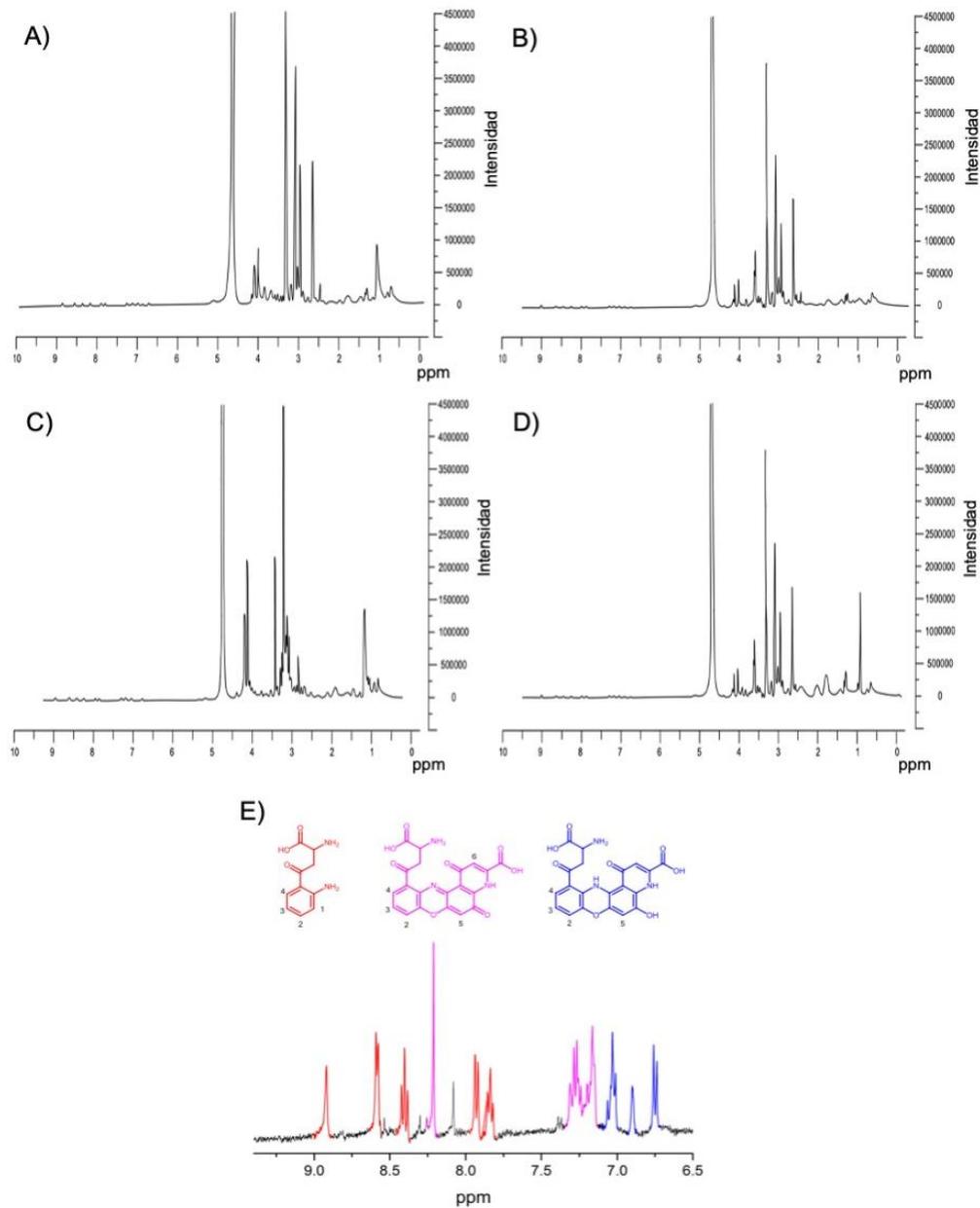


Figura 6. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H del extracto pigmentados A) PPT1, B) PPT2, C) PCT1, D) PCT2, E) Porción de espectro vinculada a quinurenina, dihidroxantomatina y xantomomatina

PPT1: Extracto de piel de pulpo, tratamiento metanol acidificado

PCT1: Extracto de piel de calamar, tratamiento metanol acidificado

PPT2: Extracto de piel de pulpo, tratamiento etanol acidificado

PCT2: Extracto de piel de calamar, tratamiento etanol acidificado

Aunque no se obtuvieron diferencias en las proporciones de los dos principales omocromos antioxidantes identificados hasta ahora, xantomatina y dihidroxantomatina (Chan- Higuera y col., 2019b), se detectó una mayor proporción de quinurenina, que se ha reportado como un eficaz donante de electrones (Romero y Martínez, 2015) y una menor proporción en los grupos de aminas aromáticas (δ 5.0–3.0 ppm) en los extractos pigmentados de piel de calamar en comparación con aquellos del pulpo. Si bien, esta última observación no se puede utilizar como una cuantificación absoluta de los compuestos, permite establecer estimaciones relativas sobre la composición estructural de los pigmentos. Aunque se necesitan más estudios, las diferencias detectadas en los grupos de quinurenina y aminoácidos aromáticos sugieren que los pigmentos con la mayor proporción de quinurenina y la menor proporción de grupos aromáticos podrían estar relacionados con una menor actividad antioxidante, pero con mayores propiedades antimutagénicas. Los datos de animutagenicidad se discuten a continuación.

Prueba de Antimutagenicidad

A la fecha no se tienen reportes donde se haya comparado la actividad antimutagénica entre los pigmentos PPT1 y PCT1. La actividad antimutagénica de los pigmentos obtenidos evaluada en ambas cepas mutantes de *S. typhimurium* (TA98 y TA100), aumentó conforme se incrementó la concentración de los extractos (**Tabla 7**). En ambas cepas, los pigmentos de piel de calamar exhibieron la mayor actividad, mientras que en TA100, la inhibición se consideró moderada (40 – 60 %) a la concentración más baja probada (0.002 mg / placa) y fuerte (> 60 %) a 0.02 mg /placa. En TA98 la inhibición fue moderada cuando se probaron 0.2 mg/ placa. Mientras que los pigmentos PPT1 mostraron una inhibición considerada efectiva en TA100 con 0.02 mg/placa y en TA98 con 2 mg/ placa.

Tabla 7. Efecto de la piel de pulpo y pigmentos de piel de calamar extraídos con metanol-HCl sobre la mutagenicidad inducida por AFB₁, basado en el ensayo de Ames usando *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, con activación metabólica (S9).

| | Muestra | Concentración (mg/placa) | Revertantes /placa | % Inhibición | |
|--------------|----------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|--|
| TA98 | Pulpo | 0.002 | 2710 ± 54 ^a | 0.5 | |
| | | 0.02 | 2194 ± 4 ^c | 19.7 | |
| | | 0.2 | 2159 ± 2 ^d | 21.0 | |
| | | 2.0 | 883 ± 3 ^h | 68.5 | |
| | Calamar | 0.002 | 2412 ± 3 ^b | 11.6 | |
| | | 0.02 | 1429 ± 1 ^e | 48.2 | |
| | | 0.2 | 1295 ± 5 ^f | 54.4 | |
| | | 2.0 | 1128 ± 4 ^g | 59.4 | |
| | | Control negativo | | 39 ± 3 | |
| | | AFB₁ | | 2724 ± 28 | |
| TA100 | Pulpo | 0.002 | 3273 ± 45 ^a | 0.25 | |
| | | 0.02 | 2841 ± 4 ^b | 14.2 | |
| | | 0.2 | 1513 ± 2 ^d | 57.2 | |
| | | 2.0 | 855 ± 3 ^f | 78.5 | |
| | Calamar | 0.002 | 1698 ± 6 ^c | 51.2 | |
| | | 0.02 | 1247 ± 8 ^e | 65.8 | |
| | | 0.2 | 664 ± 9 ^g | 84.7 | |
| | | 2.0 | 577 ± 13 ^h | 87.5 | |
| | | Control negativo | | 192. ± 9 | |
| | | AFB₁ | | 3281 ± 6 | |

*Los resultados se representan como porcentaje de inhibición de mutaciones AFB₁ (500 ng). Los datos presentados son la media ± desviación estándar de tres réplicas. Los valores medios seguidos de letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las determinaciones y las muestras.

Dado que el mecanismo mutagénico en AFB₁ está mediado por la producción de radicales libres, lo que puede conducir a la alteración de los cromosomas (Alpsoy y col., 2009), las moléculas antioxidantes como la xantomatina y la dihidroxantomatina también podrían funcionar como antimutagénicas al prevenir la formación de radicales (Chan-Higuera y col., 2019c) y la mutación de *S. thyphimurium* por AFB₁. Este resultado sugiere que los compuestos químicos presentes en la piel de pulpo y calamar podrían actuar como agentes antioxidante y antimutagénicos en sistemas biológicos. Sin embargo, serían necesarios más estudios para corroborar estos hallazgos.

Análisis Vida de Anaquel

Durante el estudio de vida de anaquel de las hamburguesas de pollo, a las cuales se les adicionaron los extractos pigmentos y el α -tocoferol, no se observó efecto de la interacción del tratamiento y los días en almacenamiento sobre los parámetros evaluados, siendo así presentados los efectos independientes de los tratamientos sobre el pH, el desarrollo de microorganismo, oxidación de las grasas y análisis sensorial.

Determinación del pH

Los valores de pH de las hamburguesas de pollo formuladas con las diferentes concentraciones de PPT1 y PCP1, así como con α -tocoferol y el tratamiento control, y almacenadas por 9 días a 4 °C se muestran en la **Tabla 8**. Si bien la materia prima se compró en el mismo establecimiento comercial y de la misma casa comercializadora se observan diferencias al inicio de los ensayos en cuanto a los valores de pH. En el experimento donde se trabajó con el extracto de pulpo, el rango de pH de las hamburguesas fue de 6.12 a 6.18, mientras que en aquel donde se evaluaron los extractos de calamar fue menor (5.91 a 6.10). Las variaciones en pH en el pollo se atribuyen a diversos factores tanto intrínsecos como extrínsecos, como la época del año, el estrés previo al sacrificio o el tiempo mantenido en frío previo a su comercialización (Soler Sanchis y col., 2011). Sin embargo, los valores iniciales en todos los casos son similares a los reportados por otros autores como normales para hamburguesas de pollo (de Lima Santos y col., 2019).

Tabla 8. Valores pH en hamburguesas de pollo a 4°C¹

| Tiempo (día) | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesas con PPT1 0.05 | Hamburguesas con PPT1 0.10 |
|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 0 | 6.18 ± 0.02 ^h | 6.16 ± 0.02 ^h | 6.14 ± 0.01 ^{hi} | 6.12 ± 0.02 ^{hi} |
| 2 | 6.24 ± 0.03 ^g | 6.27 ± 0.01 ^g | 6.20 ± 0.02 ^h | 6.25 ± 0.01 ^g |
| 4 | 6.38 ± 0.03 ^e | 6.34 ± 0.01 ^{ef} | 6.34 ± 0.02 ^{ef} | 6.31 ± 0.01 ^f |
| 7 | 6.55 ± 0.02 ^d | 6.43 ± 0.03 ^e | 6.39 ± 0.01 ^f | 6.55 ± 0.01 ^d |
| 9 | 6.86 ± 0.01 ^a | 6.68 ± 0.01 ^b | 6.51 ± 0.01 ^d | 6.70 ± 0.02 ^b |
| | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesas con PPT1 0.05 | Hamburguesas con PPT1 0.10 |
| 0 | 5.91 ± 0.03 ^k | 5.98 ± 0.01 ^k | 6.02 ± 0.02 ^k | 6.10 ± 0.02 ^j |
| 2 | 6.03 ± 0.06 ^a | 6.00 ± 0.01 ^a | 6.09 ± 0.01 ^j | 6.13 ± 0.03 ⁱ |
| 4 | 6.04 ± 0.02 ^a | 6.11 ± 0.01 ^{ij} | 6.18 ± 0.02 ^h | 6.19 ± 0.01 ^h |
| 7 | 6.32 ± 0.01 ^{ef} | 6.33 ± 0.02 ^{ef} | 6.30 ± 0.01 ^f | 6.58 ± 0.05 ^d |
| 9 | 6.72 ± 0.08 ^b | 6.62 ± 0.03 ^c | 6.36 ± 0.01 ^e | 6.62 ± 0.02 ^c |

¹Los valores representan la media ± desviación estándar de tres réplicas. Diferentes letras indican diferencias por efecto de la condición de almacenamiento a 4 °C ($p < 0.05$). La formulación de las hamburguesas es indicada en la Tabla 3.

En ambos ensayos, al final del periodo de almacenamiento los grupos control sin antioxidante mostraron los valores más altos de pH ($p < 0.05$).

El incremento en pH detectado en todos los productos durante el periodo de almacenamiento se puede relacionar con el desarrollo de bacterias Gram negativas (Verma y Sahoo, 2000), tal como se observó en este trabajo y que más adelante se discutirá. Las bacterias Gram negativas provocan la desnaturalización de las proteínas hasta la producción de amonio, induciendo este metabolito el incremento en el pH (Verma y Sahoo, 2000).

En términos generales se establece que aquellos productos con valores de pH más altos, superiores al 6.5 en el caso del pollo, indicarían que ya estarían entrando a un estado de deterioro por acción de las bacterias (FAO, 2001), por lo que los grupos control, PPT1 y PCT1 al 0.10 % a partir del día 7 de almacenamiento se encontraban en etapa de deterioro. Las unidades de variación de menor a mayor fueron: PCT1 0.05 % < PPT1 0.05 % < PCT1 0.1 % < PCT1 0.05 % < α -tocoferol = PPT1 0.10 % < control sin aditivos.

Partiendo de las unidades de variación del pH y considerando este valor de pH como un indicador de deterioro de la carne, se podría establecer que la inclusión de los extractos pigmentados (tanto del pulpo como del calamar al 0.05 %) en la hamburguesa, tuvo un efecto benéfico sobre el producto.

Análisis Microbiológico

Lactobacillus spp. se han asociado con la alteración de la carne de pollo cuando se mantiene en refrigeración, el *Staphylococcus aureus* y aquellas bacterias pertenecientes al grupo de las *Enterobacteriaceae*, pueden causar intoxicación al consumidor. Por otra parte, el conteo de hongos y levaduras se ha establecido como un indicador de la calidad sanitaria de productos procesados (NOM-092-SSA1-1994; NOM-111-SSA1-1994). Por lo anterior, en este trabajo fueron seleccionados estos microorganismos como indicadores de calidad.

En ninguna de las hamburguesas en este experimento se detectó el desarrollo de *S. aureus*, lo que indica que se trabajó bajo condiciones higiénicas durante su producción. En cuanto a la evolución de los otros microorganismos, tanto los *Lactobacillus* como las *Enterobacteriaceae* (**Tablas 9 y 10, respectivamente**),

mostraron un incremento progresivo durante el periodo de almacenamiento ($r_2 = 0.75 - 0.96$). Al analizar el desarrollo de hongo y levaduras (**Tabla 11**) el incremento progresivo sólo se observó en el grupo control ($r_2 = 0.96$). Es importante notar que en todos los casos el total de colonias fue mucho menor a 250 UFC/g (NOM-213-SSA1-1994), por lo tanto, desde el punto de vista microbiológicos los productos eran adecuados para el consumidor.

Si bien el crecimiento de *Lactobacillus* no alcanzó valores que pudiesen inducir olores o sabores ácidos en las hamburguesas de pollo, la inclusión de los pigmentos al 0.05 % ejerció un mejor control en el desarrollo de estas bacterias al compararse con los otros tratamientos ($p < 0.05$). El comportamiento anterior sugiere que ambos extractos, a un porcentaje de 0.05, retardan de forma similar el crecimiento de *Lactobacillus*.

La familia *Enterobacteriaceae* comprende muchos géneros (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Yersenia*, *Serratia*) que resultan patógenos para el ser humano. El efecto de los pigmentos en cuanto al control de este grupo de bacterias, fue similar al de *Lactobacillus*. En aquellos tratamiento formulados con PPT1 0.05 % se detectó un menor crecimiento de estas bacterias ($p < 0.05$) pero solo contra el grupo que no contenía aditivos. Mientras que la inclusión de PCT1 al 0.05 % en la hamburguesa indujo un mayor control ($p < 0.05$) sobre el desarrollo de éstas bacterias comparado con los otros tratamientos. Por lo tanto, dependiendo de la fuente de los extractos será su acción frente las bacterias entéricas. Lo cual se puede relacionar con el tipo de compuestos químicos presentes en cada extracto, como se mencionó anteriormente.

La investigación en torno al grupo de hongos indicó que hubo un mayor desarrollo de levaduras que de hongos filamentosos y que crecieron más lento que las bacterias. Este comportamiento es el esperado en alimentos con alta humedad y mantenidos a bajas temperaturas (Romain y col., 2013).

Tabla 9. Recuento de *Lactobacillus spp.* (\log_{10} UFC/ g) en hamburguesas de pollo almacenadas a 4 °C¹

| Día | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesa con PPT1 0.05 | Hamburguesa PPT1 0.10 |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 0 | 4.17 ± 0.01 _i | 4.36 ± 0.10 _i | 4.18 ± 0.07 _i | 4.15 ± 0.05 _i |
| 7 | 5.43 ± 0.05 _d | 5.52 ± 0.02 _c | 5.24 ± 0.06 _f | 5.42 ± 0.05 _d |
| 9 | 5.52 ± 0.02 _c | 5.52 ± 0.02 _c | 5.30 ± 0.02 _e | 5.42 ± 0.05 _d |
| | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesa con PPT1 0.05 | Hamburguesa PPT1 0.10 |
| 0 | 5.04 ± 0.02 _h | 4.94 ± 0.06 _h | 5.01 ± 0.03 _h | 4.99 ± 0.01 _h |
| 7 | 5.51 ± 0.28 _c | 5.16 ± 0.12 _g | 5.11 ± 0.14 _g | 5.27 ± 0.01 _f |
| 9 | 6.11 ± 0.36 _a | 5.68 ± 0.10 _{ab} | 5.59 ± 0.17 _{bc} | 5.76 ± 0.07 _{ab} |

¹Los valores representan la media ± desviación estándar de tres réplicas. Diferentes letras indican diferencias por efecto de la condición de almacenamiento a 4 °C ($p < 0.05$). La formulación de las hamburguesas es indicada en la Tabla 3.

Tabla 10. Recuento de *Enterobacteriaceae* (\log_{10} UFC/ g) en hamburguesas de pollo almacenadas a 4 °C¹.

| día | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesa con PPT1 0.05 | Hamburguesa con PPT1 0.10 |
|------------|---|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 3.78 ± 0.01 _k | 3.84 ± 0.01 _j | 3.38 ± 0.02 _l | 3.01 ± 0.06 _m |
| 7 | 4.41 ± 0.06 _h | 3.98 ± 0.07 _i | 4.10 ± 0.17 _i | 4.18 ± 0.76 _i |
| 9 | 5.15 ± 0.08 _f | 4.65 ± 0.56 _h | 4.59 ± 0.07 _h | 4.59 ± 0.07 _h |
| | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesa con PPT1 0.05 | Hamburguesa con PPT1 0.10 |
| 0 | 4.94 ± 0.01 _g | 4.98 ± 0.02 _g | 4.43 ± 0.1 _h | 5.16 ± 0.06 _f |
| 7 | 6.05 ± 0.01 _d | 5.94 ± 0.04 _d | 4.67 ± 0.04 _h | 5.91 ± 0.03 _d |
| 9 | 6.45 ± 0.01 _a | 6.33 ± 0.01 _b | 5.75 ± 0.05 _e | 6.28 ± 0.01 _c |

¹Los valores representan la media ± desviación estándar de tres réplicas. Diferentes letras indican diferencias por efecto de la condición de almacenamiento a 4 °C ($p < 0.05$). La formulación de las hamburguesas es indicada en la Tabla 3.

Tabla 11. Recuento de levaduras y hongos (\log_{10} UFC/ g) en hamburguesas pollo almacenadas a 4°C¹.

| día | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesa con PPT1 0.05 | Hamburguesa con PPT1 0.10 |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 0 | 1.50 ± 0.17 _b | 1.10 ± 0.17 _a | 1.63 ± 0.06 _c | 1.98 ± 0.07 _d |
| 7 | 2.96 ± 0.01 _g | 1.10 ± 0.17 _a | 2.56 ± 0.04 _f | 2.09 ± 0.05 _d |
| 9 | 3.00 ± 0.02 _g | 2.11 ± 0.06 _e | 2.31 ± 0.05 _c | 2.85 ± 0.04 _f |
| día | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesa con PPT1 0.05 | Hamburguesa con PPT1 0.10 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 1.95 ± 0.09 _d | 1.50 ± 0.09 _b | 0 | 1.90 ± 0.05 _d |

¹Los valores representan la media ± desviación estándar de tres réplicas. Diferentes letras indican diferencias por efecto de la condición de almacenamiento a 4 °C ($p < 0.05$). La formulación de las hamburguesas es indicada en la Tabla 3.

Dentro de las levaduras que pueden inducir daño a productos derivados del pollo almacenados a < 5 °C están *Yarrowia lipolytica* y *Candida zeylanoides* (Ismail y col., 2000; Hinton y col., 2002). La inclusión de PPT1 al 0.05 % y α -tocoferol en las hamburguesas indujeron que el crecimiento de levaduras y hongos fuese aún más bajo que en los grupos control y PPT1 al 0.10 %. Mientras que la adición de PCT1 al 0.05 % inhibió por completo el crecimiento de estos microorganismos. En comparación, aunque el recuento inicial de levaduras y hongos filamentosos fue diferente entre los tratamientos, se puede observar que el extracto PCT1 retarda de manera más efectiva el crecimiento de estos microorganismos.

Los resultados presentados en este estudio demostraron un significativo ($p < 0.05$) efecto antimicrobiano en las hamburguesas de pollo como resultado de la inclusión del extracto PCT1 al 0.05 % en almacenamiento refrigerado en comparación con los extractos PPT1. Esto coincide con el comportamiento de pH observado, donde el menor incremento en pH se detectó en el grupo PCT1. Estudios anteriores también evaluaron el efecto conservante de un extracto a partir de la piel de calamar gigante, donde se observó que existía un efecto antimicrobiano de dichos extractos en mesófilos aeróbicos y psicrotrofos (Ezquerria-Brauer y col., 2016; Ezquerria-Brauer y col., 2017; Chan-Higuera y col., 2019a). El comportamiento observado, en cuanto a que con la menor concentración de extracto (0.05 %) se obtuvo el mayor efecto protector, coincide por lo detectado por Chan-Higuera y col. (2019a), quienes trabajaron con la adición de extractos metanólicos pigmentados de la piel de calamar en un paté de atún, pero difiere a lo reportado por Ezquerria-Brauer y col. (2016) y Ezquerria-Brauer y col. (2017) quienes evaluaron a los extractos etanólicos pigmentados de la piel de calamar en pescados almacenados en hielo. Estas diferencias pueden atribuirse al tipo de disolvente empleado, que como se discutió anteriormente, puede influir en el contenido de los diferentes compuestos bioactivos que se hayan extraído.

Análisis Oxidación de Lípidos

El desarrollo de oxidación de lípidos fue evaluado por el valor de peróxido y el valor de *p*-anisidina. Los hidroperóxidos y peróxidos son producto de la segunda etapa de oxidación, la propagación de estos promueve nuevas reacciones de degradación

y genera compuestos volátiles indeseables, como aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes. El comportamiento observado, en cuanto a la producción de peróxidos en todos los productos, no fue el esperado ya que se detectó una tendencia al decremento de los mismos desde el primer día de muestreo (**Tabla 12**), lo cual estaría indicando que los productos se encontraban en la siguiente etapa de oxidación (Pateiro y col., 2018). Se sabe que la oxidación lipídica, sobre todo en sistema alimentarios tan complejo como lo es una hamburguesa de pollo, es un proceso muy dinámico y que los valores que se obtengan estarán en función del método utilizado para su determinación (Ahn y col., 1998). Si bien el índice de peróxidos es una medida estándar en la evaluación de la oxidación lipídica, su utilidad se limita a las etapas iniciales de oxidación, por lo que se ha establecido que este valor puede ser reducidos por algún proceso (Grampone, 1990). Aunado al hecho de que procesos como la molienda de la carne puede inducir oxidación de los lípidos presentes en la misma (Brannan y Erickson, 1996). Sin embargo, al analizar la velocidad promedio de decremento de los peróxidos, se detectó la siguiente tendencia: control sin antioxidante ni pigmentos >PCT1 0.10 % > α -tocoferol > PCT1 0.05 % > PPT1 0.10 % > PPT1 0.05 %.

Debido a las propiedades tóxicas del ácido tiobarbitúrico, el método de *p*-anisidina ha resultado muy útil para la evaluación de los productos secundarios de la oxidación, por lo que ha sido oficializado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en Inglés) (Paquot y Hautfenne, 1987). Tal como se esperaba, los valores de *p*-anisidina aumentaron de manera significativa ($p < 0.05$) con el tiempo de almacenamiento, particularmente al final del período de almacenamiento (**Tabla 13**). El aumento en los valores *p*-anisidina denota la formación de compuestos del tipo aldehídos. Valores bajos de este indicador implica que se retardó la etapa de terminación de la oxidación (Pateiro et al., 2018).

Tabla 12. Valor de peróxido (mEq/kg) en hamburguesas de pollo almacenadas a 4°C¹

| día | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesa con PPT1 0.05 | Hamburguesa con PPT1 0.10 |
|----------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 | 3.38 ± 0.08 _a | 3.39 ± 0.08 _a | 3.29 ± 0.04 _{ab} | 3.31 ± 0.12 _{ab} |
| 2 | 2.24 ± 0.04 _g | 2.89 ± 0.04 _{de} | 3.24 ± 0.05 _{ab} | 3.02 ± 0.02 _{cd} |
| 4 | 1.51 ± 0.04 _j | 2.52 ± 0.01 _f | 3.19 ± 0.06 _{bc} | 2.81 ± 0.11 _e |
| 7 | 0.71 ± 0.10 _i | 1.98 ± 0.04 _h | 2.90 ± 0.02 _{de} | 2.18 ± 0.10 _g |
| 9 | 0 _m | 1.01 ± 0.07 _k | 2.51 ± 0.03 _f | 1.75 ± 0.03 _i |
| | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesa con PPT1 0.05 | Hamburguesa con PPT1 0.10 |
| 0 | 3.41 ± 0.02 _a | 3.38 ± 0.07 _a | 3.48 ± 0.04 _a | 3.48 ± 0.05 _a |
| 2 | 3.02 ± 0.07 _b | 2.41 ± 0.04 _{de} | 2.43 ± 0.10 _{de} | 2.79 ± 0.04 _c |
| 4 | 2.77 ± 0.09 _c | 2.30 ± 0.04 _e | 1.64 ± 0.05 _g | 2.52 ± 0.03 _d |
| 7 | 2.42 ± 0.03 _{de} | 1.38 ± 0.04 _h | 1.16 ± 0.21 _i | 1.95 ± 0.05 _f |
| 9 | 1.62 ± 0.07 _g | 1.10 ± 0.05 _i | 0.57 ± 0.02 _j | 1.86 ± 0.06 _f |

¹Los valores representan la media ± desviación estándar de tres réplicas. Diferentes letras indican diferencias por efecto de la condición de almacenamiento a 4 °C ($p < 0.05$). La formulación de las hamburguesas es indicada en la Tabla 3.

Tabla 13. Valor de anisidina en hamburguesas de pollo almacenadas a 4 °C¹

| Día | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesa con PPT1 0.05 | Hamburguesa con PPT1 0.10 |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 0 | 0.30 ± 0.04a | 0.23 ± 0.06a | 0.23 ± 0.02a | 0.29 ± 0.07a |
| 2 | 0.71 ± 0.04cd | 0.33 ± 0.02ab | 0.28 ± 0.03a | 0.49 ± 0.2c |
| 4 | 0.77 ± 0.05d | 0.46 ± 0.03b | 0.34 ± 0.02ab | 0.72 ± 0.02cd |
| 7 | 1.15 ± 0.06e | 0.77 ± 0.02cd | 1.22 ± 0.02e | 1.21 ± 0.1e |
| 9 | 1.63 ± 0.1f | 1.21 ± 0.03e | 1.28 ± 0.02e | 1.64 ± 0.06f |
| | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesa con PPT1 0.05 | Hamburguesa con PPT1 0.10 |
| 0 | 1.53 ± 0.04bc | 1.46 ± 0.01a | 1.45 ± 0.02a | 1.36 ± 0.01a |
| 2 | 1.59 ± 0.02cd | 1.48 ± 0.01b | 1.45 ± 0.02ab | 1.54 ± 0.01bc |
| 4 | 1.73 ± 0.03ef | 1.52 ± 0.02bc | 1.51 ± 0.01bc | 1.57 ± 0.02cd |
| 7 | 1.98 ± 0h | 1.64 ± 0.03de | 1.74 ± 0.01f | 1.82 ± 0.01fg |
| 9 | 2.38 ± 0.12j | 1.5 ± 0.02g | 2.02 ± 0.03h | 2.14 ± 0.02i |

¹Los valores representan la media ± desviación estándar de tres réplicas. Las literales diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). La formulación de las hamburguesas es indicada en la Tabla 3.

Al establecer la tendencia en cuanto al valor más alto de *p*-anisidina la final del almacenamiento se observó lo siguiente: control sin antioxidante ni pigmentos > PCT1 0.1 % > PPT1 0.10 % > PCT1 0.05 % > PPT1 0.05 % > α -tocoferol. La mayor capacidad para retardar la oxidación observada en los extractos de pulpo al compararse con los de calamar, se correlacionan con la mayor capacidad para atrapar radicales libres detectadas en dichos extractos. Para dar una mayor información sobre el proceso de la oxidación, se estableció el valor de oxidación total (TOTOX), el cual se determinó adaptando la Ecuación 7 desarrollada por Chew y col. (2016).

$$TOTOX = P-AV+2 PV \quad (7)$$

donde *P-AV* es el valor de *p*-anisidina y *PV* el decremento del valor de peróxidos.

La tendencia en el valor TOTOX fue similar al valor de *p*-anisidina, un incremento conforme transcurre el tiempo de almacenamiento. Al final de almacenamiento los valores más altos se obtuvieron en los tratamientos sin antioxidantes ni pigmentos. El orden del nivel de prevención de la oxidación fue PPT1 0.05 % > PPT1 0.10 % > PCT1 0.10 % > α -tocoferol > PCT1 0.05 %.

El comportamiento observado en cuanto a la prevención de la oxidación en los extractos de calamar es similar a lo reportado por Chan-Higuera y col. (2019a), a mayor concentración de extracto mayor el efecto protector que se detectó. Sin embargo, cuando se trabajó con los extractos obtenidos de la piel de pulpo esa tendencia no se apreció. Partiendo de los estudios de RMN₁H, se sugiere que existen diferentes concentraciones de compuestos químicos entre los extractos de pulpo y calamar, a reserva de realizar más estudios. Aún así, partiendo de esto y de que la disminución en la inducción a la oxidación depende de varios factores como son la concentración, el tipo de antioxidante y el periodo de almacenamiento que se aplique (Mielnik y col. 2003), se infiere que al trabajar con bajas concentraciones de PPT1 se obtiene una mayor eficacia en tiempos cortos de almacenamiento (Lai y col., 1991).

En futuros estudios se podría trabajar en almacenamiento más prolongados, como la congelación, para determinar si a mayores concentración de PPT1 se

podría prevenir más la oxidación, tal como lo observaron Mielnik y col. (2003), quienes evaluaron diferentes concentraciones de antioxidantes en carne de pavo almacenada en congelación.

Análisis Sensorial

La evolución de la calidad sensorial de las hamburguesas de pollo se muestra en las **Tablas 14 y 15**. Al inicio del almacenamiento, la calidad de las hamburguesas obtuvo la máxima calificación de calidad (calificación E). La calidad excelente descrita para las hamburguesas de pollo se perdió progresivamente durante el almacenamiento refrigerado en todas las muestras. Después de 9 días de almacenamiento las muestras conteniendo α -tocoferol y los extractos PPT1 0.05 % y PCT1 0.05 % mostraron una calidad buena ya que los panelistas las calificaron como A. La adición de PPT1 0.10 % en las hamburguesas mantuvo la calidad sensorial considerada como buena hasta el día 7 de almacenamiento. Mientras que aquellas hamburguesas que fueron adicionadas con PCT1 0.10 % mostraron un comportamiento similar al control. La alta aceptación sensorial y la vida útil prolongada de las hamburguesas formuladas con extractos PPT1 0.05 % y PCT1 0.05 % coinciden con los resultados mencionados anteriormente, con aquellos en relación al contenido microbiológico y estudio de oxidación lipídica; sin embargo, se esperaba que superara la puntuación de las hamburguesas formuladas con α -tocoferol, ya que, los extractos demostraron tener mejor inhibición microbiana y capacidad TOTOX. Katiyo y col. (2020) mencionan que es difícil clasificar la calidad del pollo por su apariencia, en este caso, el principal descriptor para detectar un descenso de calidad es el olor. El incremento en la pérdida de calidad al final del almacenamiento observado en este trabajo es similar al detectado en carne molida de pollo (Jimenez-Martin y col., 2016). Otros estudios han descrito que la adición de extractos pigmentados de la piel de calamar, retardan la pérdida de calidad en productos como pescados almacenados en hielo (Ezquerro-Brauer y col., 2016, 2017) y paté de atún (Chan-Higuera y col., 2019a). En este último trabajo, al igual que en la presente investigación, los mejores resultados en cuanto a la calidad sensorial se observaron a las concentraciones menores de los pigmentos evaluados

Tabla 14. Evaluación sensorial de hamburguesa de pollo con extractos de piel pulpo almacenada a 4 °C¹

| Día | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesa con PPT1 0.05 | Hamburguesa con PPT1 0.10 |
|-----|------------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 | E | E | E | E |
| 2 | E | E | E | E |
| 4 | A | E | A | A |
| 7 | B | A | A | A |
| 9 | C | A | A | B |

¹Categorías de frescura: Excelente (E), Buena (A), Regular (B), Mala (C), Inaceptable (D). La formulación de las hamburguesas es indicada en la Tabla 3.

Tabla 15. Evaluación sensorial de hamburguesa de pollo con extractos de piel de calamar almacenada a 4°C¹

| Día | Hamburguesa sin antioxidante | Hamburguesa con antioxidante | Hamburguesa con PPT1 0.05 | Hamburguesa con PPT1 0.10 |
|-----|------------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 | E | E | E | E |
| 2 | E | E | E | E |
| 4 | A | E | A | A |
| 7 | B | A | A | B |
| 9 | C | B | B | C |

¹Categorías de frescura: Excelente (E), Buena (A), Regular (B), Mala (C), Inaceptable (D). La formulación de las hamburguesas es indicada en la Tabla 3.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio, se puede establecer que los pigmentos obtenidos de pulpo y calamar gigante poseen actividad antioxidante y antimutagénica *in vitro*. El disolvente de extracción ejerció un impacto importante en la extracción de compuestos antioxidantes de las muestras. El metanol acidificado es el solvente de elección, ya que produjo el mayor contenido de compuestos antioxidantes extraíbles. Los pigmentos de pulpo poseen una notable actividad antioxidante. El presente estudio confirmó que los principales compuestos extraídos en los pigmentos de piel de pulpo y calamar son omatinas, específicamente xanthomatina y dihydroxantomatina, así como quinurenina. La mayor actividad antioxidante en los pigmentos de la piel del pulpo, probablemente se debe a la presencia de compuestos amino aromáticos, mientras que la mayor propiedad antimutagénica en los pigmentos de la piel del calamar podría deberse a la quinurenina.

Este estudio además demostró que los pigmentos de la piel de pulpo y de calamar pueden ser empleados en la formulación de hamburguesas de pollo para retardar su deterioro. Cuando los extractos se usan a concentraciones de 0.05 % (p/p), dichos extractos retardan la oxidación lipídica y el desarrollo de microorganismos al menos por 9 días. Los pigmentos de calamar a concentración 0.05 % (p/p) tienen un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de *Enterobacteriaceae* y hongos filamentosos y levaduras. Los pigmentos de pulpo notablemente retardan las reacciones de degradación de lípidos en sus primeras etapas, sin embargo, no es de manera efectiva durante la etapa de terminación. La pérdida de calidad sensorial también confirmó que, concentraciones al 0.05 % de ambos extractos promueven una vida útil prolongada en comparación con la hamburguesa sin antioxidante, manteniendo una calidad buena hasta 9 días de almacenamiento refrigerado.

Los extractos de pigmentos de la piel del pulpo y calamar actúan de manera diferente frente a la oxidación de lípidos y el desarrollo de microorganismos, aunque contienen compuestos similares, sus concentraciones son diferentes, de ahí que su comportamiento sea diferente.

RECOMENDACIONES

- Establecer el potencial efecto tóxico de los extractos obtenidos de la piel de pulpo
- Determinar el grado de aceptación de las hamburguesas de pollo conteniendo los extractos pigmentados a nivel del consumidor con la finalidad de establecer la posible influencia en otros atributos como el sabor.
- Realizar otras evaluaciones físicas a las hamburguesas de pollo durante el almacenamiento, como son la variación de color empleando métodos instrumentales.
- Determinar la vida de anaquel de un producto cárnico almacenado en congelación, en almacenamiento en congelación.
- Identificar los compuestos acompañantes de los pigmentos omocromos en los extractos pigmentados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alposoy, L., Yildirim, A., y Agar, G. (2009). The antioxidant effect of vitamin A, C, and D on aflatoxin B1-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Toxicology and Industrial Health*, 25 (2), 121–127. <https://doi.org/10.1177/0748233709103413>
- Amarowicz, R. y Pegg, R. B. (2019). Chapter One - Natural antioxidants of plant origin. In I. C. F. R. Ferreira & L. B. T.-A. in F. and N. R. Barros (Eds.), *Functional Food Ingredients from Plants* (Vol. 90, pp. 1–81). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.011>
- Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value - Iodometric (visual) endpoint determination (ISO 3960)
- Aryee, N. A. y Boye, J. I. (2014). Current and emerging trends in the formulation and manufacture of nutraceuticals and functional food products. In: *Nutraceutical and Functional Food Processing and Technology*, (edited J.I. Boye). Pp. 1–63. New York, USA: John Wiley & Sons, Ltd
- Aubourg, S. P., Torres-Arreola, W., Trigo, M., y Ezquerro-Brauer, J. M. (2016). Partial characterization of jumbo squid skin pigment extract and its antioxidant potential in a marine oil system. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118 (9), 1293–1304. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500356>
- Barord, G. J. y Boyle, P. (2019). Cephalopods. *Encyclopedia of Ocean Sciences*, 516–522. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11604-5>
- Ben Atitallah, A., Barkallah, M., Hentati, F., Dammak, M., Ben Hlima, H., Fendri, I., ... Abdelkafi, S. (2019). Physicochemical, textural, antioxidant and sensory characteristics of microalgae-fortified canned fish burgers prepared from minced flesh of common barbel (*Barbus barbus*). *Food Bioscience*, 30, 100417. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2019.100417>
- Benzie, I. F. y Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15–27. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)

- Board N. (2005). The Complete book on Natural Dyes & Pigments: How to make natural purple dyes from plants, growing, harvesting and using natural dye plants, making and using natural dyes plants, dyeing wool with natural plant dyes, how to make plant based dyes, natural dyes and dyeing from woodland plants. NIR Board of Consultants & Engineers. Asia Pacific Business Press. ISBN 8178330326, 9788178330327
- Brannam, R. y Erickson, M. (1996). Quantification of antioxidant in channel catfish during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1361-1366. <https://doi.org/10.1021/jf950172t>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28 (1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)
- Carocho, M., Morales, P. y Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 284–295. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>
- Carocho, M., Morales, P. y Ferreira, I. C. F. R. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>
- Carrillo Inungaray, M. L. y Reyes Munguía, A. (2014). Vida útil de los alimentos / Lifetime food. *CIBA Revista Iberoamericana de Las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 2(3), 32. <https://doi.org/10.23913/ciba.v2i3.20>
- Chan-Higuera, J.E., Ezquerra-Brauer, J.M., Lipan, L., Cano-Lamadrid, M., Rizzitano, R. y Carbonell-Barrachina, A.A. (2019a). Evaluation of *Dosidicus gigas* skin extracts as an antioxidant and preservative in tuna pâté. *Foods*, 8, 693. <https://doi.org/10.3390/foods8120693>
- Chan-Higuera, J. E., Santacruz-Ortega, H. D. C., Carbonell-Barrachina, Á. A., Burgos-Hernández, A., Robles-Sánchez, R. M., Cruz-Ramírez, S. G., y Ezquerra-Brauer, J. M. (2019b). Xanthommatin is Behind the Antioxidant Activity of the Skin of *Dosidicus gigas*. *Molecules*, 24 (19), 3420. <https://doi.org/10.3390/molecules24193420>

- Chan-Higuera, J.E., Carbonell-Barrachina, A.A., Cárdenas-López, J.L., Kačániová, M., Burgos-Hernández, A., Ezquerro-Brauer, J.M. (2019c). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin pigments: Chemical analysis and evaluation of antimicrobial and antimutagenic potential. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 9 (2), 349–353. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.2.349-353>
- Chandra, P., Sharma, R. K. y Arora, D. S. (2020). Antioxidant compounds from microbial sources: A review. *Food Research International*, 129, 108849. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108849>
- Chew, S.C.; Tan, C.P.; Long, K.; Nyam, K.L. (2016) Effect of chemical refining on the quality of kenaf (*Hibiscus cannabinus*) seed oil. *Industrial Crops and Products*, 89, 59–65. <https://doi.org/10.1061/j.indcrop.2016.05.002>
- Choksawangkarn, W., Phiphattananukoon, S., Jaresitthikunchai, J. y Roytrakul, S. (2018). Antioxidative peptides from fish sauce by-product: Isolation and characterization. *Agriculture and Natural Resources*, 52(5), 460–466. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.11.001>
- CONAPESCA (2018). Del mar el pulpo y el calamar. Recuperado de: <https://www.gob.mx/conapesca/articulos/del-mar-el-pulpo-y-el-calamar-154431>
- CONAPESCA (2017). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2017. Recuperado de: <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca>
- Cruz-Ramírez, S.G., López-Sainz, C.M., Rosas-Burgos, E.C., Cinco-Moroyoqui, F.J., Velázquez, C., Hernández, J. y Burgos-Hernández, A. (2015). Antimutagenic, antiproliferative, and antioxidant effects obtained from octopus (*Paraoctopus limaculatus*). *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(4), 722–728. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.0001>
- Deravi, L.F., Magyar, A.P., Sheehy, S.P., Bell, G.R., Mäthger, L.M., Senft, S.L., ... Parker, K.K. (2014). The structure-function relationships of a natural nanoscale photonic device in cuttlefish chromatophores. *Journal of The Royal Society Intefase*, 11 (93), Article ID 20130942. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0942>

- de Lima Santo, K., de Sousa, F.M., Duarte de Almeida, R., Pereira de Gusmão R., Souza Gusmão, T.A. (2019). Replacement of fat by natural fibers in chicken burgers with reduced sodium content. *The Open Food Science Journal*. 11, 1-8. <https://doi.org/10.2174/1874256401911010001>
- Ezquerria-Brauer, J.M, Miranda, J., Cepeda, A., Barros-Velázquez, J., y Aubourg, S. (2016). Effect of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin extract on the microbial activity in chilled mackerel (*Scomber scombrus*). *LWT - Food Science and Technology*, 72, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.024>
- Ezquerria-Brauer, J.M, Miranda, J., Chan-Higuera, J., Barros-Velázquez, J., y Aubourg, S. (2017). New icing media for quality enhancement of chilled hake (*Merluccius merluccius*) using a jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97 (10), 3412–3419. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8192>
- Fatimah Zaharah, M.Y. y Rabeta, M.S. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of squid powder. *Food Research*, 2 (1), 82–88. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.2\(1\).225](https://doi.org/10.26656/fr.2017.2(1).225)
- FAO. (2001). Directrices para el Manejo, Transporte y Sacrificio Humanitario del Ganado. <http://www.fao.org/3/x6909S/x6909s00.htm#Contents>.
- Figon, F. y Casas, J. (2019). Ommochromes in invertebrates: biochemistry and cell biology. *Biological Reviews*, 94, 156–183. <https://doi.org/10.1111/brv.12441>
- Francikowski, J., Krzyżowski, M., Kocharńska, B., Potrzebska, M., Baran, B., Chajec, Ł., Urbisz, A., Kubiak, J. (2019). Characterisation of white and yellow eye colour mutant strains of house cricket, *Acheta domesticus*. *PloS One*, 14 (5), e0216281–e0216281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216281>
- Gonzalo G., Dominguez., Veá V., Villa J., Palafox H., Daniela J., Ayala J. (2012). Nuevas tendencia en ciencia y tecnología de alimentos. Universidad de Sonora. 82-102.
- Grampone, M.A. (1991). El índice de anisidina como medida del deterioro latente de un material graso. *Grasas y Aceites*, 42, 8-13. <https://doi.org/grasas y aceites.revistas.csic.es>

- Gartner, W. y Towner, P. (1995). Invertebrate visual pigments. *Photochemistry and Photobiology*, 62, 1–16. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370878-8/00170-1>
- Gutiérrez-del-Río, I., Fernández, J. y Lombó, F. (2018). Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(3), 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.04.024>
- Hanlon, R. (2007). Cephalopod dynamic camouflage. *Current Biology*, 17(11), R400–R404. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.034>
- Hannan, M. A., Sohag, A. A. M., Dash, R., Haque, M. N., Mohibullah, M., Oktaviani, D. F., Moon, I. S. (2020). Phytosterols of marine algae: Insights into the potential health benefits and molecular pharmacology. *Phytomedicine*, 69, 153201. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153201>
- Hendry G. y Houghton J. (1996). *Natural food colorants*. USA. Blackie academic y professional.
- Hinton Jr., A., Cason, J.A. e Ingram, K.D. (2002). Enumeration and identification of yeasts associated with commercial poultry processing and spoilage of refrigerated broiler carcasses. *Journal of Food Protection*, 65, 993-998. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.6.993>
- Hoving, H.-J. T., Perez, J. A. A., Bolstad, K. S. R., Braid, H. E., Evans, A. B., Fuchs, D., Xavier, J. C. C. (2014). Chapter Three - The Study of Deep-Sea Cephalopods. In E. A. G. B. T.-A. in M. B. Vidal (Ed.), *Advances in Cephalopod Science: Biology, Ecology, Cultivation and Fisheries* (Vol. 67, pp. 235–359). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800287-2.00003-2>
- Hussain, A., Chatha, S.A.S., Noor, S., Arshad, M., Khan, Z.A., Arshad, M.U., Sattar, M.Z.A. Effect of extraction techniques and solvent systems on the extraction of antioxidant components from peanut (*Arachis hypogaea* L.) hulls. *Food Analytical Methods*, 5, 890–896. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9325-y>
- Ismail, S.A., Deak, T., Abd El-Rahman, H.A., Yassien, M.A. y Beuchat, L.R. (2000). Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry

- products stored at refrigeration temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 113–121. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00414-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00414-1)
- Kayser, H. (1985). Pigments. En: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut, G.A. y Gilbert, L.I. (Eds). Vol. 10. New York, Pergamon.
- Kennedy, G. Y. (1979). Pigments of marine invertebrates. En: *Advances in Marine Biology*. Russell, F.S. y Young, M. (Eds). Vol. 16. London, Academic Press. Pp. 309-381.
- Kim, S.-B., Yoon, N., Shi, K., y Lim, C.-W. (2014). Antioxidant and cholinesterase inhibitory activities of the by-products of three *Pandalid* shrimps. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 17, 421–425. <https://doi.org/10.5657/FAS.2014.0421>
- Kiyomoto, R. K., Poon, M. C. y Bowen, S. T. (1969) Ommochrome pigments of the compound eyes of *Artemia salina*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 29, 975–984. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)90999-2](https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)90999-2)
- Ladikos, D. y Lougovois, V. (1990). Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food Chemistry*, 35, 295–314. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(90\)90019-Z](https://doi.org/10.1016/0308-8146(90)90019-Z)
- Lai, S.-M., Gray, J. I., Smith, D. M., Booren, A. M., Crackel, R. L. y Buckley, D. J. (1991). Effects of oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. *Journal of Food Science*, 56, 616–620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb05342.x>
- Lavilla, M. B. (2019). Consumer attitudes to food preservation processes and strategies. *References Module in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22629-2>
- Levy, D. D., Zeiger, E., Escobar, P. A., Hakura, A., van der Leede, B. M., Kato, M., Moore, M.M. y Sugiyama, K. (2019). Recommended criteria for the evaluation of bacterial mutagenicity data (Ames test). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 848, 403074. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.004>
- Lianou, A., Panagou, E. Z. y Nychas, G.-J. E. (2016). Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. En: *The Stability and Shelf Life of Food* (2da. Ed.).

- Subramaniam, P. (Eds.). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition (pp. 3–42). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100435-7.00001-0>
- Linzen, B. (1974). The Tryptophan → Ommochrome Pathway in Insects¹¹This paper is dedicated to Professor Adolf Butenandt: on the occasion of his 70th birthday, in token of my gratitude and admiration for his inspiring leadership, his fervent devotion to the chemistry of life (J. E. Treherne, M. J. Berridge, & V. B. B. T.-A. in I. P. Wigglesworth, eds.). [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60130-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60130-7)
- Liu, S., Bell, G., Kuzirian, A. y Forsythe, E. (2012). Separation and identification of chromatophore pigments in the skin of the cephalopod *Loligo pealei*. Adelphi, MD: Army Research Laboratory. USA. ARL-TR-5921
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., Gómez, B., Barba, F. J., Mora, L., Pérez-Santaescolástica, C. y Toldrá, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>
- Markaida, U. y Gilly, W. F. (2016). Cephalopods of Pacific Latin America. *Fisheries Research*, 173, 113–121. <https://doi.org/10.1016/J.FISHRES.2015.09.014>
- Maron, D. M. & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113 (3–4), 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- Maron, D. M. y Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3), 173–215. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- Millán, F. (2016). Libro de Espectroscopía UV Visible. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16927.15528>
- Mielnik, M.B., Aaby, K. y Skrede, G. (2003). Commercial antioxidants control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat. *Meat Science*, 65,1147-1155. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00345-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00345-5)

- Mohsen-Nia, M., Amiri, H. y Jazi, B. (2010). Dielectric constants of water, methanol, ethanol, butanol and acetone: measurement and computational study. *Journal of Chemistry Solutions*, 39, 701–708. <https://doi.org/10.1007/s10953-010-9538-5>
- Morales, J., Montero, P. y Moral, A. (2000). Isolation and partial characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2142–2148. <https://doi.org/10.1021/jf990711k>
- Nasery, M., Hassanzadeh, M. K., Najaran, Z. T. y Emami, S. A. (2016). Chapter 75 - Rose (*Rosaxdamascena* Mill.) Essential Oils (V. R. B. T.-E. O. in F. P. Preedy Flavor and Safety, ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00075-4>
- Ngo, D.-H. y Kim, S.-K. (2013). Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.036>
- Ngo, T.V., Scrllett, C.J., Bowyer, M.C., Ngo, P.D. y Vuong, Q.V. (2017). Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of *Salacia chinensis* L. *Journal of Food Quality*, Article ID 9305047. <https://doi.org/10.1155/2017/9305047>
- Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Norma oficial mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Norma oficial mexicana NOM-111-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2018, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a su proceso. Disposiciones y especificaciones sanitarias
- Orenstein, E. C., Haag, J. M., Gagnon, Y. L. y Jaffe, J. S. (2016). Automated classification of camouflaging cuttlefish. *Methods in Oceanography*, 15–16, 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.mio.2016.04.005>
- Osorio, D. (2014). Cephalopod Behaviour: Skin Flicks. *Current Biology*, 24(15), R684–R685. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.066>

- Oswell, N. J., Thippareddi, H. y Pegg, R. B. (2018). Practical use of natural antioxidants in meat products in the U.S.: A review. *Meat Science*, 145, 469–479. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.07.020>
- Özyurt, G.B., Duysak, O., Akamca, E. y Tureli, C. (2006). Seasonal changes of fatty acids of cuttlefish *Sepia officianlins* L. (*Mollusca: Cephalopoda*) in the north eastern Mediterranean sea. *Food Chemistry*, 95 (3), 382–385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.044>
- Pateiro M, Barba FJ, Domínguez R, et al. Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. *Food Res Int.* 2018;113:156-166. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.014>
- Petruzzi, L., Corbo, M. R., Sinigaglia, M. y Bevilacqua, A. (2017). Chapter 1 - Microbial Spoilage of Foods: Fundamentals. In A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. B. T.-T. M. Q. of F. Sinigaglia (Eds.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 1–21). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00002-9>
- Pinteus, S., Lemos, M. F. L., Alves, C., Neugebauer, A., Silva, J., Thomas, O. P., ... Pedrosa, R. (2018). Marine invasive macroalgae: Turning a real threat into a major opportunity - the biotechnological potential of *Sargassum muticum* and *Asparagopsis armata*. *Algal Research*, 34, 217–234. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.018>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Ribeiro, J. S., Santos, M. J. M. C., Silva, L. K. R., Pereira, L. C. L., Santos, I. A., da Silva Lannes, S. C. y da Silva, M. V. (2019). Natural antioxidants used in meat products: A brief review. *Meat Science*, 148, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.10.016>
- Riou, M. y Christidès, J.-P. (2010). Cryptic color change in a crab spider (*Misumena vatia*): identification and quantification of precursors and ommochrome

- pigments by HPLC. *Journal of Chemical Ecology*, 36, 412–423. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9765-7>
- Romain, J., Thomas, C., Pierre, S., Gerard, B. (2013). *Ciencia de los Alimentos: bioquímica, microbiología, procesos y productos*. España. Acribia.
- Romero, Y. y Martínez, A. (2015). Antiradical capacity of ommochromes. *Journal of Molecular Modeling*, 21(8), 220. <https://doi.org/10.1007/s00894-015-2773-3>
- Sanders, J. K. M. y Hunter, B. K. (1988). *Modern NMR spectroscopy: a guide for chemists*. Retrieved from http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:19062074
- Sawada, H., Nakagoshi, M., Mase, K. & Yamamoto, T. (2000). Occurrence of ommochrome-containing pigment granules in the central nervous system of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 125, 421–428. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00179-0)
- Schaich, K. M. (2013). CHAPTER 1 - Challenges in Elucidating Lipid Oxidation Mechanisms: When, Where, and How Do Products Arise? (A. Logan, U. Nienaber, y X. B. T.-L. O. Pan, eds.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-9830791-6-3.50004-7>
- Shahidi, F. (2006). *Maximising the value of marine by-products* (1st ed). Cambridge, ENG: Woodhead Publishing.
- Shao, S., Zhaou, T. y Tsao, R. (2011). Antimicrobials from Plants - Food Preservation and Shelf-Life Extension. *Comprehensive Biotechnology*. 4, 645-658. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00249-4>
- Sila, A. y Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.007>
- Soler Sanchis, M.D., Mateos Otero, M., Safón García, E., Soler Romero, P. y Garcés Narro, C. (2011). Caracterización del color y relación con el pH de pechuga de pollo durante el procesado de las canales en matadero. XLVIII Simposio Científico de Avicultura. Santiago de Compostela, España.

- Torres, E. F., Rodrigo, D. y Martínez, A. (2016). Preservation of Foods (B. Caballero, P. M. Finglas, & F. B. T.-E. of F. and H. Toldrá, eds.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00566-3>
- Van den Branden, C. y Decler, W. (1976). A study of the chromatophore pigments on the skin of the cephalopod *Sepia officinalis* L. *Biologisch Jaarboek Dodonaea*, 44 (7), 345-352.
- Vate, N.K. y Benjakul, S. (2013). Antioxidative activity of melanin-free ink from splendid squid (*Loligo formosana*). *International Aquatic Research*, 5, 9. <https://doi.org/10.1186/2008-6970-5-9>
- Vega, J., Álvarez-Gómez, F., Güenaga, L., Figueroa, F. L. y Gómez-Pinchetti, J. L. (2020). Antioxidant activity of extracts from marine macroalgae, wild-collected and cultivated, in an integrated multi-trophic aquaculture system. *Aquaculture*, 522, 735088. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735088>
- Verma, S.P. y Sahoo, J. (2000). Improvement in the quality of ground chevron during refrigerated storage by tocopherol acetate preblending. *Meat Science*, 56, 403-413. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00072-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00072-3)
- Villalobos-Delgado, L. H., Nevárez-Moorillon, G. V, Caro, I., Quinto, E. J. y Mateo, J. (2019). 4 - Natural antimicrobial agents to improve foods shelf life (C. M. B. T.-F. Q. and S. L. Galanakis, ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00004-5>
- Vodnar, D.C., Călinoiu, L.F., Dulf, F.V., Ștefănescu, B.E., Crișan, G. y Socaciu, C. (2017). Identification of the bioactive compounds and antioxidant, antimutagenic and antimicrobial activities of thermally processed agro-industrial waste. *Food Chemistry*, 231 (15), 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.131>
- Williams, T., DiBona, C., Dinneen, S., Jones Labadie, S., Chu, F. y Deravi, L. (2016). Contributions of Phenoxazone-Based Pigments to the Structure and Function of Nanostructured Granules in Squid Chromatophores. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 32. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00243>

- Xiong, Q., Zhang, M., Wang, T., Wang, D., Sun, C., Bian, H., Xu, W. (2020). Lipid oxidation induced by heating in chicken meat and the relationship with oxidants and antioxidant enzymes activities. *Poultry Science*, 99(3), 1761–1767. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.013>
- Zhang, H., Wu, J. y Guo, X. (2016). Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw chicken meat quality. *Food Science and Human Wellness*, 5(1), 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.11.003>
- Ziegler, I. (1961). Genetic Aspects of Ommochrome and Pterin Pigments**The author wants to thank Dr. Helene Nathan of the Haskins Laboratories, New York, New York for her valuable aid and advice in the preparation of this manuscript. (E. W. Caspari & J. M. B. T.-A. in G. Thoday, eds.). [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60121-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60121-2)
- Zumholz, K. (2005). The influence of environmental factors on the micro-chemical composition of cephalopod statoliths. PhD thesis, University of Kiel.