



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para  
el Desarrollo

Determinación de aniones y cationes y estudio de la  
actividad biológica en jamón curado

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Gestión de la Seguridad y Calidad  
Alimentaria

AUTOR/A: Moreno Mariscal, Cristina

Tutor/a: Toldrá Vilardell, Fidel

Cotutor/a externo: ARISTOY ALBERT, M<sup>a</sup> CONCEPCION

Director/a Experimental: MORA SOLER, LETICIA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

## DETERMINACIÓN DE ANIONES Y CATIONES Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN JAMÓN CURADO

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE  
LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: CRISTINA MORENO MARISCAL

TUTOR ACADÉMICO: Fidel Toldrá Vilardell

TUTORAS EXPERIMENTALES: M. Concepción Aristoy Albert  
Leticia Mora Soler

*Curso académico: 2021/22*

**VALENCIA, septiembre 2022**

# **DETERMINACIÓN DE ANIONES Y CATIONES Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN JAMÓN CURADO**

Moreno Mariscal, Cristina; Aristoy Albert, María Concepción<sup>1</sup>; Mora Soler, Leticia<sup>1</sup>; Toldrá Vilardell, Fidel<sup>1</sup>.

## **RESUMEN**

Los iones inorgánicos están presentes en todos los alimentos de manera natural, pero, además, algunos se adicionan para ayudar en los procesos de fabricación de algunos alimentos, o, para mejorar sus características organolépticas, como en el jamón curado. Es el caso de los aniones cloruro, fosfato, nitrato y nitrito y los cationes sodio, potasio, calcio, magnesio y amonio, de los que se han descrito implicaciones tanto positivas como negativas en la salud de los consumidores. Por otro lado, recientes estudios clínicos, evidencian que la presencia de péptidos bioactivos en el jamón curado puede estar contrarrestando el efecto negativo de la sal, pudiendo ejercer un efecto preventivo de enfermedades cardiovasculares como son la hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes.

En este trabajo, se ha utilizado una metodología de análisis de aniones y cationes mediante cromatografía líquida de intercambio iónico, que se ha aplicado a muestras de jamón curado, en el que se ha verificado la correcta penetración de la sal en el producto terminado. Además, se ha evaluado la actividad biológica antioxidante y antidiabética de fracciones de extractos peptídicos con distinta polaridad, por su potencial repercusión en la salud humana.

**PALABRAS CLAVE:** cromatografía, iones, jamón curado, péptidos bioactivos, actividad antioxidante, actividad antidiabética.

## **ABSTRACT**

Inorganic ions are naturally present in all foods. In addition, they are usually added to help in the manufacturing processes of some foods, or to improve their organoleptic characteristics, for example in cured ham. Positive and negative effects for the health of the consumers have been described in ions, such as chloride, phosphate, nitrate and nitrite anions and sodium, potassium, calcium and magnesium cations. On the other hand, recent clinical studies showed that the presence of bioactive peptides in dry-cured ham may be counteracting the negative effect of salt, and they may have a preventive effect on cardiovascular diseases, for instance: hypertension, hypercholesterolemia and diabetes.

In the present work, an anion and cation analysis methodology has been used by ion exchange liquid chromatography, in order to verify the correct salt

<sup>1</sup>Departamento de Tecnología de Alimentos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. España.

penetration in dry-cured ham samples. Moreover, the antioxidant and antidiabetic biological activities of fractions from peptide dry -cured ham extracts with different polarity has been evaluated for their potential impact in human health.

**KEYWORDS:** chromatography, ions, dry-cured ham, bioactive peptides, antioxidant activity, antidiabetic activity.

## **RESUM**

Els ions inorgànics són presents en tots els aliments de manera natural, però, a més, habitualment s'addicionen per a ajudar en els processos de fabricació d'alguns aliments, o, per a millorar les seues característiques organolèptiques, com en el pernil curat. És el cas dels anions clorur, fosfat, nitrat i nitrit i els cations sodi, potassi calci i magnesi i amoni, dels quals s'han descrit implicacions tant positives com negatives en la salut dels consumidors. D'altra banda, recents estudis clínics, evidencien que la presència de pèptids bioactius en el pernil curat pot estar contrarestant l'efecte negatiu de la sal, podent exercir un efecte preventiu de malalties cardiovasculars com són la hipertensió, hipercolesterolèmia i diabetes.

En aquest treball, s'ha optimitzat una metodologia d'anàlisi d'anions i cations mitjançant cromatografia líquida d'intercanvi iònic, que s'ha aplicat a mostres de pernil curat, en el qual s'ha verificat la correcta penetració de la sal en el producte acabat. A més, s'ha avaluat l'activitat biològica antioxidant i antidiabètica de fraccions d'extractes peptídics amb diferent polaritat, per la seua potencial repercussió en la salut humana.

**PARAULES CLAU:** cromatografia, ions, pernil curat, pèptids bioactius, activitat antioxidant, activitat antidiabètica.

## 1. INTRODUCCIÓN

La dieta Mediterránea es reconocida mundialmente por ser equilibrada y sana, además de ser una alternativa para la prevención de la malnutrición y la obesidad (FAO, 2014). Está principalmente basada en el consumo de alimentos de origen vegetal (aceite de oliva, cereales, legumbres, frutas y verduras...), pero también (aunque de forma menos frecuente) de carne y productos lácteos (FAO, 2014). Además, en los países de la cuenca Mediterránea es fácil encontrar productos cárnicos curados incluidos en la dieta como es el caso del jamón curado (AINIA, 2012).

El jamón curado es uno de los alimentos más tradicionales y característicos de esta dieta, fundamentalmente para la gastronomía española (Armenteros et al., 2012a). Su importancia no solo reside en sus características sensoriales o nutritivas, sino también en la gran relevancia económica que adquiere este sector en España (Toldrá & Aristoy, 2010).

Según el Real Decreto 474/2014 por el que se aprueba la norma de la calidad de los derivados cárnicos, el jamón curado es un derivado cárnico curado-madurado que se define como *“el producto elaborado con la extremidad posterior del cerdo que se ha sometido, con carácter general, a un proceso de salazón, acompañado eventualmente de adición de especias, condimentos y aditivos, lavado, reposo o post-salado y maduración y secado durante el tiempo suficiente para conferirle las características organolépticas propias”*. De esta forma, el salado es la etapa más importante dentro de proceso de elaboración del jamón. La sal actúa regulando la actividad enzimática, principalmente de los enzimas proteolíticos de la carne post mortem, con el objetivo de obtener un producto con unas características organolépticas específicas y deseables y, paralelamente una estabilización del producto, tanto a nivel enzimático como microbiológico (Armenteros, 2010).

Sin embargo, el uso de sal no es suficiente para garantizar la estabilidad y seguridad microbiológica del jamón, y el correcto desarrollo de sus características organolépticas. Es por ello que, además, se emplean sales nitrificantes, constituidas por nitratos y nitritos de sodio o potasio en cantidades controladas (Cando, 2012). Estos compuestos resultan muy útiles en la industria alimentaria, pero tienen un gran inconveniente y es que presentan un efecto tóxico en humanos asociado a la formación de nitrosaminas y metamioglobina, además de estar relacionados con el desarrollo diferentes tipos de cáncer (ATSDR, 2022). Por ello, es muy importante su determinación y control en alimentos. El comité mixto FAO/OMS sobre aditivos alimentarios establece recomendaciones sobre su ingesta diaria admisible (IDA) (0-3,7 mg/kg para nitratos y 0-0,06 mg/kg para nitritos de sodio o potasio) y una cantidad máxima de 50 ppm para jamón curado (Comisión del Codex Alimentarius, 2019).

Teniendo en cuenta estas recomendaciones, es importante recalcar que, en el jamón, los nitritos añadidos son metabolizados durante el proceso de curación y sus niveles en producto final son muy bajos (en torno a 1-2 ppm) (Cando, 2012).

Así pues, la penetración de la sal junto con las sales nitrificantes mediante mecanismos de difusión, el proceso de deshidratación osmótica que se genera, y todo el conjunto de reacciones químicas y enzimáticas que se llevan a cabo, contribuyen a la obtención de un producto estable, seguro y con las propiedades sensoriales típicas y esperadas por el consumidor (Armenteros et al., 2012a).

Con todo ello, el contenido aproximado en sal del jamón curado puede oscilar entre el 3 y el 6% (Jiménez-Colmenero et al, 2010). Sin embargo, las autoridades sanitarias como la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomiendan disminuir el consumo de sal (< 5g/día para adultos) por su importante repercusión en el desarrollo de hipertensión arterial, y por estar relacionado con el aumento del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular e infarto de miocardio (OMS, 2020). De hecho, la tendencia actual es intentar reducir el porcentaje de sal del jamón y en este sentido ya se han realizado estudios en los que se sustituye parte de NaCl por mezclas de NaCl con KCl, CaCl<sub>2</sub> o MgCl<sub>2</sub>, con resultados bastante satisfactorios en cuanto a la difusión de las sales nitrificantes en el jamón y, en consecuencia, la seguridad del producto (Grau et al., 2008; Armenteros et al., 2012b). Este caso supone un ejemplo práctico de la importancia de la determinación de iones en carne; en concreto el jamón, para comparar, por ejemplo, el perfil de penetración de la sal frente a las otras mezclas.

A priori, cabría pensar que, por su elevado contenido en sal, el consumo de jamón curado debería reducirse, pero recientes estudios clínicos, evidencian que la presencia de péptidos bioactivos en el jamón curado puede estar contrarrestando el efecto negativo de la sal, pudiendo ejercer un efecto preventivo de enfermedades cardiovasculares como son la hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes (Ruiz-Candela López et al., 2009; Montoro-García et al., 2022).

Los péptidos bioactivos son pequeños fragmentos proteicos (3-20 aminoácidos) que ejercen un papel beneficioso para la salud (Mora et al., 2019). La carne es una de las mayores fuentes proteicas que podemos encontrar en los alimentos y, en consecuencia, de péptidos potencialmente bioactivos (Martini et al., 2019). Estos péptidos se encuentran encriptados en las proteínas y pueden ser liberados durante el proceso de curado del jamón debido a la proteólisis llevada a cabo por distintas enzimas con actividad endo o exoproteasa (Gallego, 2015). La sal influye significativamente en la actividad de estas enzimas proteolíticas y, por tanto, tendrá un papel decisivo en la generación de péptidos bioactivos ya que algunas de ellas como las calpaínas pueden verse activadas por la sal a bajas concentraciones, pero otras como

las catepsinas, o las aminopeptidasas pueden ser fuertemente inhibidas (Armenteros, 2010).

Por otro lado, los péptidos bioactivos también pueden ser liberados en los alimentos durante el proceso de digestión gastrointestinal por la acción de enzimas digestivas como pepsina, tripsina o quimiotripsina (Gallego, 2015). Cuando estos péptidos llegan al tracto gastrointestinal, deben ser absorbidos y resistir a la digestión enzimática para poder ejercer su efecto positivo en los órganos diana (Mora et al., 2019). Hasta el momento se han descrito una gran variedad de péptidos con distintas funciones metabólicas capaces de influir y modular los distintos sistemas fisiológicos (Mora et al., 2019):

- Sistema cardiovascular: actividad antihipertensiva, antitrombótica, antioxidante, hipocolesterolémica, etc.
- Sistema inmune: actividad antimicrobiana, inmuno-moduladora etc.
- Sistema nervioso: actividad opioide.
- Sistema digestivo: actividad anti-inflamatoria, saciante antidiabética, etc.

Así pues, existen péptidos capaces de modular mecanismos relacionados con la diabetes (Valencia-Mejía et al., 2019). La diabetes es una enfermedad metabólica crónica que supone un problema de carácter mundial con grandes repercusiones socioeconómicas; puesto que se estima que, en el año 2045, unos 693 millones de personas sufrirán esta enfermedad en el mundo (Valencia-Mejía et al., 2019).

Los tratamientos antidiabéticos actuales se centran principalmente en la disminución de la hiperglucemia; sin embargo, no ofrecen un control adecuado de la enfermedad y en muchos casos pueden provocar alteraciones de procesos bioquímicos en el organismo, llegando a desembocar en desórdenes hepáticos y gastrointestinales (Valencia-Mejía et al., 2019). Es por ello, que los péptidos bioactivos se sitúan como una de las principales alternativas a estos medicamentos tradicionales; ya que, por ejemplo, son capaces de aumentar la sensibilidad a la insulina o prolongar su respuesta, entre otras funciones (Mora et al., 2019; Jahandideh et al., 2017).

La diabetes (tanto tipo I como tipo II) se caracteriza, en líneas generales, por un estado hiperglucémico permanente; por ello, uno de los mecanismos y procesos más relevantes a nivel bioquímico es la digestión de los carbohidratos (Jahandideh et al., 2017). En este sentido, las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa cobran gran importancia ya que hidrolizan hidratos de carbono complejos facilitando su absorción. Por tanto, la presencia de péptidos inhibidores de estas enzimas en jamón curado ayuda a prolongar el tiempo de digestión de hidratos de carbono y reducir la hiperglucemia (Jahandideh et al., 2017).

Por otro lado, la prolil-dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) es una enzima implicada en la hidrólisis de las incretinas (hormonas que favorecen la liberación de insulina por parte de las células  $\beta$  del páncreas). Teniendo esto en cuenta, muchos de los medicamentos orales antidiabéticos actuales se

centran en la inhibición de esta DPP-IV frenando, de esta manera, la hidrólisis de dichas hormonas y favoreciendo en consecuencia la secreción de insulina. Así pues, la presencia de péptidos inhibidores de DPP-IV en jamón curado también resultará muy importante de cara a su repercusión en la prevención de esta enfermedad (Jahandideh et al., 2017).

Por último, es importante recalcar que la presencia de péptidos bioactivos con actividad antioxidante en este alimento tan común en nuestra gastronomía puede ayudar a prevenir o reducir el estrés oxidativo asociado a numerosos procesos patológicos, especialmente enfermedades crónicas (Martini et al., 2019).

El presente trabajo consta de dos partes. En primer lugar, se propone el análisis de iones en muestras de jamón fresco y curado para evaluar la presencia de sal y su correcta penetración a través de los diferentes músculos; así como la presencia de nitratos y nitritos en producto final. En segundo lugar, se evaluará la actividad antidiabética y antioxidante de los péptidos que se generan como consecuencia del proceso de curado del jamón, y en qué fracción peptídica se encuentran dichas actividades.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para la realización de este proyecto se emplearon muestras de jamón curado de distintos meses de curación, así como carne de cerdo fresca (*Biceps femoris*).

El Plan de Trabajo de este proyecto puede dividirse en dos partes, con sus correspondientes métodos y materiales asociados: el análisis de iones en muestras de jamón curado para el estudio de la penetración de sal, y la evaluación de la actividad biológica antioxidante y antidiabética del extracto fraccionado de jamón curado.

### **2.1. Análisis de iones en muestras de jamón curado. Estudio de la penetración de sal durante el proceso.**

#### **2.1.1. PREPARACIÓN DE RECTAS DE CALIBRADO**

Se utilizaron estándares de iones a una concentración de 1000 ppm (mg/L) (Fluka), a partir de las cuales, se prepararon disoluciones de distintas concentraciones (50, 25, 10, 5, 1 y 0,5 ppm), tanto para aniones; fluoruro, cloruro, nitrito, bromuro, nitrato, sulfato y fosfato como para cationes; sodio, amonio, potasio, calcio y magnesio. Cada mezcla de calibrado se analizó por triplicado.

### 2.1.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Muestras de jamón: se tomaron lonchas de 2 cm de grosor de la parte media de jamones de distintos tiempos de curado (post-salado de 2 meses, y curado de 9, 12 y 24 meses). En ellas se realizaron dos cortes longitudinales obteniendo así 3 muestras, una de la parte interior de la loncha (adyacente a la grasa) que consistirá mayoritariamente en músculo *Biceps femoris*, una parte exterior que consistirá mayoritariamente en el músculo *Semimembranosus*, y una de la parte media que contiene mezcla de músculos (figura 1). Además, se analizó una muestra de carne fresca (músculo *B. femoris*) como control.



**FIGURA 1.** Muestra de loncha de jamón de 12 meses de curación tras la realización de los cortes longitudinales y eliminación de la grasa visible. a) *Biceps femoris*, b) parte central (mezcla de ambos músculos), c) *Semimembranosus*.

Todas ellas se limpiaron de grasa de depósito, se tritularon y se homogeneizaron (3 g) en agua bidestilada (30 mL) empleando un Stomacher (4 min a 4 °C), para la extracción de los iones. Posteriormente se centrifugó el extracto a 10000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se filtró a través de lana de vidrio. La muestra se diluyó en función de la concentración esperada de iones para que entrasen dentro de las rectas de calibrado anteriormente preparadas. En el caso del jamón se realizó una dilución 1:100, y para la muestra de carne 1:10.

Todos los patrones y muestras se filtraron a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45 µm antes del análisis.

### 2.1.3. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE IONES (FLUORURO, CLORURO, NITRITO, BROMURO, NITRATO, SULFATO, FOSFATO, SODIO, AMONIO, POTASIO, CALCIO Y MAGNESIO) y NaCl.

El análisis se realizó mediante cromatografía líquida de intercambio iónico con supresión iónica y detector de conductividad eléctrica.

Se empleó un equipo de cromatografía iónica; Dionex ICS-6.000 (Vertex), con detector de conductividad y supresora iónica, Dionex ADRS 600 2mm para aniones y Dionex CDRS 600 2 mm para cationes.

En la tabla 1 se describen las columnas cromatográficas y las condiciones del análisis para aniones y cationes.

Tras la inyección de los patrones, a partir de las áreas cromatográficas se construyeron las rectas de calibrado que servirán para el cálculo de las concentraciones (ppm) de los iones en muestras. Se realizaron tres inyecciones de cada patrón, tanto para aniones, como para cationes.

El contenido en sal (NaCl) se obtuvo, a partir del ion cloruro (también podría hacerse a partir del sodio), empleando la siguiente ecuación.

$$\frac{Y' \text{ g Cl} \times 58 \text{ g NaCl}}{35,5 \text{ g Cl}} = Y'' \text{ g NaCl} \quad (1)$$

Donde: Y': gramos de ion cloruro; Y'': gramos de sal.

**TABLA 1.** Condiciones del análisis mediante cromatografía iónica.

	<b>ANIONES</b>	<b>CATIONES</b>
<b>Columna</b>	AS11-HC-4µm	CS12A
Diámetro interno	2mm	2mm
Longitud	250mm	250mm
<b>Fase móvil</b>	NaOH 30mM	Ácido metanosulfónico 20mM
<b>Flujo</b>	0,38mL/min	0,25mL/min
<b>Modo de trabajo</b>	Isocrático	Isocrático
<b>Temperatura</b>	30°C	25°C
<b>Volumen de inyección</b>	5µL	5µL

#### 2.1.4. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Para la determinación de la humedad, se tomaron aproximadamente 5g de cada una de las muestras trituradas, descritas anteriormente. Se empleó un medidor de humedad (HB43 Halogen, Mettler Toledo) que proporciona el contenido en agua en %.

A partir del valor de humedad, se obtuvo el contenido en materia seca por diferencia.

$$\%MS = 100 - \%H_2O \quad (2)$$

Donde: %MS= porcentaje de materia seca de la muestra, %H<sub>2</sub>O= porcentaje de agua de la muestra.

## 2.2. Medida de la actividad biológica antioxidante y antidiabética del jamón curado. Efecto de la sal.

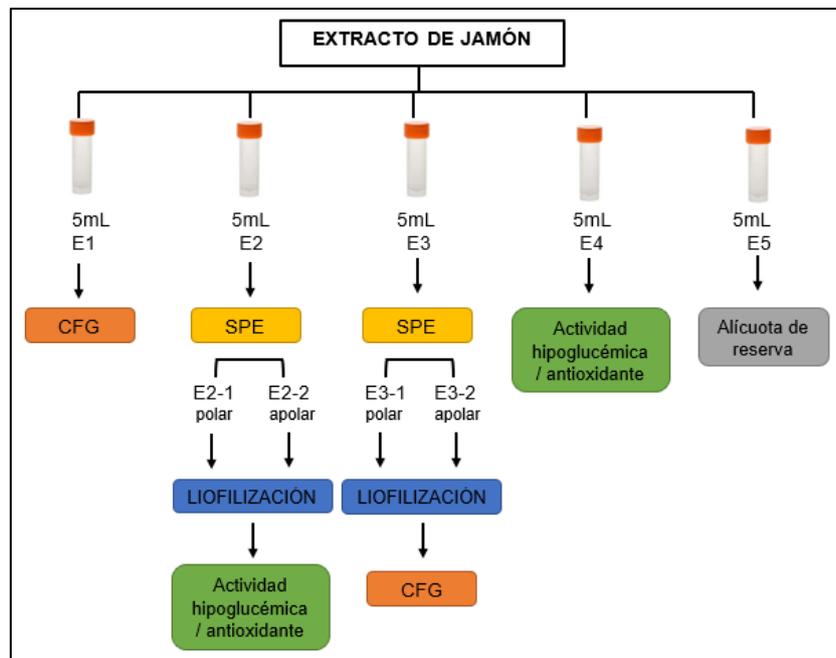
### 2.2.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En este caso, se empleó una muestra del músculo *Biceps femoris* de jamón de 12 meses de curado. La muestra se trituró y 25 g se homogenizaron con 100 mL de HCl 0,01N en Stomacher (8 min a 4 °C). El extracto obtenido se centrifugó (10.000 rpm, 20 minutos, 4°C) y el sobrenadante se filtró por lana de vidrio.

La totalidad del extracto obtenido se desproteinizó con etanol en una proporción 1:3 v/v, durante 24 horas a 4°C.

Una vez transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó y se filtró mediante un filtro de nylon de 0,45 µm. Al sobrenadante obtenido se le retiró el etanol empleando un rotavapor y posteriormente se liofilizó. El liofilizado se disolvió en 25mL de HCl 0,01N, que se distribuyó en 5 alícuotas de 5 mL (E1, E2, E3, E4, E5), que se congelaron a la espera de los siguientes análisis.

En la figura 2 se muestra un esquema de los análisis que se han realizado en cada una de las alícuotas de muestra obtenidas.



**FIGURA 2.** Esquema del Plan de Trabajo a partir del extracto de jamón curado de 12 meses. CFG, cromatografía de filtración en gel; SPE, “solid phase extraction” (extracción en fase sólida).

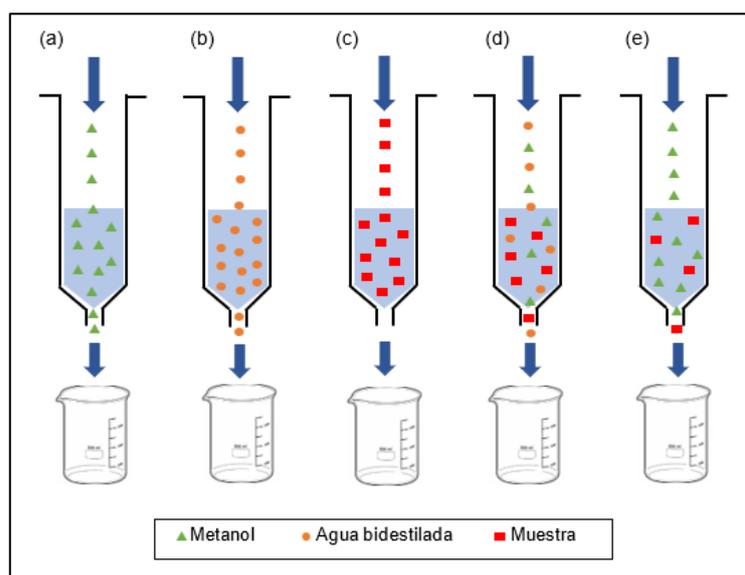
## 2.2.2. FRACCIONAMIENTO POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

Se realiza en las alícuotas E2 y E3. El objetivo de esta etapa es obtener dos fracciones de distinta polaridad, en las que la sal quedará en la fracción polar del extracto.

Para ello se empleó un cartucho de extracción en fase sólida Strata C18-E (10 g/ 60 ml) (Phenomenex), en el cual se retuvo la fracción hidrofóbica (péptidos y aminoácidos hidrofóbicos del extracto) puesto que está elaborado a base de moléculas de octadecilsilano (C18) unidas a partículas de sílica.

El procedimiento que se ha seguido es el siguiente (figura 3):

- Acondicionamiento con metanol
- Equilibrado con agua bidestilada
- Adición de la muestra (de extracto E2 o E3)
- Lavado con agua conteniendo un 2 % de metanol. Se recogió tanto la muestra tras pasarla por el cartucho (paso c) como el agua tras el lavado del cartucho (paso d) como fracción hidrofílica de la muestra, que contendrá péptidos pequeños y aminoácidos polares, y sales, constituyendo las muestras E2-1 y E3-1.
- Elución con 100 mL de metanol. En esta etapa se recogieron todos los compuestos hidrofóbicos de la muestra, como son péptidos y aminoácidos apolares, constituyendo las muestras E2-2 y E3-2.



**FIGURA 3.** Procedimiento de extracción en fase sólida (SPE) para eliminar la sal de la muestra: *a) acondicionamiento, b) equilibrado, c) paso de la muestra, d) lavado, e) elución.*

Las muestras así obtenidas, se sometieron a liofilización (las muestras de la etapa e, se secaron previamente para eliminar el metanol). Las muestras liofilizadas E2-1 y E2-2, se disolvieron en 1,5 mL de HCl 0,01N para la

realización de las pruebas de actividad. Las muestras liofilizadas E3-1 y E3-2, se disolvieron en 5 mL de agua y se sometieron a un posterior fraccionamiento por cromatografía de filtración en gel, como se describe en el apartado siguiente.

### 2.2.3. FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL (CFG)

El extracto recogido en la alícuota E1, y las muestras E3-1 y E3-2 resultantes del fraccionamiento por SPE, fueron sometidos a CFG con el fin de obtener un perfil del extracto peptídico en base al tamaño de los péptidos, e identificar la presencia de la sal en determinadas fracciones. Para ello, se empleó una columna Sephadex G-25 de 64 cm de largo y 2,6 cm de diámetro.

Para llevar a cabo la separación se empleó una disolución de HCl 0,01N como fase móvil, a un flujo de 0,25 mL/min. Además, esta separación se realizó en cámara fría a 4°C. Una vez inyectada la muestra (extracto correspondiente a 5 g de jamón, 5 mL), se recogieron fracciones de 5 mL empleando un colector. Por último, se midió la absorbancia a 214nm de las fracciones recogidas empleando un espectrofotómetro de UV/visible (PCary 60; Agilent Technologies). A partir de las lecturas se obtuvo el perfil de péptidos presentes en las muestras (el extracto de jamón, E1, el extracto con la sal y compuestos hidrofílicos, E3-1, y el extracto desalado hidrofóbico, E3-2), ordenados en base a la masa molecular. Asimismo, se analizó el contenido en sodio en cada una de las fracciones para, a partir del mismo, medir la presencia de sal en dichas fracciones.

### 2.2.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante de los extractos de jamón obtenidos (E4, E2-1 y E2-2) se determinó mediante un ensayo ABTS según el método descrito por Re *et al.* (1999), con algunas modificaciones.

El método consiste en medir la actividad antioxidante equivalente al Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), TEAC (del inglés *Trolox equivalent antioxidant capacity*), y se basa en la reducción de la coloración verde/azul producida por la reacción del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico (ABTS<sup>+</sup>) cuando se hayan presentes agentes antioxidantes en la muestra. La determinación se realiza empleando un espectrofotómetro PCary 60 (Agilent Technologies) y una cubeta. Se utilizó ácido ascórbico como control positivo y tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,4 (PBS) como control negativo. Se preparó una recta de calibrado con TROLOX, de 0,5 a 20 µM en PBS.

Para el ensayo, se tomaron 10 µL de cada muestra y 990 µL de ABTS *working solution* (ABTS, 7 mM en persulfato potásico 2,45 mM, mezclado en la proporción 1:89 con PBS y evitando la exposición a la luz). Esto se realizó de la misma forma para el control positivo y el control negativo. A continuación,

se agitaron todos los tubos y, tras esperar 6 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, se procedió a su lectura en espectrofotómetro a 734 nm.

El espectrofotómetro proporciona un valor de absorbancia proporcional a la capacidad antioxidante de cada muestra y los resultados obtenidos serán expresados en equivalentes de Trolox ( $\mu\text{M}$ ) ya que es el compuesto antioxidante que se toma como referencia en este método. Así pues, el valor de absorbancia obtenido se interpoló en la recta de calibrado del TROLOX ( $y=4,2596x-1,9347$ ), obteniéndose el porcentaje de inhibición de dicha muestra. Tras ello, se calculó la concentración en equivalentes de Trolox ( $\mu\text{M}$ ) con la siguiente fórmula:

$$[\text{Trolox}] = \frac{\% \text{ inhibición muestra} - n}{m} \quad (3)$$

Donde:  $y=mx+n$ ;  $m = 4,2596$  y  $n = -1,9347$ .

### 2.2.5. ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA

Para medir la actividad antidiabética se emplearon las alícuotas E4 (extracto de jamón), E2-1 (extracto con sal y compuestos polares) y E2-2 (extracto desalado apolar). Se realizan tres ensayos diferentes para medir la actividad antidiabética: determinación de la actividad  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa y DPPIV.

- Actividad  $\alpha$ -amilasa: se empleó el kit “Amylase Activity Assay Kit MAK009” de Sigma-Aldrich y se siguieron las instrucciones del fabricante. El análisis se realizó por triplicado. La placa multipocillo empleada para el ensayo se leyó en espectrofotómetro (PCary 60; Agilent Technologies) a 254nm y se calculó el porcentaje de inhibición del enzima con la siguiente fórmula.

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\bar{X}_{\text{control}} - \text{Muestra}}{\bar{X}_{\text{control}}} \times 100 \quad (4)$$

Donde:  $\bar{X}_{\text{control}}$ =valor de absorbancia medio del control;  
Muestra=valor de absorbancia de la muestra.

- Actividad  $\alpha$ -glucosidasa: se empleó el kit “ $\alpha$ -glucosidase Activity Assay Kit MAK123” de Sigma-Aldrich y según las instrucciones del fabricante, aunque con algunas modificaciones (Mora et al., 2020). Los ensayos se hicieron por triplicado. Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de muestra en placas multipocillo. A continuación, se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -glucosidasa (0,5 U/mL) y se incubó en estufa durante 5 minutos a 37°C. Tras ello, se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de disolución de p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (p-NPG) 1,25 mM a cada pocillo y se incubó de nuevo durante 20 minutos a 37°C. Finalmente, la placa se midió en espectrofotómetro (Pcary 60; Agilent Technologies) a 254nm. Se hizo lo mismo para agua (control negativo), tampón fosfato 100 mM (control negativo) y 5 mg/mL

acarbosa (control positivo). El porcentaje de inhibición se obtendrá mediante la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left( 1 - \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \right) \times 100 \quad (5)$$

- Actividad Dipeptidil-peptidasa 4 (DPPIV): se empleó el kit “DPP4 Inhibitor Screening Kit” de Sigma-Aldrich y se siguieron las instrucciones del fabricante. El análisis se realizó por triplicado y se utilizó el “buffer DPPIV” del kit como control negativo y *sitagliptina* como control positivo. En este caso fue necesario emplear un lector de fluorescencia para placas multipocillo, efectuándose medidas cada minuto (FLU  $\lambda_{\text{ex}} = 360\text{nm}$  /  $\lambda_{\text{em}} = 460\text{nm}$ ). El porcentaje de inhibición relativa se obtuvo a partir de la siguiente fórmula.

$$\% \text{ inhibición relativa} = \left( \frac{\text{Pendiente EC} - \text{Pendiente SM}}{\text{Pendiente EC}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Donde: Pendiente SM= pendiente del inhibidor de muestra; Pendiente EC= pendiente del control de enzima.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

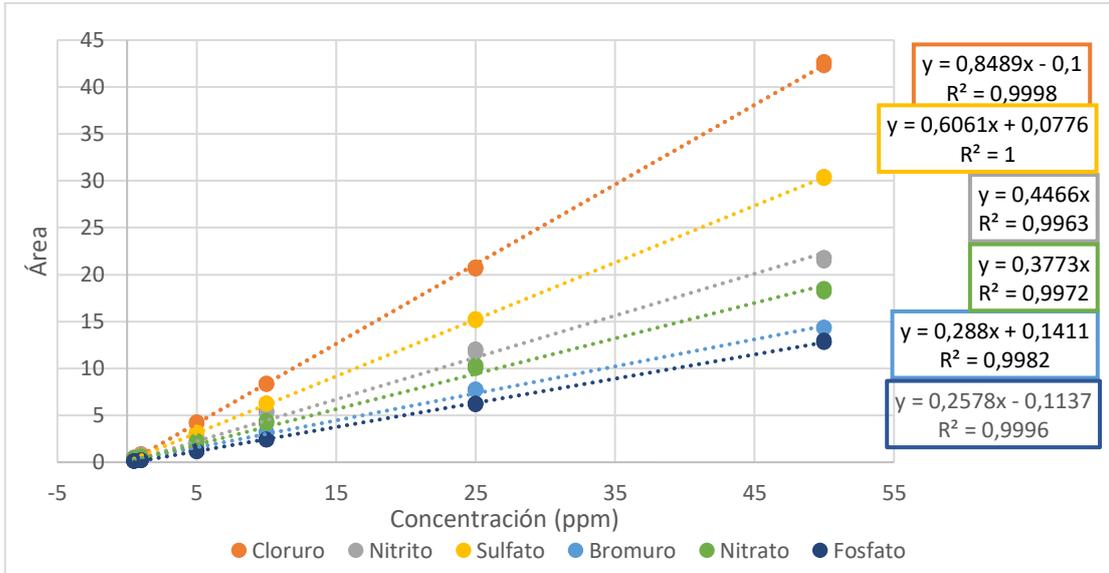
#### 3.1. Análisis de iones en muestras de jamón curado. Estudio de la penetración de sal durante el proceso y prevalencia de nitratos y nitritos.

El análisis de iones mediante cromatografía líquida de intercambio iónico puede tener diversas aplicaciones dentro de la industria alimentaria. Así pues, esta técnica puede emplearse para la determinación de iones inorgánicos, análisis de carbohidratos y de ácidos orgánicos, o incluso aminas (Vertex, 2022).

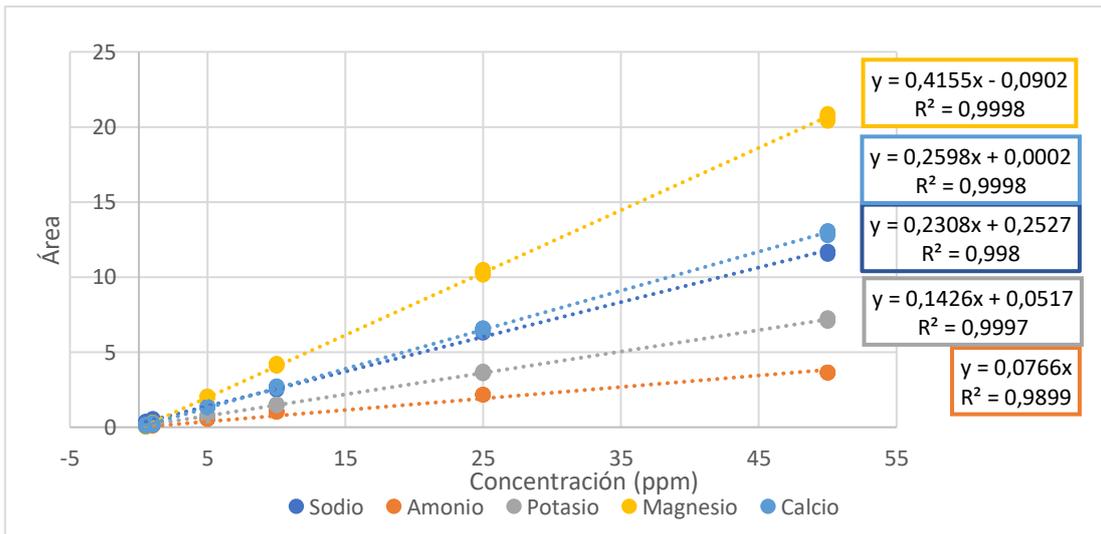
En este caso, se ha utilizado la cromatografía iónica con detector conductimétrico y supresión iónica para analizar el contenido de iones (aniones y cationes) inorgánicos carne de cerdo fresca y en jamón curado, estudiar la distribución de la sal al inicio (pot saladao) y final del proceso de curado y evaluar la presencia de nitratos y nitritos en producto final, es decir, jamones que han finalizado el proceso de curación y están listos para el consumo humano. Esto será realmente importante de cara a cumplir con las recomendaciones establecidas por el Comité mixto FAO/OMS sobre aditivos alimentarios de forma que los consumidores dispondrán en el mercado de productos seguros desde el punto de vista toxicológico.

El proceso de análisis comienza con la inyección en el cromatógrafo, por triplicado, de 6 niveles de concentración de los patrones, tanto para aniones como para cationes. Con los resultados de áreas obtenidos, se elaboran las rectas de calibrado que serán utilizadas para el cálculo de las concentraciones de aniones y cationes en las muestras (ver figuras 4 y 5). Las rectas de

calibrado obtenidas se consideran válidas y útiles para este análisis ya que los coeficientes de regresión lineal obtenidos son muy próximos o igual a 1.

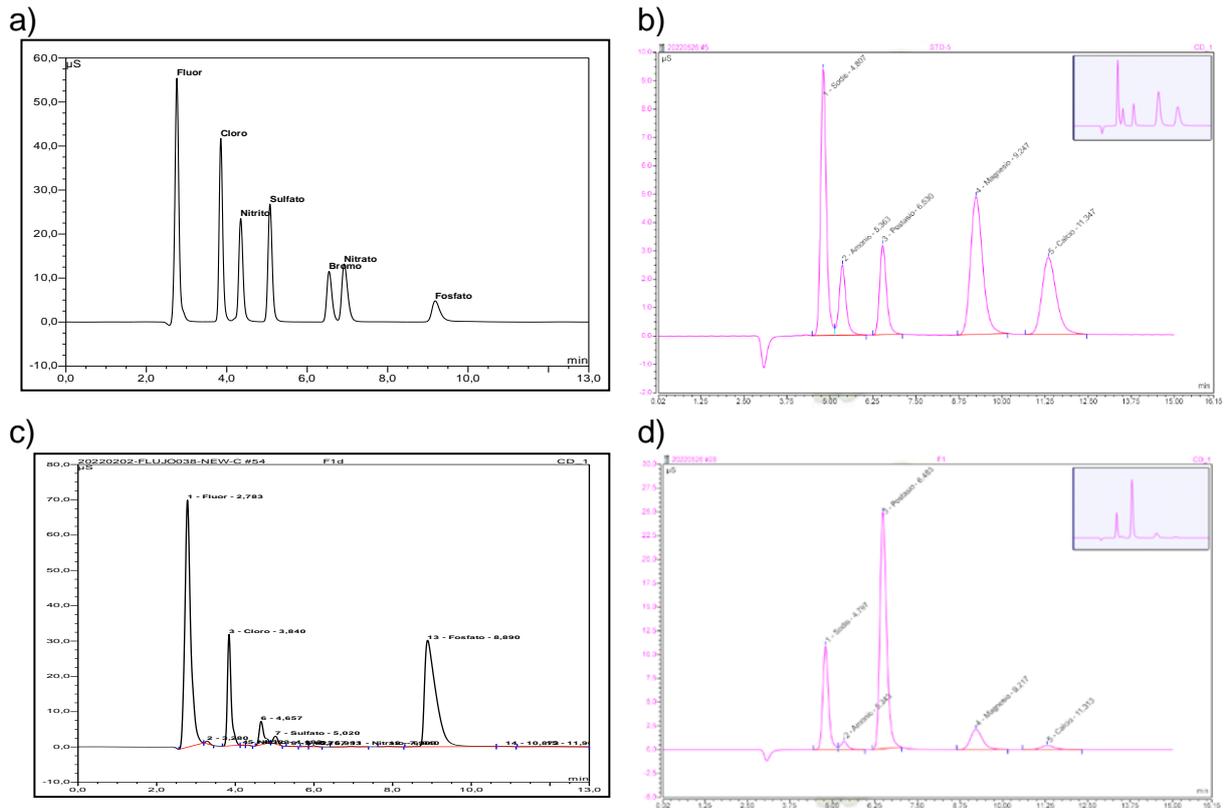


**FIGURA 4.** Rectas de calibrado de aniones.



**FIGURA 5.** Rectas de calibrado de cationes.

Una vez obtenidas las rectas, se procede a la inyección de las muestras en el mismo equipo y a la determinación de su concentración a partir de sus áreas. En la figura 6 pueden verse ejemplos de los cromatogramas de aniones y cationes obtenidos para carne fresca y una mezcla patrón de 5 ppm de cada uno de ellos.



**FIGURA 6.** Cromatogramas de una mezcla patrón (5 ppm) de aniones (a) y cationes (b), y aniones (c) y cationes (d) presentes en una muestra de carne fresca de cerdo (*Biceps femoris*).

En la tabla 2 se muestran los contenidos de aniones (cloruro, nitrito, sulfato, nitrato, fosfato) y cationes (sodio, amonio, potasio, magnesio, calcio) en carne fresca de cerdo y jamón curado, ambos analizados en el músculo *B. femoris* y expresados en base seca.

El ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) va aumentando a lo largo del proceso de curado y maduración del jamón desde 1,05 mg/g (base seca) en muestras de carne fresca hasta aproximadamente multiplicar por 10 su valor a los 12 meses de curado. Esto se debe a que durante el proceso post-mortem de la carne y seguidamente el proceso de salado y curado, tiene lugar una importante transformación de la carne principalmente debida a la gran actividad proteolítica de las enzimas implicadas (endoproteasas y exoproteasas) (Perea, 2020). Esta actividad enzimática, además de producir cambios en las proteínas, tiene como consecuencia la generación de otros compuestos como es el caso de los compuestos nitrogenados, entre los que se encuentra el amonio, que formarán parte de la fracción de nitrógeno no proteico (NNP) (Salazar, 2013).

**TABLA 2.** Contenido (mg/g calculados sobre base seca) de cationes y aniones del músculo *Biceps femoris* de carne de cerdo fresca y curada (12 meses de curado).

	Carne fresca mg/g (b.s) <sup>1</sup>		Jamón curado mg/g (b.s) <sup>2</sup>	
	Media	Desviación Standard	Media	Desviación Standard
<b>Cationes</b>				
Sodio	2,102	0,158	59,392	7,296
Amonio	1,048	0,031	10,643	0,523
Potasio	15,776	0,271	9,826	1,010
Magnesio	0,436	0,007	0,602	0,054
Calcio	0,087	0,006	0,261	0,006
<b>Aniones</b>				
Cloruro	1,732	0,060	47,292	3,530
Nitrito	0,018	0,014	0,202	0,094
Sulfato	0,129	0,021	0,262	0,236
Nitrato	0,035	0,008	0,264	0,024
Fosfato	15,750	0,581	11,630	1,229

1. Contenido de humedad 74,77%

2. Contenido de humedad 44,61%

La diferencia encontrada en el contenido de calcio entre la carne fresca y el jamón curado pueden atribuirse, a variabilidad entre muestras (Reig et al., 2013), y a la posible presencia de calcio en las sales de curado. Aun así, los resultados de las muestras de jamón se asemejan a los obtenidos por otros autores en la determinación de micronutrientes de este alimento (Jiménez-Colmenero et al., 2010).

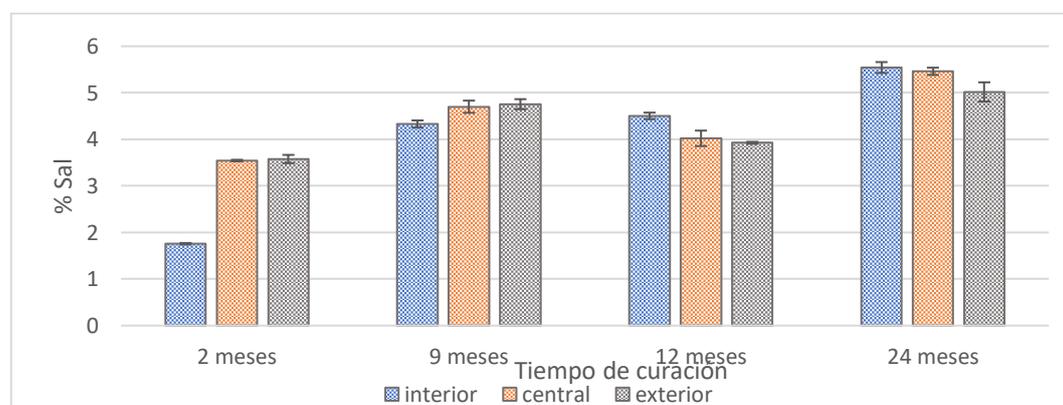
En cuanto a los nitratos y nitritos, la finalidad de su determinación reside en la detección y evaluación de la cantidad presente. Como se puede observar en la tabla 3, ya en el post-salado, las cantidades de nitratos y nitritos procedentes de las sales nitrificantes son muy bajas y en producto curado son residuales. Por tanto, se puede decir que el alimento es seguro respecto a las recomendaciones anteriormente citadas (máximo 50 ppm en producto final).

**TABLA 3.** Nitratos y nitritos presentes en muestras de carne fresca y jamón a distintos tiempos del proceso de curación, expresado en ppm. *DS: desviación estándar.*

	Nitrito		Nitrato	
	ppm	DS	ppm	DS
Carne fresca	0,045	0,034	0,087	0,019
Post-salado 2 meses	0,163	0,053	0,128	0,052
Curado 9 meses	0,041	0,030	0,159	0,024
Curado 12 meses	0,060	0,023	0,153	0,034
Curado 24 meses	0,063	0,029	0,142	0,032

La determinación de la cantidad de sodio y cloro permitió cuantificar la sal de las muestras. Además, el hecho de que a las muestras de lonchas de jamón se les realizase dos cortes longitudinales separándolas en los diferentes músculos, permite evaluar el perfil de penetración de la sal en el proceso de curado.

De esta forma, en la figura 7 se muestra el contenido en sal (%) en 3 capas a distinta profundidad, de una loncha de jamón curado en el post-salado y en producto terminado, de 9, 12 y 24 meses. Así pues, se puede ver el perfil de distribución de la sal en las distintas muestras. El principal objetivo de la etapa de post-salado es que la sal a la que ha sido expuesta la pieza durante el salado penetre desde el exterior hacia las zonas internas; es decir, desde el músculo *Semimembranosus* hasta el *Bíceps femoris*. En dicha figura puede comprobarse como en el post-salado (2 meses) la cantidad de sal es mayor en las zonas exteriores, pero con el paso de los meses y ya en la etapa de curado y maduración del jamón, se observa cómo la sal ha conseguido penetrar totalmente e incluso, los mecanismos de difusión y deshidratación osmótica hacen que la cantidad de sal pueda llegar a ser mayor en el interior de la pieza.



**FIGURA 7.** Porcentaje de sal en jamón curado (base húmeda) a distintos tiempos de curación.

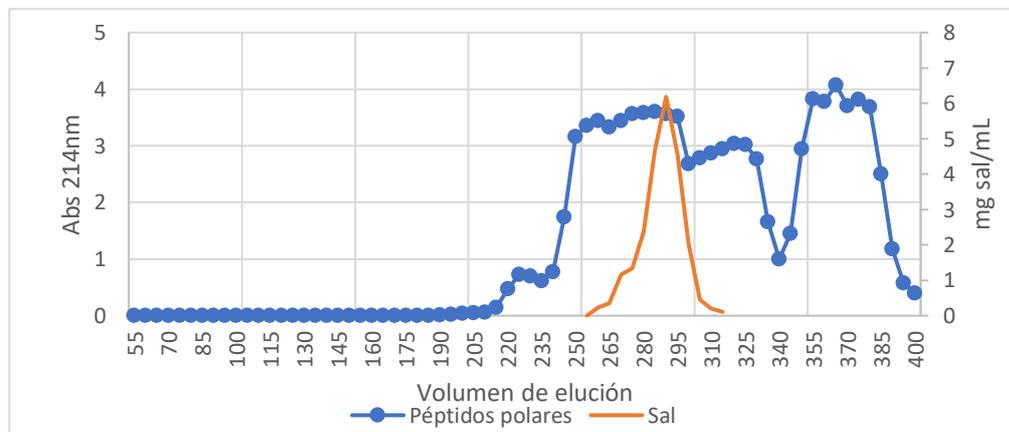
### 3.2. Medida de la actividad biológica antioxidante y antidiabética del jamón curado.

En segundo lugar, se buscará actividad antidiabética y antioxidante de los péptidos que se generan como consecuencia del proceso de curado del jamón, y en qué fracción peptídica se encuentran dichas actividades.

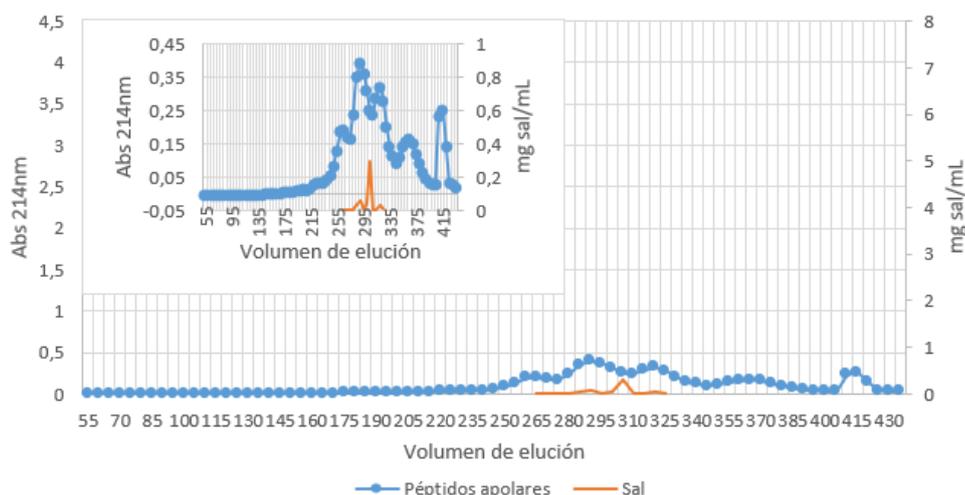
Para ello, tal y como se ha descrito en el apartado “material y métodos” (figura 2), se prepara un extracto de jamón a partir del cual se realizan distintos análisis. Parte de ese extracto es sometido a fraccionamiento por extracción en fase sólida (SPE) mediante el cual se obtienen dos fracciones; una de péptidos polares que incluyen la sal, y otra de péptidos hidrofóbicos.

Ambos extractos se someten a cromatografía en columna de Sephadex G-25, por el que obtenemos el perfil de péptidos presentes en éstos y que se muestran en las figuras 8 y 9. La detección de los péptidos se realizó a 214 nm, que es la longitud de onda en la que éstos presentan la máxima absorción (Mora et al., 2020). En dichas figuras se muestra la secuencia de elución de los péptidos presentes en los extractos de manera que los péptidos con mayor masa molecular eluyen primero, y los más pequeños después, ya que son más retenidos en la columna. Debido a la desproteínización con etanol, que se realizó de la muestra, los péptidos presentan una masa molecular en el rango 400-2500 Da según estudios previos (Mora et al., 2016). Los gráficos reflejan como la mayoría de los péptidos presentes en las muestras de jamón son polares. La figura 9, que corresponde al extracto de péptidos apolares muestra valores de absorbancia mucho menores, del orden de 10 veces inferior, en comparación con los que se muestran en la figura 8, correspondiente a los péptidos polares.

El análisis del contenido de sodio por cromatografía iónica de las fracciones recogidas permite situar la sal entre las fracciones 42 y 52, que se corresponden con un volumen de elución de 260-310 ml respectivamente (ver figuras 8 y 9).



**FIGURA 8.** Perfil de péptidos polares del extracto de jamón de 12 meses. Localización de la sal por fracciones.



**FIGURA 9.** Perfil de péptidos apolares del extracto desalado de jamón de 12 meses obtenido por CFG.

En ambos extractos se llevan a cabo, además, los ensayos de las actividades antioxidante y antidiabética ( $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa y DPPIV). Los resultados pueden verse en la tabla 4 donde se representan, por un lado, los valores medios de los porcentajes de inhibición de los distintos enzimas junto con su desviación estándar y el coeficiente de variación y, por otro lado, la media de los valores de equivalentes TROLOX obtenidos en el ensayo de actividad antioxidante con su desviación estándar y su coeficiente de variación.

**TABLA 4.** Resultados obtenidos en los ensayos de  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa y DPPIV (actividad antidiabética), y actividad antioxidante. *E4: extracto de jamón completo; E2-1: fracción polar del jamón (péptidos polares pequeños no retenidos en SPE, y sal); E2-2: extracto de jamón desalado.*

	% inhibición $\alpha$ -amilasa			% inhibición $\alpha$ -glucosidasa			% inhibición DPPIV			Act. Antioxidante (ABTS)		
	$\bar{x}$	SD	CV%	$\bar{x}$	SD	CV%	$\bar{x}$	SD	CV%	$\bar{x}$ Trolox eq ( $\mu$ M)	SD	CV%
E4	<b>2,23</b>	0,96	42,96	<b>50,17</b>	1,78	3,56	<b>72,74</b>	3,34	4,59	<b>23,97</b>	1,75	7,31
E2-1	<b>1,81</b>	0,87	48,31	<b>41,15</b>	3,94	0,10	<b>94,28</b>	10,28	10,90	<b>25,15</b>	0,01	0,02
E2-2	<b>3,18</b>	0,59	18,43	<b>11,05</b>	0,82	7,45	-	-	-	<b>9,44</b>	0,19	1,97

Los resultados obtenidos permiten comprobar en primer lugar que los péptidos responsables de la actividad antidiabética son, en su mayoría, polares. Puede observarse en la tabla 4 que los porcentajes más altos de inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y DPPIV se dieron tanto en el extracto total del jamón (E4) como en la fracción polar (E2-1) (péptidos polares y sal)

recogida tras el paso de la muestra por la columna SPE; mientras que los porcentajes de inhibición para las tres enzimas estudiadas fueron muy bajos e incluso no existió inhibición de la DPPIV en el extracto E2-2, que contenía péptidos apolares. También es importante destacar que no se ha observado inhibición apreciable de la actividad  $\alpha$ -amilasa en ninguno de los extractos de jamón ya que se obtuvieron porcentajes de inhibición muy bajos, entre 1,81 y 3,18%.

La inhibición de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa se encuentra tanto en el extracto de jamón completo, con un porcentaje de inhibición del enzima del 50,17% como en la fracción polar de éste (41,15%), y en una proporción mucho menor en la fracción apolar (11,05%). A este respecto, se ya se había observado una inhibición de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa significativa tras separar por HPLC un extracto de jamón ibérico que también correspondía a la fracción de péptidos polares (Mora et al., 2020). Por otro lado, los valores de inhibición del enzima DPPIV por parte del extracto completo y de la fracción polar son del 72,74% y 94,28% respectivamente. Estos resultados coinciden con otros previamente publicados en los que se identificaron secuencias de algunos péptidos polares y de pequeño tamaño con actividad inhibidora de la enzima DPPIV (Gallego et al., 2014).

Por último, se encuentra actividad antioxidante en todas las muestras del ensayo, tanto en el extracto completo (23,97  $\mu\text{mol eq. Trolox/ml extracto}$ ) y el extracto con compuestos polares y sal (25,15  $\mu\text{mol eq. Trolox/ml extracto}$ ), como en la fracción apolar del extracto, aunque en menor medida (9,44  $\mu\text{mol eq. Trolox/ml extracto}$ ). Sin embargo, el hecho de que el extracto completo y la fracción polar presenten valores similares puede deberse a que los péptidos responsables de la actividad antioxidante sean muy polares y de pequeño tamaño molecular. De hecho, ya se había observado en un extracto de jamón, actividad antioxidante evaluada por el método del poder reductor del hierro y de medida del radical libre (DPPH) (Escudero et al., 2013), que, tras su separación en columna Sephadex, se confirmó que se debía a péptidos de tamaño pequeño y de alta polaridad (Mora et al., 2014).

Por tanto, estos resultados podrían reforzar los hallazgos obtenidos en los estudios clínicos recientes relacionados con que, a pesar de que la cantidad de sal que presenta el jamón curado sea elevada, los efectos negativos sobre la salud asociados al consumo de sal quedarían contrarrestados por la presencia de estos péptidos.

#### **4. CONCLUSIONES**

Se ha adaptado el análisis de aniones y cationes por cromatografía iónica a extractos de jamón fresco y de distintos grados de curación, dejando patente la correcta penetración de sal y la disminución hasta límites seguros de los nitratos y nitritos, lo que resulta muy importante desde el punto de vista de seguridad alimentaria.

Por otro lado, se evidencia la presencia de péptidos bioactivos con actividad antioxidante y antidiabética en el jamón curado. Estas actividades biológicas se han observado principalmente en la fracción más hidrofílica, en la que se encuentran péptidos de pequeño tamaño y muy polares.

Con todo ello, se puede concluir que el jamón curado es un alimento rico en compuestos con un elevado interés biológico con potencial efecto protector de enfermedades crónicas como la diabetes, que podría además ejercer actividad antioxidante en el organismo. Esto supone una importante línea de investigación a nivel de salud humana, ya que estos péptidos podrían tener numerosas aplicaciones en el futuro desde el punto de vista clínico.

## 5. REFERENCIAS

- AINIA. 2012. Cómo innovar en productos cárnico-curados tradicionales. Dirección URL: <<https://www.ainia.es/ainia-news/como-innovar-en-productos-carnico-curados-tradicionales/>>. Consultado: 10/8/22.
- Armenteros, M.<sup>a</sup>; Aristoy, M.C.; Barat, J. M.; Toldrá, F. 2012. Biochemical and sensory changes in dry cured ham salted with partial replacements of NaCl by other chloride salts. *Meat Science*, **90**: 361-367.
- Armenteros, M.<sup>b</sup>; Aristoy, M. C.; Toldrá, F. 2012. Evolution of nitrate and nitrite during the processing of dry-cured ham with partial replacement of NaCl by other chloride salts. *Meat Science*, **91**: 378-381.
- Armenteros, M. 2010. Reducción de sodio en lomo y jamón curados. Efecto sobre la proteólisis y las características sensoriales. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. IATA (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos) - CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).
- ATSDR [Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades]. Consultado: 2022. Resúmenes de Salud Pública – Nitrato y Nitrito. Dirección URL: <[https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs204.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs204.html)>. Consultado: 22/8/22.
- Cando, D. 2012. Nitratos, nitritos y jamón curado. *Blog sobre la carne y los productos cárnicos*. Dirección URL: < <https://otcmaster2011.wordpress.com/2011/11/23/nitratos-nitritos-y-jamon-curado-2/> >. Consultado: 20/8/22.
- Comisión del Codex Alimentarius. 2019. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comité del Codex sobre aditivos alimentarios (51<sup>a</sup> reunión). Documento de debate sobre el uso de nitratos (SIN 251, 252) y nitritos (SIN 249, 250). Dirección URL: <<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/meetings/detail/es/?meeting=CCFA&session=51>>. Consultado: 15/8/22.
- Escudero, E; Mora, L; Fraser, P. D; Aristoy, M. C; Toldrá, F. 2013. Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Food chemistry*, **138**: 1282-1288.
- FAO [Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura]. 2014. La dieta mediterránea, alternativa a malnutrición y obesidad. Dirección URL: <<https://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/es/c/515197/>>. Consultado: 12/08/22.
- Gallego, M; Aristoy, M. C; Toldrá, F. 2014. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Meat Science*, **96**: 757-761.
- Gallego, M. 2015. Péptidos generados en jamón curado como marcadores de calidad. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. IATA (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos) - CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

- Grau, R; Albarracín, W; Toldrá, F; Antequera, T; Barat, J.M. 2008. Study of salting and post-salting stages of fresh and thawed Iberian hams. *Meat Science*, **79**: 677-682.
- Jahandideh, F.; Bourque, S. L.; Wu, J. 2022. A comprehensive review on the glucoregulatory properties of food-derived bioactive peptides. *Food chemistry: X*, **13**: 100222.
- Jiménez-Colmenero, F.; Ventanas, J.; Toldrá, F. 2010. Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet. *Meat Science*, **84**: 585-593.
- Martini, S; Conte, A.; Tagliacuzzi, D. 2019. Comparative peptidomic profile and bioactivities of cooked beef, pork, chicken and turkey meat after in vitro gastro-intestinal digestion. *Journal of Proteomics*, **208**: 103500.
- Montoro-García, S.; Velasco-Soria, A.; Mora, L.; Carazo-Díaz, C.; Prieto-Merino, D.; Avellaneda, A.; Miranzo, D.; Casas-Pina, T.; Toldrá, F; Abellán-Alemán, J. 2022. Beneficial impact of pork dry-cured ham consumption on blood pressure and cardiometabolic markers in individuals with cardiovascular risk. *Nutrients*, **14**, 298.
- Mora, L; Escudero, E.; Fraser, P. D; Aristoy, M. C; Toldrá, F. 2014. Proteomic identification of antioxidant peptides from 400 to 2500 Da generated in Spanish dry-cured ham contained in a size-exclusion chromatography fraction. *Food Research International*, **56**: 68-76.
- Mora, L.; Aristoy, M.C.; Toldrá, F. 2019. Bioactive peptides. *Encyclopedia of Food Chemistry*, **2**: 381-389.
- Mora, L.; González-Rogel, D.; Heres, A.; Toldrá, F. 2020. Iberian dry-cured ham as a potential source of  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory peptides. *Journal of Functional Foods*, **67**, 103840.
- OMS [Organización Mundial de la Salud]. 2020. Reducir el consumo de sal. Dirección URL: <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction>>. Consultado: 12/8/22.
- Perea Sanz, L. 2020. Desarrollo de embutidos con menores niveles de nitrificantes inoculados con levaduras seleccionadas para mantener las características sensoriales propias, su seguridad e incrementar el aroma a curado. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. IATA (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos) - CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).
- Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos.
- Re, R; Pellegrini, N; Proteggente, A; Yang, M; Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26(9-10)**: 1231-1237.
- Reig, M; Aristoy, M. C; Toldrá, F. 2013. Variability in the contents of pork meat nutrients and how it may affect food composition databases. *Food Chemistry*, **140(3)**: 478-482.
- Ruiz-Candela López, M.; Bes-Rastrollo, M.; Zazpe, I.; Martínez, J. A.; Cuervo, M; Martínez-González, M. A. 2009. Consumo de jamón curado e incidencia de episodios cardiovasculares, hipertensión arterial o ganancia de peso. *Medicina Clínica*, **133(15)**: 574-580.
- Salazar Serna, E. 2013. Tecnología y caracterización de productos cárnicos curados obtenidos a partir de cerdo Chato Murciano. Tesis Doctoral. Universidad Católica San Antonio.
- Toldrá, F. & Aristoy, M. C. 2010. Dry-cured ham. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of meat processing* (pp. 351-362). Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Valencia-Mejía, E.; Batista, K. A.; Fernández, J. J. A.; Fernandes, K. F. 2019. Antihyperglycemic and hypoglycemic activity of naturally occurring peptides and protein hydrolysates from easy-to-cook and hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Food Research International*, **121**: 238-246.
- Vertex Technics. Aplicaciones Cromatografía Iónica. Dirección URL: <<https://www.vertex.es/analitica/aplicaciones-cromatografia-ionica/>> Consultado: 22/8/22.